



GISELLY MOTA DA SILVA

**MICROPROPAGAÇÃO E PRODUÇÃO DE
CONSTITUINTES VOLÁTEIS *IN*
VITRO DE *Aloysia triphylla* (L'HÉRIT) BRITTON**

**LAVRAS-MG
2013**

GISELLY MOTA DA SILVA

**MICROPROPAGAÇÃO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES
VOLÁTEIS *IN VITRO* DE *Aloysia triphylla* (L'HÉRIT) BRITTON**

Dissertação 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 obtenção do título de Mestre.

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Coorientador

**LAVRAS-MG
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Silva, Giselly Mota da.

Micropropagação e produção de constituintes voláteis *in vitro* de
Aloysia triphylla (L'Hérit) Britton / Giselly Mota da Silva. – Lavras
: UFLA, 2013.

113 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Headspace-CG/EM. 3. Propagação. 4.
Meio de cultura. 5. Cidrão. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 631.53

GISELLY MOTA DA SILVA

**MICROPROPAGAÇÃO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES
VOLÁTEIS *IN VITRO* DE *Aloysia triphylla* (L'HÉRIT) BRITTON**

Dissertação 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 obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de Fevereiro de 2013.

Dr. Ricardo Monteiro Corrêa IFMG

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto UFLA

Dra. Ana Luíza de Oliveira Timbó UFLA

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Orientadora

**LAVRAS-MG
2013**

À minha família,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus, por sempre ter me direcionado para os melhores caminhos e me ter dado forças para o desenvolvimento de meu trabalho;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão de bolsas de estudos e auxílio financeiro nos experimentos;

À professora Suzan Kelly Vilela Bertolucci, pela orientação, amizade, compreensão e pelos conhecimentos transmitidos que foram fundamentais para a realização do trabalho;

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, que foi mais que um coorientador, pelo apoio, amizade e orientação, que foram essenciais para desenvolver minhas atividades;

Ao Dr. Osmar Alves Lameira, pela contribuição nos ensinamentos e pelo incentivo;

Aos amigos do laboratório; Lucila, Ana Luiza, Helena, Sâmia, Mariane, Thainá, as Andreíças, Ivan, Alexandre e principalmente a Joyce, pelo grande apoio e amizade durante a realização dos trabalhos;

Aos funcionários do Laboratório Evaldo, “seu” Dico e “seu” Luizinho, pela fundamental ajuda no desenvolvimento dos experimentos;

Às minhas amigas Mariliana, Tainá, Daniele e Iwanne, pelo apoio e amizade;

E, principalmente a minha querida família, presente de Deus em minha vida, meu pai Francisco, meus irmãos Alberto e Cintia, aos meus sobrinhos, e em especial a pessoa que mais amo nessa vida e que sempre acreditou em mim, minha mãe Joana.

RESUMO GERAL

Aloysia triphylla (L'Hérit) Britton é planta medicinal e aromática. Objetivou-se desenvolver um protocolo de micropropagação de *A. triphylla*, visando avaliar condições experimentais para o crescimento vegetativo e produção de constituintes voláteis *in vitro*. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira etapa avaliou-se: 1) diferentes fontes de explantes (segmentos apicais e nodais), inoculados nos meios de cultura MS, B5 e WPM; 2) orientação de inoculação (horizontal e vertical); 3) melhor meio de cultura para o subcultivo (MS, WPM e B5); 4) concentrações de nitrogênio do meio MS e 5) constituintes voláteis das plântulas *in vitro* e *ex vitro*. Independente do meio de cultura, para o estabelecimento, o primeiro e segundo segmentos nodais apresentaram maiores altura e número de brotos. Na fase de subcultivo, a inoculação no meio WPM proporcionou melhor desenvolvimento de brotos e produção de citral. Concentrações de nitrogênio acima de 60 mM afetaram a síntese *in vitro* de constituintes voláteis e o crescimento vegetativo das plântulas. Folhas de *A. triphylla* apresentaram diferenças quantitativas nos teores de limoneno e citral em plântulas cultivadas *in vitro*, em campo e em casa de vegetação. Portanto, para o estabelecimento *in vitro* de *A. triphylla* indica-se o uso do primeiro e segundo segmentos nodais inoculados no meio WPM. Na fase de subcultivo, os explantes devem ser inoculados na posição horizontal no meio WPM. A concentração de 15 mM de nitrogênio favorece o crescimento e a produção de constituintes voláteis *in vitro*. O substrato comercial Plantmax[®] proporcionou 100% de sobrevivência das mudas da fase de aclimatização. Na segunda etapa avaliaram-se a influência de fatores químicos como: diferentes concentrações das citocininas BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) e TDZ (0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L⁻¹) e doses de sacarose (5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹). E fatores físicos como: intensidades luminosas de 13, 28, 47 e 69 μmol m⁻² s⁻¹. Observou-se efeito negativo das citocininas no crescimento e enraizamento das plântulas, no entanto as dosagens mínimas aumentaram o teor de citral nas plântulas. A concentração de 40 g L⁻¹ de sacarose proporciona melhor crescimento e produção *in vitro* de citral. Plântulas cultivadas na intensidade luminosa de 69 μmol m⁻² s⁻¹ acumularam maior biomassa da parte aérea e raízes. Portanto, para o cultivo *in vitro* de *A. triphylla* recomenda-se a inoculação de explantes em meio de cultura WPM suplementado com 40 g L⁻¹ de sacarose e mantidos na sala de crescimento sob intensidade luminosa de 69 μmol m⁻² s⁻¹ para melhor crescimento e produção *in vitro* de limoneno e citral. Não há necessidade de suplementação de BAP ou TDZ para a proliferação de brotos.

Palavras-chave: planta medicinal, constituintes voláteis, *in vitro*, meio de cultura.

ABSTRACT

Aloysia triphylla (L'Herit) Britton is a aromatic and medicinal plant. The objective was to develop micropropagation method of *A. triphylla* and volatile production *in vitro*. The study was conducted in two stages. In the first stage was evaluated: 1) different sources of explants (apical and nodal segments) inoculated on MS, WPM and B5 culture media; 2) explant orientation in culture (horizontal and vertical); 3) best culture medium for subculture (MS, B5 and WPM); 4) nitrogen concentrations of MS medium and 5) volatile constituents *in vitro* and *ex vitro* of plants. Regardless of the medium, to establishing the first and second nodal segments showed greater height and shoot number. In subculture phase WPM medium enhanced shoot growth and citral production. Nitrogen concentrations above 60 mM affected synthesis of volatile constituent and vegetative growth. Leaves of *A. triphylla* showed quantitative differences of limonene and citral in plants cultivated *in vitro*, field and greenhouse. Therefore, for explant establishment of *A. triphylla* indicates the use of the first and second nodal segment cultured on WPM medium. Subculture phase the explants must be inoculated in horizontal position on WPM. The concentration of 15mM nitrogen was suitable for shoot growth and volatile production *in vitro*. The substrate Plantmax[®] provided 100% survival of plants in acclimatization phase. In the second stage was evaluated the influence of chemical factors such: concentrations of cytokinins BAP (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg L⁻¹), TDZ (0; 0.125; 0.250; 0.375; 0.5 mg L⁻¹) and sucrose levels (5, 10, 20, 30 and 40 g L⁻¹). And physical factor such: light intensities of 13, 28, 47 and 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. It was observed negative effect of cytokinins on growth and rooting, however low dosages increased citral content in plantlets. The concentration of 40 g L⁻¹ sucrose was found suitable for growth and citral production *in vitro*. Light intensity of 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ accumulated more shoot and root biomass. Therefore, for *in vitro* culture of *A. triphylla* recommend inoculation of explants in WPM medium supplemented with 40 g L⁻¹ sucrose with light intensity of 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for better growth and citral and limone production *in vitro*. No need for supplementation of BAP or TDZ for shoot proliferation.

Keywords: medicinal plant, volatile constituents, *in vitro*, culture medium.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 A- Planta de *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton. B- Detalhe da folha de *Aloysia triphylla*. Espécie pertencente ao horto de Plantas Medicinal do DAG/UFLA, Lavras, 2013..... 19
- Figura 2 Constituintes químicos majoritários do óleo essencial de *A. triphylla*: citral [neral (1) e geranial (2)], limoneno (3), 1,8-cineol (4), geraniol (5), β -cariofileno (6), espatulenol (7), 6-metil-5-hepten-2-ona (8). Fonte: ADAMS (2007)..... 24
- ARTIGO 1
- Figura 1 Plântulas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro*. A- segmento apical. B- segmentos nodais. C1- Segmento nodal com duas gemas inoculadas na horizontal e vertical. C2- Segmento nodal com uma gema inoculadas na horizontal e vertical. D- Efeito de diferentes..... 49
- Figura 2 Cromatogramas totais de íons obtidos da fração volátil de folhas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro* nas concentrações de 15 mM , 30 mM, 60 mM e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013..... 65
- ARTIGO 2
- Figura 1 plântulas de *Aloysia triphylla* cultivadas *in vitro* em diferentes: A- concentrações de TDZ. B- BAP. C- níveis de sacarose. D- intensidades luminosas..... 83

LISTA DE GRÁFICOS

ARTIGO 1

Gráfico 1	Número de brotos de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	57
Gráfico 2	Comprimento (cm) de brotos de <i>A.triphylla</i> , cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	58
Gráfico 3	Comprimento (mm) de folha de brotos de <i>A.triphylla</i> , cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	59
Gráfico 4	Largura (mm) de folha de brotos de <i>A.triphylla</i> , cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	59
Gráfico 5	Biomassa seca da parte aérea (mg) de brotos de <i>A.triphylla</i> , cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	60
Gráfico 6	Número de brotos de <i>A.triphylla</i> , cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	61
Gráfico 7	Comprimento da raiz principal de brotos de <i>A.triphylla</i> , cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	61
Gráfico 8	Biomassa seca da raiz (mg) de brotos de <i>A.triphylla</i> , cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	62

Gráfico 9	Comparação do teor de constituintes voláteis majoritários em folhas de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio (5, 30, 60 e 120 mM). UFLA, Lavras, 2013.....	64
ARTIGO 2		
Gráfico 1	Número de botos de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	84
Gráfico 2	Número de botos de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; ; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	85
Gráfico 3	Porcentagem de hiperidricidade em botos de e <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	86
Gráfico 4	Altura de brotos (cm) de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	87
Gráfico 5	Altura de brotos (cm) de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	87
Gráfico 6	Biomassa seca da parte aérea de plântulas de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	88
Gráfico 7	Biomassa seca da parte aérea de plântulas de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	89
Gráfico 8	Necrose em botos de e <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes	

	concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	90
Gráfico 9	Necrose em botos de e <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F. Dados transformados em $\sqrt{Y + 0,5}$. A tabela demonstra a correspondência entre os valores transformados e observados.....	90
Gráfico 10	Necrose em botos de e <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F. A tabela demonstra a correspondência entre os valores transformados e observados.....	91
Gráfico 11	Necrose em botos de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F. A tabela demonstra a correspondência entre os valores transformados e observados.....	92
Gráfico 12	Biomassa seca de raízes de plântulas de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013.* Significativo pelo teste F.....	93
Gráfico 13	Biomassa seca de raízes de plântulas de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F. A tabela demonstra a correspondência entre os valores transformados e observados.....	93
Gráfico 14	Porcentagem de hiperidricidade em brotos de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	97
Gráfico 15	Número de brotações de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. Significativo em nível de 5% pelo teste F.....	98

Gráfico 16	Altura da maior brotação de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	99
Gráfico 17	Biomassa seca de plântulas de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	100
Gráfico 18	Número de raízes em plântulas de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	101
Gráfico 19	Comprimento da raiz principal de plântulas de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.....	102
Gráfico 20	Biomassa seca de raízes de plântulas de <i>A.triphylla</i> cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L ⁻¹ . UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F. A tabela demonstra a correspondência entre os valores transformados e observados.....	102

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	Comprimento e número de brotos de segmentos nodais coletados em diferentes posições dos ramos caulinares no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>A. triphylla</i> . UFLA, Lavras, 2013.....	49
Tabela 2	Constituição química de plântulas de <i>A. triphylla</i> no estabelecimento <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM). UFLA, Lavras, 2013.....	50
Tabela 3	Número de brotos (NB), número de nós (NN) e comprimento da maior raiz (CRP-cm) de <i>A. triphylla</i> com 30 dias de cultivo, em função da orientação do explante. UFLA, Lavras, 2013.....	52
Tabela 4	Altura do maior broto (AMB-cm), biomassa seca da parte aérea (BSPA - mg) e da raiz (BSR - mg) de <i>A. triphylla</i> com 30 dias de cultivo, em função da orientação do explante e número de gemas inoculadas (G). UFLA, Lavras, 2013.....	53
Tabela 5	Número de broto (NB), altura do maior broto (AMB-cm), comprimento da raiz (CR-cm), biomassa seca da parte aérea (BSPA) e da raiz (BSR) e porcentagem de hiperidricidade (H) em brotações de <i>A. triphylla</i> com 30 dias de cultivo, em função de diferentes meios de cultura. UFLA, Lavras, 2013.....	54
Tabela 6	Comparação da constituição química de plântulas de <i>A. triphylla</i> cultivadas <i>in vitro</i> (30 dias), a partir de explantes com duas gemas inoculados na orientação horizontal, em diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM) . UFLA, Lavras, 2013.....	56
Tabela 7	Constituição química de plântulas de <i>A. triphylla</i> cultivadas <i>in vitro</i> (30 dias), a partir de explantes inoculados em meio MS com diferentes concentrações de nitrogênio (15, 30, 60 e 120 Mm). UFLA, Lavras, 2013.....	63

Tabela 8	Comparação da constituição química de plantas de <i>A. triphylla</i> cultivadas em campo, em casa de vegetação e <i>in vitro</i> (meio WPM). UFLA, Lavras, 2013.....	67
ARTIGO 2		
Tabela 1	Constituição química de plântulas de <i>A. triphylla</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de TDZ (0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L ⁻¹). UFLA, Lavras, 2013.....	94
Tabela 2	química de plântulas de <i>A. triphylla</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L ⁻¹). UFLA, Lavras, 2013.....	95
Tabela 3	Constituição química de plântulas de <i>A. triphylla</i> normais (N) e hiperidrificada (H) cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de sacarose (5; 10, 20, 30 e 40 g L ⁻¹).....	104
Tabela 4	Número de broto (NB), tamanho do maior broto (TMB-cm), número de folhas (NF) e biomassa seca da parte aérea (BSPA) em brotações de <i>A. triphylla</i> com 45 dias de cultivo, exposta a diferentes intensidades luminosas. UFLA, Lavras, 2013.....	105
Tabela 5	Número de raiz (NR), comprimento da raiz principal (CRP-cm) e biomassa seca da raiz (BSR) de brotações de <i>A. triphylla</i> com 45 dias de cultivo, exposta a diferentes intensidades luminosas. UFLA, Lavras, 2013.....	106
Tabela 6	Constituição química de plântulas de <i>A. triphylla</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes intensidades de luz (13,14; 27,79; 47,03 e 69,0 μmol m ⁻² .s ⁻¹). UFLA, Lavras, 2013.....	108

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE		
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Aspectos gerais da espécie.....	18
2.2	Atividades biológicas e usos populares de <i>Aloysia triphylla</i>	20
2.3	Composição química volátil de <i>Aloysia triphylla</i>	22
2.4	Micropropagação.....	25
2.5	Produção de constituintes voláteis <i>in vitro</i>	28
	REFERÊNCIAS.....	30
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS		
	ARTIGO 1 PROPAGAÇÃO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS <i>IN VITRO</i> DE CIDRÃO.....	38
1	INTRODUÇÃO.....	41
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1	Efeito da posição dos explantes iniciais em diferentes meios de cultura no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>A. Triphylla</i>	43
2.2	Orientação de inoculação do segmento nodal e números de gemas no crescimento <i>in vitro</i> de <i>A. Triphylla</i>	44
2.3	Efeitos de diferentes tipos de meios de cultura no crescimento <i>in vitro</i> de <i>A. triphylla</i>	44
2.4	Efeito do nitrogênio no teor dos constituintes voláteis em folhas de <i>A. triphylla</i>	45
2.5	Aclimatização.....	45
2.6	Análise estatística.....	46
2.7	Análise da fração volátil por HS-CG/EM.....	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1	Efeito de diferentes fontes de explantes e meios de cultura no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>A. Triphylla</i>	48
3.2	Orientação de inoculação do segmento nodal e números de gemas no crescimento <i>in vitro</i> de <i>A. Triphylla</i>	51
3.3	Efeitos de diferentes tipos de meios de cultura no crescimento <i>in vitro</i> de <i>A. Triphylla</i>	53
3.4	Efeito do nitrogênio no desenvolvimento de brotos e teor dos constituintes voláteis em folhas de <i>A. triphylla</i>	57
3.5	Aclimatização.....	66
3.6	CONCLUSÃO.....	68

	REFERÊNCIAS.....	69
	ARTIGO 2 EFEITO DE FATORES QUÍMICOS E FÍSICOS NO CULTIVO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS <i>IN VITRO</i> DE <i>Aloysia triphylla</i> (L'HÉRIT) BRITTON.....	74
1	INTRODUÇÃO.....	77
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1	Efeito de citocininas no cultivo e produção de constituintes voláteis <i>in vitro</i> de <i>A. triphylla</i>.....	79
2.2	Efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento e produção de constituintes voláteis <i>in vitro</i> de <i>A. triphylla</i>.....	80
2.3	Avaliação das condições de luminosidade na regeneração de segmentos nodais de <i>A. triphylla</i>.....	80
2.4	Análises estatísticas.....	81
2.5	Análise da fração volátil por HS-CG/EM.....	81
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
3.1	Efeito de citocininas no cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. triphylla</i>.....	83
3.2	Efeito de diferentes concentrações de sacarose na redução da hiperidricidade e desenvolvimento de plântulas de <i>A. triphylla</i>.....	96
3.3	Avaliação das condições de luminosidade na regeneração de segmentos nodais de <i>A. triphylla</i>.....	105
4	CONCLUSÃO.....	109
	REFERÊNCIAS.....	110

1-INTRODUÇÃO GERAL

Há décadas, as plantas medicinais eram utilizadas apenas por comunidades rurais e tribais. Recentemente, a procura por medicamentos tradicionais tem aumentado consideravelmente. O crescente uso das plantas medicinais pode ser atribuído ao alto custo de fármacos sintéticos e, para pesquisadores surge como uma perspectiva de novas drogas derivadas de planta (KADIR et al., 2012; KUMAR et al., 2013).

Aloysia triphylla (L'Hérit) Britton, popularmente conhecida como cidrão, é uma planta aromática e medicinal, cujas folhas acumulam óleo essencial rico em neral e geranial, além da presença de limoneno, cineol, geraniol, β -cariofileno e espatulenol, aos quais se devem às propriedades anti-hipertensiva, sedativa, digestiva e diurética da espécie.

A produção de metabólicos secundários por plantas em condições naturais é limitada por diversos fatores, tais como condições ambientais, ecológicas e climáticas. O cultivo *in vitro* de plantas tem sido uma técnica eficiente na produção de metabólicos secundários, proporcionando rendimento e composição química mais homogênea do óleo essencial, além de promover plantas geneticamente idênticas, em curto período de tempo, livre de infecções e variações sazonais (REIS et al., 2009; SHEKHAWAT; SHEKHAWAT, 2010; ZUZARTE et al., 2010). Neste sentido, o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação, assim como o estudo de parâmetro que podem influenciar a organogênese, as condições de multiplicação e aclimatização das plantas, se faz necessário para maximizar a produção de biomassa e de óleo essencial.

Na literatura não foram encontrados relatos sobre a propagação e produção de constituintes voláteis *in vitro* da espécie. Portanto, objetivou-se desenvolver um protocolo de micropropagação de *A. triphylla*, visando avaliar

condições experimentais para o crescimento vegetativo e produção de constituintes voláteis *in vitro*.

2-REFERENCIAL TEÓRICO

2.1-Aspectos gerais da espécie

Aloysia triphylla (L'Hérit) Britton, pertence à família Verbenaceae, é uma planta nativa da América do sul, originária do Peru, e popularmente conhecida como cidrão ou erva-luísia (DÍAZ et al., 2007; RAGONE et al., 2007). Suas sinonímias botânicas são *Lippia citriodora* Kunth, *Lippia triphylla* (L'Her.) Kuntze, *Aloysia citriodora* Palau, *Verbena triphylla* L'Héritier, *Zapania citriodora* Lam., *Aloysia sleumeri* Mold (GATTUSO et al., 2008).

O gênero *Lippia* é representado por cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores. A maioria delas é amplamente utilizada na medicina tradicional (ARGYROPOULOU et al., 2007).

Trata-se de um arbusto perene, com caule ereto e ramificado, que pode alcançar mais de 1,5 m de altura. Suas folhas são simples, de 8-12 cm de comprimento, consistência cartácea, glabras em ambas as faces, com bordos serrados no ápice, reunidas em vértice de três, e exalam um intenso aroma de limão. Na superfície foliar encontram-se tricomas capitados e peltados, responsáveis pela síntese do óleo essencial da espécie. Suas flores são pequenas, de coloração branca ou levemente rosada, e disposta em panícula (GOMES et al., 2009; LORENZI et al., 2002; ROJAS et al., 2012).

Suas folhas retem muito bem seu aroma citral, mesmo depois da secagem, tornando-se um componente indispensável nos “potpourris” muito empregados para aromatizar residências na Europa. Além do seu uso como perfume, o citral também é empregado na síntese de ionona (perfume de violeta), beta-caroteno e vitamina A (LORENZI et al., 2002).



Figura 1. A- Planta de *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton. B- Detalhe da folha de *Aloysia triphylla*. Espécie pertencente ao horto de Plantas Medicinal do DAG/UFLA, Lavras, 2013.

A. triphylla é uma planta medicinal, cultivada no sul do Brasil e adaptável a climas temperados (DÍAZ et al., 2007). Alta luminosidade e uma umidade relativa do ar moderada, pode ser favorável para a síntese e acumulação de óleo essencial. É pouco resistente a geadas, sendo cultivada em diversos tipos de solo, desde que não sejam excessivamente salinos. É uma planta termófila, podendo se desenvolver em altas altitudes (EL-HAWARY et al., 2012; MOURÃO, 2012).

A semente é pequena, e as condições ambientais do Brasil não produzem sementes viáveis, sendo sua propagação realizada por estaquia. No entanto, isso só é possível durante a primavera e o verão, época que as folhas estão presentes na planta, pois no final do inverno as folhas caem e a planta entra em dormência (EL-HAWARY et al., 2012). Utiliza-se ramos com 7 a 10 cm de comprimento com 1 a 2 nós, devendo-se retirar as folhas. As plantas devem ser podadas durante o ano, para o crescimento de ramos laterais. A espécie é sensível a oídes, podridões de raízes e a mosca branca. A colheita deve ser realizada em pleno desenvolvimento vegetativo e antes da floração, cuja época

ocorre maior produção de biomassa e de teor de princípios ativos (MOURÃO, 2012).

Em vista da heterogeneidade das amostras comerciais da espécie, a produção agrícola têm-se concentrado em aperfeiçoar a produção de biomassa e rendimento do óleo essencial, para atender os padrões de exigência do mercado (GIL et al., 2007).

2.2-Atividades biológicas e usos populares de *Aloysia triphylla*

A. triphylla é empregada na culinária, especialmente para a produção de licores, sendo também empregada como planta ornamental e na indústria de perfumes (GOMES et al., 2009). Na aromaterapia, é empregada no tratamento do sistema nervoso e para acnes (BRANT et al., 2009).

Levantamentos etnofarmacológicos apontam o uso de *A. triphylla* na medicina popular em diversos países, sendo empregada em toda a América do Sul, principalmente na forma de infusão e decocção, como antiespasmódico, sedativo, expectorante e digestivo. Na Bolívia também é utilizada como anti-hipertensivo e no Equador para alívio de dores de cabeça, estados febris e diuréticos, sendo também utilizada, tradicionalmente, na Ásia para tratar espasmos gastrointestinais e resfriado (ROJAS et al., 2012); em Porto Alegre, Brasil, seu uso é comum para insônia e ansiedade (CARNAT et al., 1999).

Os efeitos espamolíticos do extrato aquoso liofilizado de *A. triphylla* (EAL) foram estudados por RAGONE et al. (2007) em duodeno isolado de rato. A inibição não competitiva do influxo de Ca^+ pode explicar o efeito espamolítico de *A. triphylla*. Outro mecanismo sugerido foi o da ativação dos canais de K^+ , o qual pode ser consequência do aumento de GMPc, o que leva a hiperpolarização e relaxamento. Dois flavonóides foram identificados por CLAE nos EAL: vitexina e isovitexina, sendo que a vitexina contribuiu para a inibição

não competitividade da acetilcolina, mas não para o influxo de Ca^{+} , sugerindo que outros constituintes podem estar relacionados ao efeito espasmolítico de *A. triphylla* (RAGONE et al., 2007). O efeito inibitório de contrações uterinas do extrato hexânico de *A. triphylla* e citral também foi demonstrado por PONCE-MONTER et al. (2010) em isolados de útero de ratas tratadas com estrogênio. Ensaio farmacológico realizado em camundongos albinos machos (25-30 g) utilizando 50 mg/Kg de peso corporal de extratos aquoso e alcoólico de *A. triphylla* demonstraram efeitos analgésico, antiinflamatório, antipirético e antioxidante diferenciados. O extrato alcoólico demonstrou maior atividade antiinflamatória, analgésica e antioxidante, enquanto o extrato aquoso demonstrou maior atividade antipirética (EL-HAWARY et al., 2012).

A atividade antiinflamatória do extrato hexânico de *A. triphylla* e citral também foi demonstrada por PONCE-MONTER et al. (2010), em ensaios *in vitro* e *in vivo* com ratos utilizando extratos hexânicos de folhas de *A. triphylla*. A administração oral do extrato (100-800 mg/Kg) e citral (100-800 mg/Kg) demonstraram atividade anti-inflamatória, sendo que na dose mais alta não produziu injúria gástrica.

Efeitos sedativos e cardiovasculares em ratos foram observados por RAGONE et al. (2010), em ensaios *in vitro* e *in vivo*, com uso de extratos aquosos de folhas de *A. triphylla*. O extrato (1 mg/kg + diazepam) produziu um importante efeito sedativo, por um mecanismo do tipo benzodiazepina, e *in vivo* não alterou a frequência cardíaca, mas *in vitro*, induziu um inotropismo negativo cardíaco, o que pode contribuir para a hipotensão transitória, e dá suporte ao uso de *A. triphylla* como coadjuvante no tratamento de problemas cardíacos e ansiedade.

Estudos *in vivo* indicaram que o do óleo essencial de *A. triphylla* possui efeito anti-*Trypanosoma* em ratos. O óleo essencial de cidrão reduziu significativamente 85,4% do pico de parasitemia com a dose de 250 mg Kg⁻¹,

além de reduzir o número de amastigotas e infiltratos inflamatórios no coração (ROJAS et al., 2012).

Estudos *in vitro* com camarões sub-adultos (*Litopenaeus vannamei*, Crustacea, Penaeidae) demonstraram que concentrações acima de 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de *A. triphylla* induziram anestesia e melhoraram a capacidade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio após 6 h em camarões (PARODI et al., 2012).

O óleo essencial de *A. triphylla* também demonstrou promissores efeitos para o tratamento da candidíase. A atividade antifúngica foi demonstrada contra leveduras: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, as quais são resistentes ao fluconazol (150 mg mL^{-1}). Os valores da faixa da concentração inibitória mínima (CIM) foi de 35 a 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e da concentração fungicida mínima (CFM) de 1842 a 2300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O tempo de morte na CFM contra *C. albicans* (3×10^5 UFC mL^{-1}) foi de 140 min (OLIVA et al., 2011).

2.3-Composição química volátil de *Aloysia triphylla*

GOMES et al. (2009) observaram que o óleo essencial de *A. triphylla* pode sofrer influência da intensidade luminosa, pois plantas cultivadas a pleno sol tiveram maior produção de óleo essencial quando comparadas àquelas que receberam sombreamento com tela. Temperaturas elevadas também diminuí o teor médio do óleo essencial de *A. triphylla*. BRANT et al. (2009), observaram que nas temperaturas mais baixas do dia os teores de óleo essencial foram superiores ao material coletado nas horas mais quente do dia .

O gênero *Lippia* possui uma rica diversidade genética, o que permite a síntese de uma variedade de constituintes químicos em plantas cultivadas em diferentes partes do mundo (ARGYROPOULOU et al., 2007). Variações

intraespecíficas no rendimento e composição química do óleo essencial de folhas e flores foram observadas em acessos de *A. triphylla* coletadas em seis diferentes regiões da Argentina (GIL et al., 2007). O constituinte químico majoritário do óleo essencial de *A. triphylla* é o citral [neral (1) e geranial (2)] e o limoneno (3), além de conter a presença de 1,8-cineol (4), geraniol (5), β -cariofileno (6), espatulenol (7), dentre outros constituintes (GIL et al., 2007), como o 6-metil-5-hepten-2-ona (8), cujas fórmulas estruturais estão demonstradas na figura 2. Análises de componentes principais (PCA) que consideraram as diferenças entre a ocorrência e a porcentagem relativa dos constituintes químicos nos acessos permitiram a esses autores identificarem três quimiotipos. O quimiotipo 1 foi caracterizado pela presença de 1,8-cineol, baixo teor de citral (neral e geranial) e alta porcentagem de α -pineno e *ar*-curcumeno; o quimiotipo 2 por alta porcentagem de sabineno, *cis*-tujona e citronelal, porém baixo teor de limoneno e o quimiotipo 3 foi considerado com perfil químico mais representativo de *A. triphylla*, com baixo teor ou ausência de 1,8-cineol, citronelal e *cis*-tujona (GIL et al., 2007).

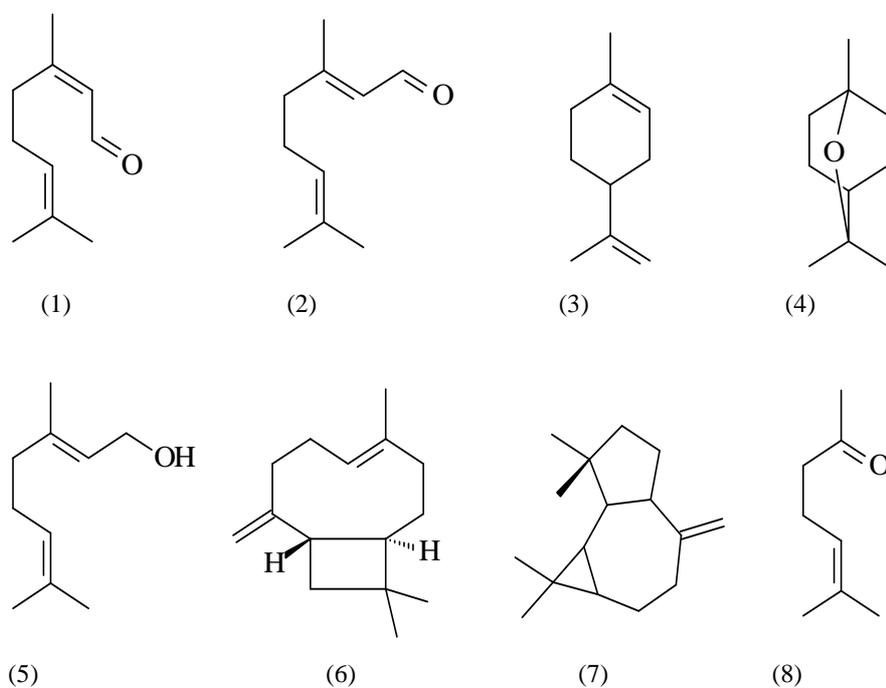


Figura 2. Constituintes químicos majoritários do óleo essencial de *A. triphylla*: citral [neral (1) e geranial (2)], limoneno (3), 1,8-cineol (4), geraniol (5), β -cariofileno (6), e spatulenol (7), 6-metil-5-hepten-2-ona (8). Fonte: ADAMS (2007).

DÍAZ et al. (2007) também observaram variabilidade química no óleo essencial de *A. triphylla* em folhas coletadas na Argentina, Marrocos, Turquia e Colômbia. Os principais constituintes no acesso da Argentina foram mircenona (37%) e α -tujona (17%); no Marrocos, 1,8-cineol (12%); na Turquia, limoneno (19%), geranial (19%) e neral (8%) e na Colômbia, neral (22%) e geranial (36%). Estes mesmos autores também encontraram diferenças no teor e composição química do óleo essencial de *A. triphylla* cultivadas em duas regiões da Colômbia, Bolívar e Cundinamarca, detectando 21 e 16 constituintes nos óleos, respectivamente, porém, em ambos o citral foi o constituinte majoritário.

Similar a outros estudos, o óleo essencial das folhas de *A. triphylla* cultivadas em Botucatu (Brasil) apresentaram como principais constituintes geranial (29,54 %), neral (27,01 %), limoneno (15,93 %), acetato de geranila (4,0 %) e geraniol (3,96 %). Essa espécie possui altos teores de monoterpênicos e baixos de sesquiterpênicos (FIGUEIREDO et al., 2004). Já na infusão das folhas, CARNAT et al. (1999) identificaram de citral (1,2) com um teor de 77%, espatulenol (7) (3,95%), 1,8-cineol (4) (3,44%), limoneno (3) (1,34%), β -cariofileno (6) (0,73%) e geraniol (5) (0,40%).

Em análises empregando microextração por fase sólida (*Headspace-SPME*), KIM e LEE (2004) identificaram a presença de 14 constituintes em *A. triphylla*. Geranial e neral foram os componentes majoritários e α -pineno, β -pineno, β -cariofileno e curcumeno como minoritários. Análises enantioméricas identificaram a presença de α -pineno, limoneno e cânfora nas formas (+), (-) e (-), respectivamente.

2.4-Micropropagação

A validação científica e comercialização de plantas medicinais requerem um sistema eficiente de produção vegetal e que, preferencialmente, seja livre de variações ambientais, sazonais e somáticas e de infecções por fungos e bactérias que afetam as propriedades biológicas, além de depreciar o valor econômico das espécies (GOVINDARAJ et al., 2008).

A micropropagação é uma das técnicas mais efetivas de propagação em larga escala de espécimes que apresentem um genótipo de interesse, pois permite a produção de plantas geneticamente idênticas, em curto período de tempo, livre de infecções e variações sazonais e, em se tratando de plantas aromáticas proporcionam rendimento e composição química do óleo essencial uniformes (ZUZARTE et al., 2010; REIS et al., 2009).

No entanto, para se desenvolver um protocolo de micropropagação de uma espécie, é necessário estabelecer a plântula *in vitro* e avaliar parâmetros que influenciam a organogênese, tais como o tipo de meio e a origem do explante (COSTA et al., 2007; JESUS et al., 2010; SUZUKI, 2010). Em vista disso, procura-se utilizar explante que melhor expresse a capacidade de totipotência das células vegetais e o meio nutritivo que mais se ajuste a espécie em estudo (GOLLE et al., 2012). *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., foi estabelecida *in vitro* com o ápice caulinar inoculado ao meio de cultura MS (BASSAN et al., 2006); já para *Eugenia involucrata* utilizou-se segmentos nodais inoculados em meio ½ MS ou WPM (GOLLE et al., 2012).

A regeneração e crescimento de brotos a partir de gemas axilares são intensificados com adição de citocininas no meio de cultura (FLORES et al., 2009), e em plantas aromáticas pode favorecer a produção de biomassa e de óleos essenciais (ASMAR et al., 2011). O tidiazuron (TDZ) vem sendo muito utilizado na micropropagação como regulador de crescimento de espécies lenhosas, portanto sua atividade citocínica é verificada quando adicionados em pequenas concentrações no meio de cultura (GRAÇA et al., 2001). No entanto, o BAP (6-benzilaminopurina) tem sido a citocinina mais utilizada na micropropagação (ASMAR et al., 2011). Em *Pfaffia glomerata*, o TDZ promoveu maior número de brotação que o BAP (FLORES et al., 2009), enquanto que em *Malus domestica Borkh* e *Eucalyptus dunnii*, o BAP induziu maior número de brotos em relação ao TDZ (GRAÇA et al., 2001; MORALES et al., 1999).

O nitrogênio é um macronutriente muito importante, estando associado com o controle de crescimento, diferenciação e morfogênese. No meio nutritivo pode ser fornecido na forma de nitrato, amônio e aminoácidos (WERNER et al., 2010). O meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contém dois sais de nitrogênio, o nitrato de amônio e potássio, totalizando uma concentração de

60 mM, considerado um nível elevado para muitas espécies lenhosas (VINTERHALTER et al., 2007). Em *Vanilla planifolia* Jacks., 15 mM de nitrogênio no meio MS favoreceu um maior número de raízes, altura de brotos e matéria fresca (MORAES et al., 2012); e *Salvia stenophylla* Burch. ex Benth. apresentou melhores resultados para estas características quando aumentou de 2,5 vezes a dosagem padrão em molar (MUSARURWA et al., 2012).

Com relação à fixação de carbono, e condições de cultivo *in vitro*, os tecidos fotossintetizam em taxas muito baixas, portanto necessitam de uma fonte exógena de carboidratos, que devem ser adicionados ao meio de cultura em níveis ótimos, pois concentrações inadequadas podem interferir negativamente na sobrevivência e no desenvolvimento das plantas. A sacarose é a principal fonte de carbono no cultivo *in vitro*, provavelmente por ser o hidrato de carbono mais comum na seiva do floema de muitas plantas (GAUCHAN, 2012; NICOLOSO et al., 2003; PIVETTA et al., 2010; SCHMILDT et al., 2007). Em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, a sacarose foi a melhor fonte de carbono para o desenvolvimento *in vitro* (NICOLOSO et al., 2003), para *Fragaria vesca* a presença de sacarose no meio de cultivo foi fundamental para o enraizamento *in vitro* (CALVETE et al., 2002), e em *Caularthron bicornutum* o nível ótimo de sacarose para o desenvolvimento da parte aérea e raiz foi estimada entre as doses de 13 a 29 g L⁻¹ (PIVETTA et al., 2010).

Algumas desordens fisiológicas podem ocorrer durante a micropropagação, como a vitrificação ou hiperidricidade, o qual se caracteriza como um fenômeno que afeta o cultivo *in vitro*, deixando brotos com aspecto translúcido, inchados, baixa porcentagem de massa seca, suas folhas apresentam coloração verde claro, alongadas, túrgidas e frágeis. Esse fenômeno ocorre como consequência de vários fatores como elevada umidade, excesso de fatores nutricionais (mineral e carboidratos), elevados níveis de reguladores de

crescimento e baixa intensidade de luz (ABREU et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2012).

Por fim, a luz interfere na fisiologia e morfologia da planta, e sua adaptação a diferentes intensidades luminosas pode ser essencial para determinar seu potencial de crescimento. A qualidade da luz na micropropagação é fundamental para multiplicação, enraizamento e crescimento da planta *in vitro* (BRAGA et al., 2009; PASA et al., 2012; RESENDE et al., 2011).

2.5-Produção de constituintes voláteis *in vitro*

A produção de metabólicos secundários por plantas em condições naturais é limitada por diversos fatores, tais como condições ambientais, ecológicas e climáticas. Sendo assim, a propagação de plantas *in vitro* vem surgindo com alternativa para produção desses compostos (SHEKHAWAT e SHEKHAWAT, 2010).

Al-Qudah et al. (2011), comparando o teor de óleo essencial de *Teucrium polium* L. cultivada *in vivo* e *in vitro*, verificou uma produção de 0,55% e 0,40%, respectivamente, e que o β -cariofileno, constituinte majoritário da espécie, foi encontrado em teor mais elevado *in vitro* do que amostras de plantas cultivadas em campo, concluindo a possibilidade de produção *in vitro* do óleo essencial da espécie.

Em *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav., verificou-se que em termos qualitativos não ocorreram diferenças entre plantas micropropagadas daquelas cultivadas em campo, no entanto quantitativamente observou-se diferenças entre os dois métodos de propagação, no entanto os constituintes considerados majoritários em campo foram também detectados em teores significativos no

cultivo *in vitro*, mostrando que a micropropagação é uma técnica eficiente para produção de constituintes voláteis (ZUZARTE et al., 2010).

Na micropropagação de *Salvia officinalis* L. detectou-se os três constituintes mais comuns no óleo essencial da espécie: *cis*-tujona, *trans*-tujona e cânfora, com teores de 21,18%-13,14%, 7,10%-13,68% e 7,10 %-13,68 %, respectivamente, para plantas cultivadas *in vitro* e planta matriz, além de diferenças quantitativas, verificou-se também diferenças qualitativas dos constituintes do óleo essencial (AVATO et al., 2005).

ARRIGONI-BLANK et al. (2011), comparando o teor de óleo essencial de quatro genótipos de *Mentha arvensis* L. propagadas de forma convencional e micropropagadas, verificaram que os constituintes majoritários encontrados pelos dois métodos foram os mesmos, e que a pulegona, composto com diversas propriedades biológicas, foi encontrado com aumento de 7% nas plantas micropropagadas.

Comparações feitas no teor de óleo essencial de *Melissa officinalis* Lam. cultivadas *ex vivo* e *in vivo*, com ou sem adição de reguladores de crescimento, mostrou que em plantas micropropagadas no meio de cultura MS suplementado com o regulador de crescimento influenciaram positivamente o teor dos constituintes majoritários, principalmente o teor de geraniol, composto de grande valor comercial na indústria de aromas (SILVA et al., 2005).

REFERÊNCIAS

ABREU, I. N. de; PINTO, J. E. B. P.; BETOLUCCI, S. K. V. et al. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 33, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 2003.

AL-QUDAH, T. S.; SHIBLI, R. A.; ALALI, F. Q. *In vitro* propagation and secondary metabolites production in wild germander (*Teucrium polium* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 4, p. 496-505, Aug. 2011.

ARGYROPOULOU, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; FASSEAS, C.; POLISSIOU, M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 831-837, Dec. 2007.

ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; COSTA, ANDRÉA SANTOS; FONSECA, V. O.; BARRETO, P.; BLANK, ARIE FITZGERALD. Micropropagação, aclimatização, teor e composição química do óleo essencial de genótipos de hortelã japonesa. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 175-184, jan./mar. 2011.

ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, p. 533-538, 2011. Especial.

AVATO, P.; FORTUNATO, I. M.; RUTA, C.; D'ELIA, R. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. **Plant Science**, Columbus, v. 169, n. 1, p. 29-36, Jul. 2005.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, S. C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, out./dez. 2006.

BRAGA, F. T. et al. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, mar./abr. 2009.

BRANT, R. DA S.; BRASIL, J. E. P. P.; KELLY, S. V. B.; SILVA, A. DA; ALBUQUERQUE, C. J. B. Teores do óleo essencial de cidrão [*Aloysia triphylla* (L´ Hérít) Britton (Verbenaceae)] em diferentes horários de colheita e processamentos pós-colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 2065-2068, 2009. Especial.

CALVETE, E. O.; KAMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 20, n. 2, p. 186-191, jun. 2002.

CARNAT, A.; CARNAT, A. P.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 44-49, Feb. 1999.

COSTA, ANDRÉA S.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; BLANK, ARIE F.; MMENDONÇA, A. B. de; AMANCIO, VERÔNICA, F.; LEDO, ANA da S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 68-72, jan./mar. 2007.

DÍAZ, O. L.; DURANG, D. C.; MARTÍNEZ, J. R.; STASHENKO, E. E. Estudio comparativo de la composición química de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* L´ HER BRITTON cultivada en diferentes regiones de columbia. **Scientia et Technica**, v. 13, n. 33, p. 351-353, Mayo 2007.

EL-HAWARY, S. S.; YOUSIF, M. F.; ABDEL MOTAAL, A. A.; ABD-HAMEED, L. M. Bioactivities, phenolic compounds and *in-vitro* propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo, v. 50, n. 1, p. 1-6, June 2012.

FIGUEIREDO, R. O.; STEFANINI, M. B.; MING, L. C.; MARQUES, M. O.; FACANALI, R. Essential oil composition of *Aloysia triphylla* (L´ Herit) Britton

leaves cultivated in Botucatu, São Paulo, Brazil. **Acta Horticulturae (ISHS)**, Botucatu, n. 629, p. 131-134, Jan. 2004.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. . Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng .) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 292-299, 2009.

GATTUSO, S.; GIL, A.; BANDONI, A.; FERRARO, G.; GATTUSO, M. Morpho-histological and quantitative parameters in the characterization of lemon verbena (*Aloysia citriodora* palau) from Argentina. **Statistics**, v. 7, n. 4, p. 190-198, 2008.

GAUCHAN, D. P. Effect of different sugars on shoot regeneration of maize (*Zea mays* L .). **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 8, n. 1, p. 119-124, Feb. 2012.

GIL, A.; BAREN, C. M. van; LEO LIRA, P. M. DI; BANDONI, A. L. Identification of the genotype from the content and composition of the essential oil of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Bueno Aires, v. 55, n. 21, p. 8664-8669, Sept. 2007.

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

GOMES, P. A.; SOUZA, M. F. DE; SOUZA JÚNIOR, I. T. de; CARVALHO JUNIOR, W. G. O.; FIGUEIREDO, L. S. de; MARTINS, E. R. Influência do sombreamento na produção de biomassa , óleo essencial e quantidade de tricomas glandulares em cidrão (*Lippia citriodora* Lam .). **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 4, p. 9-14, dez. 2009.

GOVINDARAJ, S.; KUMARI, B. D. R.; CIONI, P. L.; FLAMINI, G. Mass propagation and essential oil analysis of *Artemisia vulgaris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 3, p. 176-183, Mar. 2008.

GRAÇA, M. E. C.; FILHO, A. N. K.; MEDEIROS, A. C. DE S.; TAVARES, F. R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron , na multiplicação “ *in vitro* ” de brotações de *Eucalyptus Dunnii* Maid . **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 43, p. 107-112, jul./dez. 2001.

JESUS, A. M. S.; CARVALHO, S. P. de; VILLA, F.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M. Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 6, p. 431-436, nov./dez. 2010.

KIM, N.-S.; LEE, D.-S. Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 1-2, p. 96-100, Jan. 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. DE A.; GOMES, O. Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Floral, 2002. p. 512.

MORAES, C. P. de; LEAL, T. de S.; PANOSSO, A. R.; SOUZA, M. C. de. Efeitos da escarificação química e da concentração de nitrogênio sobre a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Orchidaceae□: Vanilloideae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 714-719, jul./set. 2012.

MORALES, C. F. G.; LOMBARDI, S. R. B.; SOARES, P. F.; FORTES, G. R. de L. Efeito do bap e tdz na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv . gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 174-177, set./dez. 1999.

MOURÃO, I. Plantas aromáticas e medicinais com interesse para secagem, produzidas no modo de produção biológico: limonete, erva príncipe, equinácea e hiperição do Gerês. (Parte I). **Hortofruticultura e Floricultura-Agrotec**, Viana do Castelo, p. 32-36, jun. 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

MUSARURWA, H. T.; KOEGELENBERG, L.; MAKUNGA, N. P. Chemical variation in essential oil profiles detected using headspace solid-phase microextraction gas chromatography spectrometry in response to potassium, nitrogen, and water available to micropropagated plants of *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, n. 2, p. 207-220, Sept. 2012.

NICOLOSO, F.; ERIG, A.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, jan./fev. 2003.

OLIVA, M. L.; CAREZZANO, M. E.; GALLUCCI, M. N.; DEMO, M. S. Antimycotic effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 7, p. 1039-1043, July 2011.

PARODI, T. V. et al. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP**, v. 155, n. 3, p. 462-468, Apr. 2012.

PASA, M. da S. et al. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta “xavante”. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, ago. 2012.

PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, I.; FARIA, R. T. de; TAKANE, R. J. Crescimento in vitro de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1897-1902, set. 2010.

PONCE-MONTER, H.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, E.; ORTIZ, M. I.; RAMÍREZ-MONTIEL, M. L.; CRUZ-ELIZALDE, D.; PÉREZ-HERNANDEZ, N.; CARIÑO-CORTEZ, R. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, in vitro and in vivo studies. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 46, n. 6, p. 309-319, Jan. 2010.

RAGONE, M. I.; SELLA, M.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M. G.; CONSOLINI, A. E. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenums. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 258-266, Sept. 2007.

RAGONE, MARÍA I.; SELLA, M.; PASTORE, A.; CONSOLINI, A. E. Sedative and cardiovascular effects of *Aloysia citriodora* Palau, on Mice and Rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, La Plata, v. 29, n. 1, p. 79-86, 2010.

REIS, É. S.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA ROSADO, L. D.; 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**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, maio 2009.

RESENDE, S. V.; CREPALDI, I. C.; PELACANI, C. R.; BRITO, A. L. Influência da luz e substrato na germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de *Calliandra Benth.* (MIMOSOIDEAE - LEGUMINOSAE) endêmicas da chapada diamantina, Bahia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 107-117, jan./fev. 2011.

ROJAS, J.; PALACIOS, O.; RONCEROS, S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones.

Revista Peruana de Medicina Experimentalis y Salud Publica, Lima, v. 29, n. 1, p. 61-68, mar. 2012.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sacarose na fase de enraizamento *in vitro* de mamoeiro “tainung 01”. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2007.

SHEKHAWAT, M. S.; SHEKHAWAT, N. S. Micropropagation of *Arnebia hispidissima* (Lehm). DC. and production of alkannin from callus and cell suspension culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1445-1450, dez. 2010.

SILVA, S. da; SATO, A.; LAGE, C. L. S. et al. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators. **Journal Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 16, n. 6b, p. 1387-1390, 2005.

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V. de; PESCADOR, R.; FERREIRA, D. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, Água Funda, v. 37, n. 4, p. 731-742, dez. 2010.

VASCONCELOS, A. G. V. de; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 837-844, maio 2012.

VINTERHALTER, B.; NINKOVIC, S.; ZDRAVKOVIC-KORAC, S.; SUBOTIC, A.; VINTERHALTER, D. Effect of nitrogen salts on the growth of *Ceratonia siliqua* L. Shoot cultures. **Archives of Biological Sciences**, Belgrade v. 59, n. 3, p. 217-222, 2007.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura , reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam .). **Acta Botânica Brasileira**, Feira de Santana, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

ZUZARTE, M. R.; DINIS, A. M.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. R.; CANHOTO, J. M. Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 580-587, Nov. 2010.

ARTIGO 1

**PROPAGAÇÃO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS *IN*
VITRO DE CIDRÃO**

**Giselly Mota da Silva¹ Suzan Kelly Vilela Bertolucci¹ José Eduardo Brasil
Pereira Pinto¹ Joyce Pereira Alvarenga¹**

¹Setor de Plantas Medicinais, Departamento de Agricultura, Universidade
Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, CEP 37200-000

Email: gisellymota@yahoo.com.br

Preparado Segundo a Norma NBR 6022:2003

RESUMO

Aloysia triphylla (L'Hérit) Britton, é uma planta aromática, medicinal e caducifolia. A micropropagação é uma alternativa de produção ininterrupta da espécie. Objetivou-se avaliar parâmetros de crescimento e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *A. triphylla*, para se iniciar um protocolo de micropropagação para espécie. Para o pré-estabelecimento da espécie testou-se diferentes fontes de explante, o segmento apical e nodal (1º, 2º, 3º e 4º), inoculados em três meios de cultura: MS, B5 e WPM. Posteriormente, verificou-se a melhor orientação de inoculação dos explantes (horizontal e vertical), melhor meio para o subcultivo da espécie, concentrações de nitrogênio e aclimatização das plântulas, assim como o teor e a composição dos constituintes voláteis das plântulas *in vitro* e *ex vitro*. Para o estabelecimento, o 1º e 2º segmento nodal apresentaram brotos mais desenvolvidos, independentes do meio. Explantes inoculados na orientação horizontal emitiram maior quantidade de brotos e maior acúmulo de biomassa seca da parte aérea. O meio WPM proporcionou um melhor subcultivo, com brotos mais desenvolvidos e maior acúmulo de biomassa seca da parte aérea. A concentração de 15 mM favoreceu o crescimento de brotos, enquanto que 60 mM proporcionou maior área foliar. Ocorreu 100% de sobrevivência das plântulas aclimatizadas. Análises por HS-CG-EM detectaram a presença de 6-metil-5-hepten-2-ona em quantidades elevadas na fração volátil de plântulas desenvolvidas no meio MS, tanto do estabelecimento quanto no subcultivo. Enquanto que as plântulas desenvolvidas no meio WPM produziram maiores teores de citral. O aumento dos níveis de nitrogênio no meio diminuiu os teores dos constituintes majoritários. O cultivo *in vitro* é favorável para produção dos constituintes majoritários, nas condições avaliadas. Portanto, para o estabelecimento *in vitro* de *A. triphylla* indica-se o uso do 1º e 2º segmentos nodais inoculados ao meio de cultura WPM. Para melhor desenvolvimento de brotos no subcultivo, os explantes devem ser inoculados na posição horizontal no meio de cultura WPM para obtenção de quantidades significativas de citral, limoneno e β -cariofileno na fração volátil. Na fase de aclimatização deve-se utilizar o substrato comercial Plantmax® para melhor sobrevivência das mudas.

Palavras-chave: *Aloysia triphylla*, meios de cultura, segmento nodal, fração volátil, *headspace*-CG/EM.

PROPAGATION AND VOLATILE PRODUCTION OF LEMON VERBENA *IN VITRO*

ABSTRACT

Aloysia triphylla (L'Herit) Britton, is an aromatic plant, medicinal and leaves dropping off. The objective was developed micropropagation method and volatile production of *A. triphylla* *in vitro*. Establishment phase were tested different explant sources and different media. After were tested explant orientation (horizontal and vertical), medium for subculture, nitrogen concentration and acclimatization as well as the content and volatile composition *in vitro* and *ex vitro* of plants. The 1° and 2° nodal segments showed suitable for establishment independent of the medium. Horizontal position of explant was found greater amount of shoots and dry biomass accumulation. In subculture phase WPM medium gave optimal shoot growth and dry biomass. The 15 mM nitrogen concentration favored shoots growth and while 60 mM provided greater leaf area. There was 100% survival of plantlets in acclimatization phase. Analysis by HS-GC-MS detected presence of 6-methyl-5-hepten-2-one in high amounts in the volatile fraction of plantlets developed in MS medium, both the establishment and in the subculture. While plantlets developed in WPM medium produced higher levels of citral. Increase levels of nitrogen in the medium decreased levels of major constituents. The *in vitro* is favorable for production of the major constituents. *In vitro* establishment phase of *A. triphylla* indicates the use of the 1° and 2° nodal segments cultured on WPM. Explant cultured in the horizontal position on WPM was found suitable for shoot growth in subculture phase and significant quantities of citral, limonene and β -caryophyllene in the volatile fraction. Acclimatization phase should use substrate Plantmax[®] for best plantlets survival.

Keywords: *Aloysia triphylla*, culture media, nodal segment, the volatile fraction, headspace-CG/EM.

1-INTRODUÇÃO

Aloysia triphylla (L'Hérit) Britton (Verbenaceae) é uma planta que ocupa importante lugar no mercado de ervas, devido as propriedades medicinais do óleo essencial acumulado em suas folhas, rico em neral e geranial, além da presença de limoneno, cineol, geraniol, β -cariofileno e espatulenol. A esses constituintes conferem-se as atividades anti-hipertensiva, sedativa, digestiva e diurética da espécie (GIL et al., 2007; ROJAS et al., 2012). É empregada também no fábriço de licores, perfumes, na culinária, como ornamental, bactericida, inseticida e na aromaterapia (GOMES et al., 2009; BRANT et al., 2009).

A propagação de *A. triphylla*, é realizada por estaquia, o que só é possível durante a primavera e o verão quando as folhas estão presentes na planta, pois no final do inverno as folhas caem e a planta entra em dormência. Com isso, a micropropagação torna-se um método importante de propagação da espécie e, conseqüentemente uma alternativa para produção de constituintes voláteis (EL-HAWARY et al., 2012).

A micropropagação é uma das técnicas mais efetivas de propagação em larga escala de espécimes que apresentem um genótipo de interesse, pois permite a produção de plantas geneticamente idênticas, em curto período de tempo, livre de infecções e variações sazonais e, em se tratando de plantas aromáticas proporcionam rendimento e composição química mais homogênea do óleo essencial (ZUZARTE et al., 2010; REIS et al., 2009). No entanto, para se desenvolver um protocolo de micropropagação de uma espécie, é necessário o controle de inúmeras variáveis como o estabelecimento da plântula *in vitro*, que depende de parâmetros que influenciam a organogênese, tais como o tipo de meio e origem do explante (COSTA et al., 2007; JESUS et al., 2010; SUZUKI et al.,

2010); bem como as condições de multiplicação e a aclimatização das plântulas (FLÔRES et al., 2011).

Embora existam inúmeros trabalhos relacionados ao processo de desenvolvimento *in vitro* com espécies da família Verbenaceae, não foram encontrados na literatura relatos sobre a propagação e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *A. triphylla*. Portanto, objetivou-se avaliar diferentes posições dos explantes iniciais, orientação de inoculação de segmentos nodais estabelecidos e meios de cultura no crescimento vegetativo e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *A. Triphylla*.

2-MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG. Exsiccatas foram depositados no herbário do departamento de biologia da Universidade Federal de Lavras, sob o registro 19677.

As plantas matrizes foram cultivadas em vasos contendo substrato comercial Plantmax® e mantidas em casa de vegetação, situada nas coordenadas geográficas 21° 14'S e 45° 00 W, a 918 m de altitude. A coleta dos explantes foram feitas durante a primavera. Após a inoculação, todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas de luz, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As determinações das biomassa secas da parte aérea (BSPA) e da raiz (BSR) nos experimentos foram realizadas por secagem em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C, até peso constante, as quais foram expressas em miligramas (mg).

2.1 Efeito da posição dos explantes iniciais em diferentes meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de *A. triphylla*

Para o estabelecimento *in vitro* de *A. triphylla* foram avaliadas como fontes de explantes os segmentos apical e caulinares nodais (primeiro, segundo, terceiro e quarto nós), coletados de plantas cultivadas em casa de vegetação.

Após a coleta, os explantes foram desinfestados com água corrente por 30 minutos, seguido de contato direto com formaldeído P.A. por 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em uma solução de álcool etílico a 70%, por 15 segundos, seguido de uma solução de hipoclorito de sódio a 0,4 %, por 10 minutos e, finalmente, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada.

A seguir, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura. Foram avaliados três meios: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG et al., 1968) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), contendo 3%, 2% e 2% de sacarose, respectivamente. Em todos os meios acrescentaram-se 0,6 % de ágar e o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado constituídos de três repetições, com três tubos de ensaio contendo um explante por repetição. Empregou-se o delineamento em esquema fatorial 5 x 3, sendo cinco segmentos (apical, 1º, 2º, 3º e 4º nós) e três meios de cultura (MS, B5 e WPM). Foram avaliadas as variáveis de comprimento, número de brotos e análise química dos constituintes voláteis, utilizando 100 mg de folha seca.

2.2- Orientação de inoculação do segmento nodal e números de gemas no crescimento *in vitro* de *A. triphylla*

Após o estabelecimento *in vitro*, visando avaliar a influência da orientação do explante, segmentos nodais com 1 cm de plântulas pré-estabelecidas, com 1 e 2 gemas, foram inoculadas em frascos com 30 mL do meio de culturas MS, contendo 3% de sacarose, acrescido de 0,6 % de ágar e o pH foi aferido em $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

Os tratamentos consistiram na combinação de duas orientações de inoculação (horizontal e vertical) com 1 e 2 gemas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2, com seis repetições constituídas de quatro frascos por repetição.

Aos 30 dias avaliaram-se as seguintes variáveis: números de brotos, nós e raízes, comprimento do maior brotação e da maior raiz e biomassa seca da parte aérea a raiz.

2.3- Efeitos de diferentes tipos de meios de cultura no crescimento *in vitro* de *A. triphylla*

Verificada a melhor orientação de inoculação do explante, testou-se o melhor meio para o subcultivo da espécie. Inoculou-se horizontalmente, explantes contendo duas gemas em três meios de cultura: MS, B5 e WPM, contendo 3%, 2% e 2% de sacarose, respectivamente. Em todos os meios acrescentaram-se 0,6 % de ágar e o pH foi aferido em $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo utilizados sete repetições com dois frascos contendo dois explantes. Foi avaliado o número de

brotos, comprimentos do maior broto e da maior raiz, biomassa seca de brotos e raízes, porcentagem de hiperidricidade e, análise química dos constituintes voláteis, para os quais foram utilizados 100 mg de folhas secas. Este experimento foi realizado duas vezes, a fim de confirmar os resultados obtidos, sendo os resultados expressos pela média \pm desvio padrão.

2.4- Efeito do nitrogênio no teor dos constituintes voláteis em folhas de *A. triphylla*

Visando validar a hipótese de que a concentração de nitrogênio do meio MS tenha causado estresse metabólico para a produção de constituintes voláteis, segmentos nodais de plântulas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro*, foram inoculadas verticalmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura MS modificado para as seguintes concentrações de Nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM, aos quais foram adicionados 3% de sacarose, acrescido de 0,6 % de ágar e o pH aferido em $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado constituídos de seis repetições, com oito tubos de ensaio contendo um explante por repetição. Aos 45 dias de desenvolvimento, avaliou-se número e comprimento das brotações, número e comprimento das raízes, comprimento e diâmetro de folhas, biomassa seca da parte aérea e raízes e análise química dos constituintes voláteis em 70 mg de folhas secas.

2.5- Aclimatização

Dez plântulas enraizadas com 30 dias de desenvolvimento, obtidas na etapa de propagação *in vitro*, foram retiradas dos frascos de cultivo, lavadas em água corrente e transferidas para tubetes plásticos de 53 cm³ contendo o

substrato comercial Plantmax[®] e mantidos em casa de vegetação. Após três meses, realizou-se coleta das folhas para análise dos constituintes voláteis, e posterior comparação quantitativa e qualitativa desses constituintes com folhas de plantas desenvolvidas *in vitro* e no horto de plantas medicinais da UFLA, cultivada em latossolo vermelho. Para o cultivo *in vitro* utilizou-se o meio de cultura WPM

2.6-Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas ao teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2002) foi utilizado para o processamento dos dados.

2.7-Análise da fração volátil por HS-CG/EM

Amostras de folhas de *A. triphylla* foram coletadas de plântulas aos 30 dias de desenvolvimento e cultivadas *in vitro* nos meios MS, WPM e B5 e de plantas aclimatizadas. As amostras foram secas em estufa de circulação de ar a 39°C.

As análises químicas foram re-aliadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA. Para extração da fração volátil de *A. triphylla* empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System* (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 100 °C durante 30 min,

temperatura de seringa a 110 °C. Foram utilizadas folhas secas, que foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica. A fração volátil foi analisada 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 a linha de transferência para o MS foram mantidas em 220 °C e 240 °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 240 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 270 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os constituintes da fração volátil foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos a co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C₈-C₂₀, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST SPEECH GROUP WEBSITE, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por KOVÁTS (1965) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito de diferentes fontes de explantes e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de *A. triphylla*

Os segmentos apicais não desenvolveram nas condições *in vitro* avaliadas (Figura 1A- vide página 47). Provavelmente, em função da fragilidade dos tecidos apicais, houve uma resposta celular ao estresse e injúrias físicas causadas pelos processos de desinfestação durante a assepsia dos explantes, ocasionando a estimulação da atividade da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), a qual está relacionada à biossíntese de compostos fenólicos, que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro* (GOLLE et al., 2012). Esses resultados foram divergentes dos encontrados por BASSAN et al. (2006), durante o estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* Spreng.), uma espécie também lenhosa, em que o ápice caulinar mostrou ser mais eficiente que o segmento nodal.

Não ocorreu interação significativa entre posição dos segmentos nodais e os meios de cultura. Para a posição do segmento caulinar nodal houve diferenças estatísticas significativas (Tabela 1). Observou-se que os comprimentos e número de brotos foram maiores nos segmentos do primeiro e do segundo nós. Esses brotos atingiram um comprimento médio de 3,33 e 2,67 cm e um número de 1,81 e 1,51 brotos em média, respectivamente, para o primeiro e o segundo segmento nodal (Figura 1B- vide página 47).

Esses resultados podem estar relacionados ao fato de que, o terceiro e o quarto segmentos nodais estejam localizados numa região mais lenhosa da planta, o que pode ter dificultado o desenvolvimento do explante. Resultados similares foram observados por COSTA et al. (2007), ao avaliarem os mesmos meios de cultura no estabelecimento de *Lippia sidoides* Cham.

Tabela 1. Comprimento e número de brotos de segmentos nodais coletados em diferentes posições dos ramos caulinares no estabelecimento *in vitro* de *A. triphylla*. UFLA, Lavras, 2013.

Segmentos	Altura de brotos	Número de brotos
1°	3,33 a	1,81 a
2°	2,67 a	1,51 a
3°	1,37 b	0,99 b
4°	0,94 b	0,70 b

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância.

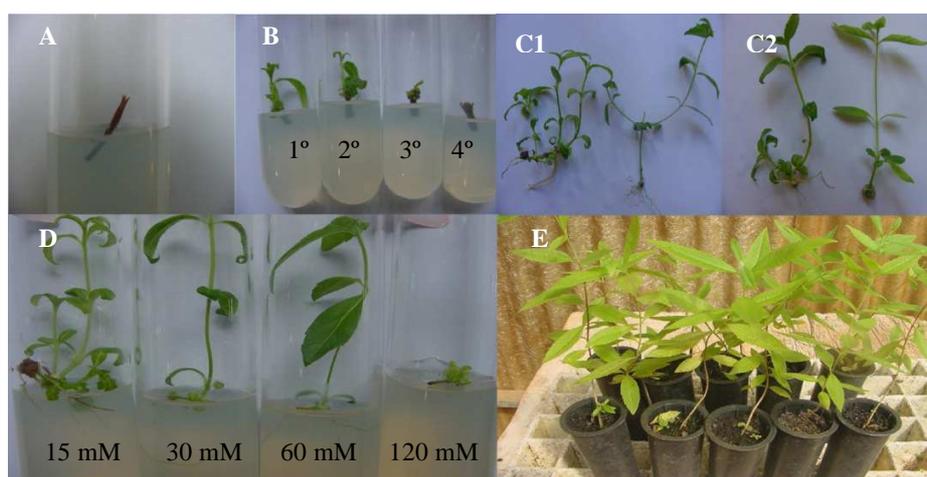


Figura 1. Plântulas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro*. A- segmento apical. B- segmentos nodais. C1- Segmento nodal com duas gemas inoculadas na horizontal e vertical. C2- Segmento nodal com uma gema inoculadas na horizontal e vertical. D- Efeito de diferentes. E- Plântulas estabelecidas em vasos.

No entanto, observou-se que os meios de culturas exerceram os mesmos efeitos sobre as variáveis analisadas, apresentando em média 1,55 brotos/explante, os quais atingiram uma altura média de 2,67 cm. Resultados similares foram observados por COSTA et al. (2007), ao avaliarem os mesmos meios de cultura no estabelecimento de *Lippia sidoides* Cham.

Os constituintes e as porcentagens de área relativa da fração volátil das folhas de plântulas de *A. triphylla* cultivadas nos meios MS, B5 e WPM estão apresentados na Tabela 2. Foram identificados 24 constituintes químicos que representaram mais de 98% da composição química da fração volátil.

Tabela 2. Constituição química de plântulas de *A. triphylla* no estabelecimento *in vitro* em diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM). UFLA, Lavras, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	MEIOS DE CULTURA		
		MS	B5	WPM
Área % ± DP				
6-metil-5-hepten-2-ona	987	20,93±0,90	14,20±1,16	11,82±0,33
Mirceno	991	0,64±0,11	0,60±0,08	0,49±0,02
limoneno	1029	27,01±0,53	26,97±2,38	21,93±0,45
α-ocimeno	1047	0,64±0,04	0,73±0,23	nd
butanoato de linalila	1098	1,03±0,06	0,84±0,07	0,55±0,06
linalol	1101	1,89±0,06	1,66±0,03	1,73±0,21
Z-isocitral	1165	tr	tr	0,43±0,05
epóxido de rosefurano	1176	1,33±0,05	1,29±0,07	1,14±0,02
trans-verbenol	1183	nd	nd	0,65±0,07
neral	1242	3,27±1,12	8,69±0,81	11,92±1,67
geranial	1271	4,72±1,80	12,47±1,06	16,86±2,05
isobutirato de linalila	1367	0,61±0,06	0,54±0,01	0,53±0,07
acetato de nerila	1386	3,33±0,36	2,53±0,04	2,73±0,20
α-cedreno	1416	nd	nd	0,44±0,03
β-cariofileno	1424	14,18±1,53	12,68±0,54	12,33±1,20
α-humuleno	1460	0,52±0,14	0,56±0,05	0,56±0,07
α-curcumeno	1486	7,40±0,68	5,83±0,39	5,64±0,72
α-zingibereno	1497	1,62±0,42	1,31±0,19	1,25±0,05
biciclogermacreno	1500	1,19±0,48	1,23±0,20	1,08±0,38
β-curcumeno	1515	3,99±0,69	3,04±0,32	2,99±0,16
δ-cadineno	1519	0,71±0,01	0,63±0,04	0,59±0,06
espatulenol	1584	0,78±0,00	0,63±0,01	0,59±0,02
óxido de cariofileno	1590	2,31±0,39	2,18±0,06	2,07±0,24
α-mwrolol	1649	0,61±0,10	0,59±0,00	0,54±0,02
Total identificado (%)		98,79	99,28	98,97

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%); DP: desvio padrão (n=3).

Os constituintes majoritários da fração volátil para os três meios de cultura avaliados foram o 6-metil-5-hepten-2-ona, o limoneno, o citral (neral + geranial) e o β -cariofileno. Desses constituintes, os teores de 6-metil-5-hepten-2-ona e de citral apresentaram as diferenças mais expressivas. No meio MS o teor de 6-metil-5-hepten-2-ona (20,93%) foi maior entre os meios analisados e o de citral o menor (8,00%). Por outro lado, os meios B5 e WPM apresentaram teores de 6-metil-5-hepten-2-ona de 14,20% e 11,82%, enquanto o de citral foi de 21,16% e 28,78%, respectivamente. Portanto, dentre os meios avaliados o WPM foi o que proporcionou maior teor de citral.

O citral é o constituinte majoritário do óleo essencial de *A. triphylla* (ARGYROPOULOU et al., 2007; CARNAT et al., 1999). Quanto à composição majoritária da fração volátil, os resultados de ARGYROPOULOU et al. (2007) corroboram parcialmente com os do presente estudo. Esses autores observaram um teor de 63,2% de citral (38,7% de geranial + 24,5% de neral) e 5,8% de limoneno no óleo essencial de *A. triphylla* durante seu estágio vegetativo, entretanto os teores de 6-metil-5-hepten-2-ona ficaram abaixo de 0,5%.

Existem evidências que 6-metil-5-hepten-2-ona pode ser um produto de reações oxidativas do citral (DEMYTTENAERE et al., 2000). Provavelmente, a maior força iônica e/ou concentração de nitrogênio do meio MS pode ter provocado um estresse metabólico na plântula e desencadeado a oxidação do citral a 6-metil-5-hepten-2-ona.

3.2- Orientação de inoculação do segmento nodal e números de gemas no crescimento *in vitro* de *A. triphylla*

Para as características número de brotações, número de nós e comprimento da raiz principal não houve diferenças significativas em função dos fatores testados (Tabela 3). A orientação horizontal do segmento nodal no

meio de cultura induziu maiores números de brotos e nós, Quanto ao sistema radicular, os explantes inoculados na posição vertical emitiram raiz de maior comprimento médio; esse resultado pode está relacionado com o transporte polar das auxinas, pois a orientação vertical pode ter criado um gradiente longitudinal das auxinas, da parte aérea para a região basípeta do explante.

Tabela 3. Número de brotos (NB), número de nós (NN) e comprimento da maior raiz (CRP-cm) de *A. triphylla* com 30 dias de cultivo, em função da orientação do explante. UFLA, Lavras, 2013.

ORIENTAÇÃO	NB	NN	CRP
HORIZONTAL	4,70 a	11,0 a	2,56 b
VERTICAL	3,71 b	9,2 b	3,80 a
NÚMERO DE GEMAS			
1 GEMA	3,75 b	8,43 b	3,0 a
2 GEMAS	4,65 a	11,82 a	3,7 a

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância.

Explantes contendo duas gemas emitiram maior número de brotações e nós, com média de 4,65 cm e 11,82, respectivamente. No entanto, as quantidades de gemas utilizadas apresentaram o mesmo efeito sobre o comprimento do sistema radicular.

O efeito da orientação de inoculação e número de gemas nas características comprimento da maior brotação, biomassa seca da parte aérea e raiz, estão demonstrados na tabela 4 e vide Figura 1C (página 48). Explantes com duas gemas, independente da orientação de inoculação, apresentaram brotos com maior altura. No entanto, observando o efeito isolado dos explantes contendo uma gema, verificou-se que a inoculação na posição vertical apresentou brotos com maior altura que aqueles desenvolvidos de explantes inoculados horizontalmente. ASSIS (2010), encontrou maior comprimento de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. em explantes inoculados na posição horizontal.

Tabela 4. Altura do maior broto (AMB-cm), biomassa seca da parte aérea (BSPA - mg) e da raiz (BSR - mg) de *A. triphylla* com 30 dias de cultivo, em função da orientação do explante e número de gemas inoculadas (G). UFLA, Lavras, 2013.

VARIÁVEIS	NºGEMAS	ORIENTAÇÃO	
		HORIZONTAL	VERTICAL
AMB	1	3,54 Bb	4,97 Ba
	2	6,22 Aa	6,16 Aa
BSPA	1	152 Aa	80 Bb
	2	141 Aa	115 Aa
BSR	1	10,76 Ba	12,76 Ba
	2	28,48 Aa	19,74 Ab

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância.

Quando inoculados explantes com uma gema na posição vertical, obteve-se menor acúmulo de biomassa seca (12,76 g). Também se verificou que nessa posição as raízes emitiram da parte inferior do explante e, não da parte nodal, como observado com os explantes inoculados na posição horizontal, o que pode também está relacionado com o transporte polar das auxinas.

Assim, a inoculação de explantes com duas gemas na posição horizontal, proporcionou o desenvolvimento de plântulas com melhores características morfológicas.

3.3 Efeitos de diferentes tipos de meios de cultura no crescimento *in vitro* de *A. triphylla*.

O cultivo *in vitro* de *A. triphylla* foi afetado pela hiperidricidade (Tabela 5). Dentre os meios estudados o meio B5 foi o que apresentou a maior porcentagem de hiperidricidade (49,54%). Apesar de ter apresentado o maior número de brotos (8,41), estes apresentaram-se com entrenó curto, folhas frágeis e baixo acúmulo de biomassa seca da parte aérea.

Tabela 5. Número de broto (NB), altura do maior broto (AMB-cm), comprimento da raiz (CR-cm), biomassa seca da parte aérea (BSPA) e da raiz (BSR) e porcentagem de hiperidricidade (H) em brotações de *A. triphylla* com 30 dias de cultivo, em função de diferentes meios de cultura. UFLA, Lavras, 2013.

MEIO	NB	AMB	TR	BSPA	BSR	H (%)
MS	4,03 c	6,18 a	3,24 b	71,31 b	4,93 b	15,71
WPM	6,57 b	6,20 a	6,14 a	100,88 a	9,53 a	23,72
B5	8,41 a	4,6 b	4,04 b	71,30 b	6,57 b	49,54

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância.

Explantos inoculados nos meios MS e WPM desenvolveram brotos com taxas de hiperidricidade mais reduzidas, 15,71% e 23,72% respectivamente, proporcionando o crescimento de plântulas mais vigorosas. Porém, o meio WPM mostrou-se mais eficiente para o subcultivo de *A. triphylla*, pois além da melhor resposta para o crescimento da parte aérea, também apresentou melhor crescimento da raiz. Somam-se ainda, o melhor número de brotos em relação ao meio MS e maior acúmulo de biomassa seca da parte aérea (100,88 mg), o que é um indicativo de menor susceptibilidade de hiperidricidade. Em *Lavandula angustifolia* Mill., uma espécie de base lenhosa, o meio WPM apresentou resultados inferiores para número e altura de brotações (MACHADO et al., 2013). No entanto em plantas lenhosas como *Coffea arabica* L.(café) e *Rubus brasiliensis* Mart.(amoreira-preta), o meio WPM apresentou melhores resultados para número de brotações e desenvolvimento radicular, respectivamente (JESUS et al., 2010; LEITZKE et al., 2009).

O meio WPM é bastante utilizado na promoção da organogênese de espécies lenhosas, provavelmente por apresentar 50% da força iônica dos meios MS e B5, bem como elevado nível de S e baixos níveis de NH_4^+ e NO_3^- . De qualquer modo, a comparação de diferentes meios de cultura é uma tarefa complexa devido às interações entre os nutrientes minerais, o potencial osmótico do meio e as exigências nutricionais de cada planta (WERNER et al., 2010).

Com relação à análise da fração volátil dos segmentos nodais contendo duas gemas e inoculados na posição horizontal foram identificados 27 constituintes correspondendo a mais de 97% da composição total (Tabela 6). A composição qualitativa da fração volátil foi similar àquela observada para o experimento que avaliou diferentes meios de cultura. Entretanto, houve alterações significativas nos teores dos constituintes químicos, principalmente quanto ao teor de limoneno no meio MS, que para os explantes horizontais foi de 46,31%.

Comparando os explantes inoculados na posição horizontal nos três meios, observou-se que os teores de citral mantiveram menores no MS (8,63%), intermediário para o B5 (18,82%) e superiores para o WPM (32,72%). Uma diferença marcante observada para esses explantes foi que o teor de citral foi maior no meio WPM e o de limoneno no meio MS.

A comparação das análises da primeira repetição do experimento com a segunda indicou diferenças quantitativas e qualitativas da fração volátil. Quanto às diferenças quantitativas destaca-se a redução de cerca de 50%, no meio WPM, do teor de citral. Em termos qualitativos o espatulenol estava presente no meio B5 da 1ª repetição do experimento, e ausente na segunda. No geral, plântulas desenvolvidas no meio MS e WPM, apresentaram altos teores de limoneno e citral, respectivamente.

Tabela 6. Comparação da constituição química de plântulas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro* (30 dias), a partir de explantes com duas gemas inoculados na orientação horizontal, em diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM). UFLA, Lavras, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	MS	B5	WPM
		Área % ± DP		
1-octen-3-ol	977	1,14±0,36	1,24±0,19	3,57±1,63
6-metil-5-hepten-2-ona	987	14,41±1,58	11,14±0,51	7,67±2,35
Mirceno	991	0,92±0,06	0,72±0,10	0,67±0,06
Limoneno	1028	46,60±1,08	34,59±3,36	33,50±3,27
β-ocimeno	1047	0,46±0,13	tr	tr
butanoato de linalila	1098	0,53±0,05	0,58±0,06	0,56±0,19
Linalol	1101	1,59±0,16	1,56±0,16	1,45±0,27
Z-isocitral	1165	nd	0,34±0,11	nd
Epoxido de rosefurano	1176	0,55±0,13	0,67±0,03	0,58±0,11
<i>trans</i> -verbenol	1183	nd	0,50±0,18	0,46±0,04
pseudolimoneno	1229	0,49±0,02	0,36±0,66	0,86±0,22
Neral	1242	3,56±0,58	9,64±3,22	7,24±1,13
cis-geraniol	1255	0,74±0,14	0,75±0,12	1,28±0,23
Geranial	1271	5,27±0,95	14,93±5,18	11,34±1,45
isobutirato de linalila	1366	0,57±0,05	0,51±0,66	0,65±0,12
acetato de nerila	1386	1,89±0,12	1,85±0,17	1,78±0,43
α-cedreno	1415	nd	nd	0,35±0,00
β-cariofileno	1424	9,48±0,60	11,37±0,13	12,96±0,095
α-humuleno	1459	0,31±0,02	0,30±0,55	0,46±0,09
α-curcumeno	1486	4,34±0,35	3,79±0,35	5,99±0,51
α-zingibereno	1497	1,66±0,25	1,24±0,37	1,54±0,17
biciclogermacreno	1499	1,07±0,13	0,81±0,29	1,85±0,54
β-curcumeno	1515	2,81±0,30	2,26±0,64	2,57±0,37
δ-cadineno	1518	0,45±0,04	tr	tr
Óxido de cariofileno	1590	nd	nd	0,35±0,00
α-muurolol	1648	0,68±0,06	0,61±0,05	1,40±0,08
espatulenol	1584	0,32±0,04	tr	0,42±0,04
Total identificado (%)		99,84	99,78	99,48

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

nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%); DP: desvio padrão (n=6).

Assim como, na análise química dos compostos voláteis em brotos pré-estabelecidos, o 6-metil-5-hepten-2-ona foi detectado em grandes quantidades no óleo essencial de *A. triphylla*. ARGYROPOULOU et al. (2007), não observaram a presença deste constituinte em quantidades expressivas no óleo essencial de *A. triphylla*. KIM e LEE (2004), não detectaram a presença de 6-

metil-5-hepten-2-ona, ao analisar diferentes tipos de fibra de HS-SPME, em amostras de folhas de *A. triphylla*. GIL et al., (2007), ao analisar o óleo essencial de diferentes clones da espécie, detectou o 6-metil-5-hepten-2-ona em baixo teor.

3.4- Efeito do nitrogênio no desenvolvimento de brotos e teor dos constituintes voláteis em folhas de *A. triphylla*.

As diferentes concentrações de nitrogênio adicionadas ao meio de cultura MS influenciaram o desenvolvimento *in vitro* de *A. triphylla*. O número e o comprimento das brotações diminuíram linearmente à medida que se aumentou a concentração de nitrogênio no meio (Gráficos 1 e 2). As concentrações de 15 e 30 mM induziram a emissão de 1,91 e 1,77 brotos/explante, respectivamente. Plântulas cultivadas nestas mesmas condições apresentaram os maiores comprimentos das brotações (4,28 e 4,23 cm).

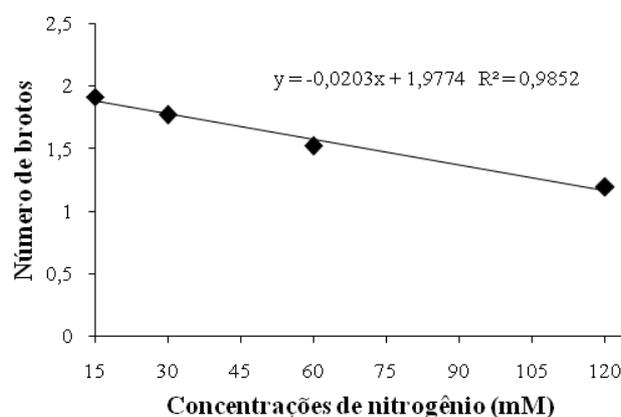


Gráfico 1. Número de brotos de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

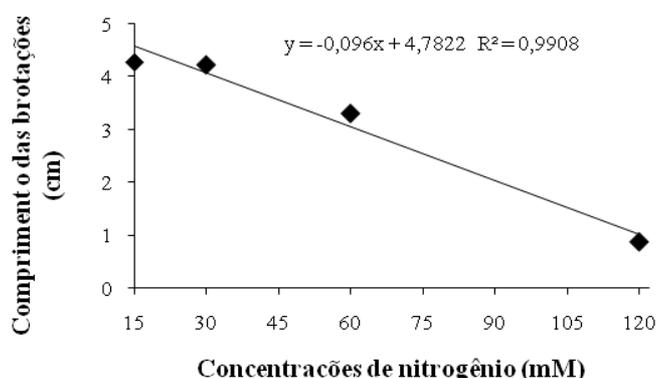


Gráfico 2. Comprimento (cm) de brotos de *A. triphylla*, cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

No entanto, para a análise biométrica das folhas, observou-se uma resposta quadrática (Gráfico 3 e 4). As folhas atingiram seu valor máximo de comprimento e largura, na concentração estimada de 47,5 mM (22,71 mm) e 52,6 mM (7,86 mm), respectivamente. Esse resultado pode ser favorável para obtenção de maiores rendimentos de constituintes voláteis, já que o óleo essencial da espécie está acumulado em suas folhas. (GIL et al., 2007). Na concentração de 60 mM, as plântulas apresentaram uma coloração verde mais escura (Figura 2D- vide página 48). A concentração de 120 mM de nitrogênio, provavelmente afetou o ganho de biomassa para a espécie, pois o comprimento e largura das folhas apresentaram valores inferiores a 1,93 e 1,71 mm, respectivamente.

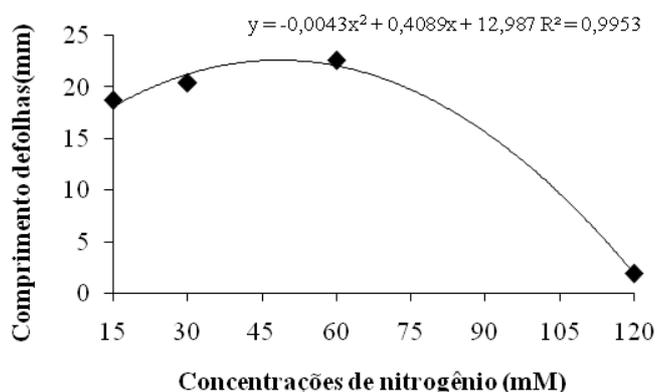


Gráfico 3. Comprimento (mm) de folha de brotos de *A. triphylla*, cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

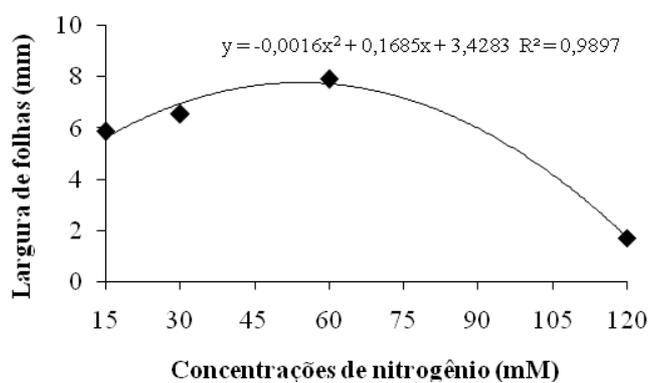


Gráfico 4. Largura (mm) de folha de brotos de *A. triphylla*, cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

Plântulas cultivadas com 15 mM de nitrogênio, acumularam maior biomassa na parte aérea, com média de 94,06 mg. No entanto, a concentração

usual do meio MS (60 mM), não favoreceu a produtividade de biomassa pela parte aérea da plântula (Figura 5).

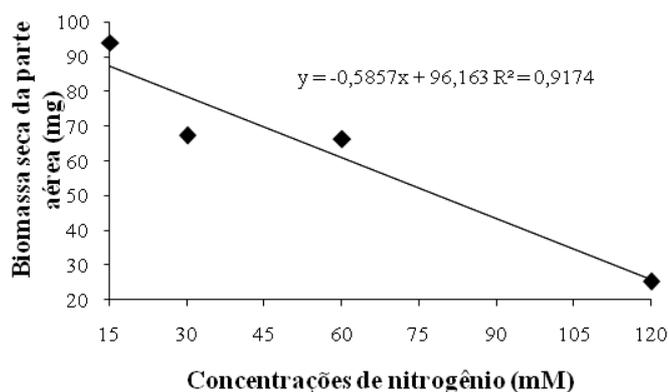


Gráfico 5. Biomassa seca da parte aérea (mg) de brotos de *A. triphylla*, cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

O meio MS modificado para níveis de nitrogênio, também influenciou o sistema radicular das plântulas, sendo a concentração de 15 mM que melhor favoreceu o desenvolvimento de raízes, com maior número, comprimento e biomassa seca. À medida que a concentração de nitrogênio foi aumentada, observou-se menor desenvolvimento do sistema radicular, decrescendo até a inibição completa de emissão de raízes com a dose de 120 mM (Gráficos 6,7 8).

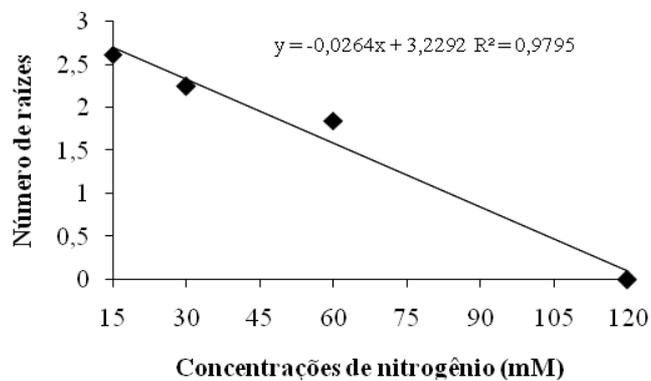


Gráfico 6. Número de raízes de *A. triphylla*, cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

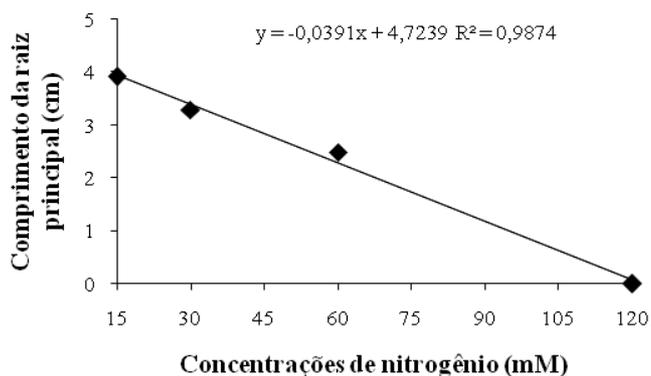


Gráfico 7. Comprimento da raiz principal de brotos de *A. triphylla*, cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

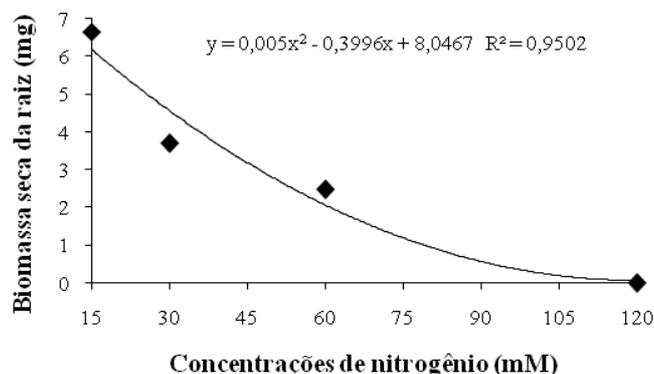


Gráfico 8. Biomassa seca da raiz (mg) de brotos de *A. triphylla*, cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio: 15, 30, 60 e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013.
*Significativo pelo teste F.

Esses resultados são divergentes dos encontrados por KANASHIRO et al. (2007), ao trabalhar com *Aechmea blanchetiana*, onde a maior altura de brotos foi verificada na concentração de 30 mM e plântulas desenvolvidas na concentração de 15 mM emitiram folhas mais largas. No entanto os resultados estão de acordo quanto ao desenvolvimento do sistema radicular, esses autores encontraram o maior número e tamanho de raiz no meio que continha a concentração de 15 mM. MUSARURWA et al. (2012), obtiveram maior brotação, maior peso seco de brotos e menor número de raízes em *Salvia stenophylla*, à medida que se aumentava a concentração de nitrogênio no meio de cultura MS, até uma dosagem ótima, que foi 2,5 vezes da concentração padrão. De acordo com esses autores, altas concentrações de nitrato podem afetar a desenvolvimento de raízes.

A fração volátil para diferentes concentrações de nitrogênio no meio MS está demonstrada na Tabela 7. Foram identificados 20 constituintes químicos, que representaram mais de 99% da composição química da fração volátil.

Tabela 7. Constituição química de plântulas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro* (30 dias), a partir de explantes inoculados em meio MS com diferentes concentrações de nitrogênio (15, 30, 60 e 120 Mm). UFLA, Lavras, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	Concentração de Nitrogênio (Mm)		
		15	30	60
		Área % ± DP		
E-3-penten-2-ona	-	9,93±2,10	9,17±0,23	7,84±1,52
1-octen-3-ol	978	0,79±0,14	nd	nd
6-metil-5-hepten-2-ona	987	5,53±0,05	6,06±0,06	7,65±0,99
mirceno	991	0,39±0,04	nd	nd
limoneno	1028	25,31±2,38	35,19±5,19	45,02±2,14
linalol	1101	1,32±0,01	1,29±0,01	1,40±0,22
trans-verbenol	1183	0,58±0,10	nd	nd
pseudolimoneno	1229	0,58±0,01	nd	nd
neral	1242	11,92±0,43	10,34±2,15	7,65±0,66
cis-geraniol	1255	0,92±0,02	0,84±0,04	
geranial	1271	20,09±0,55	17,37±3,61	12,90±1,61
isobutirato de linalila	1366	0,52±0,02	nd	nd
acetato de nerila	1385	1,47±0,07	1,36±0,15	1,70±0,07
β-cariofileno	1423	12,04±0,50	9,98±1,54	8,35±0,16
α-humuleno	1459	0,39±0,07	nd	nd
α-curcumeno	1496	3,30±0,22	3,05±0,34	2,90±0,24
α-zingibereno	1496	1,02±0,11	0,93±0,07	
biclogermacreno	1498	0,47±0,01	tr	nd
β-curcumeno	1515	1,00±0,12	1,57±0,21	1,65±0,07
óxido de cariofileno	1589	0,70±0,06	0,63±0,03	0,83±0,08
Total identificado (%)		99,48	99,24	99,99

^aÍndice de retenção relativo a série *n*-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%); DP: desvio padrão (*n*=3).

O Gráfico 9 apresenta o efeito das diferentes concentrações de nitrogênio sobre os constituintes majoritários. Verificou-se que à medida que o nível de nitrogênio foi aumentando no meio de cultura, o teor desses constituintes

diminuí, com inibição total de citral e β -cariofileno em 120 mM. No entanto, o 6-metil-5-hepten-2-ona foi detectado em todas as concentrações utilizadas.

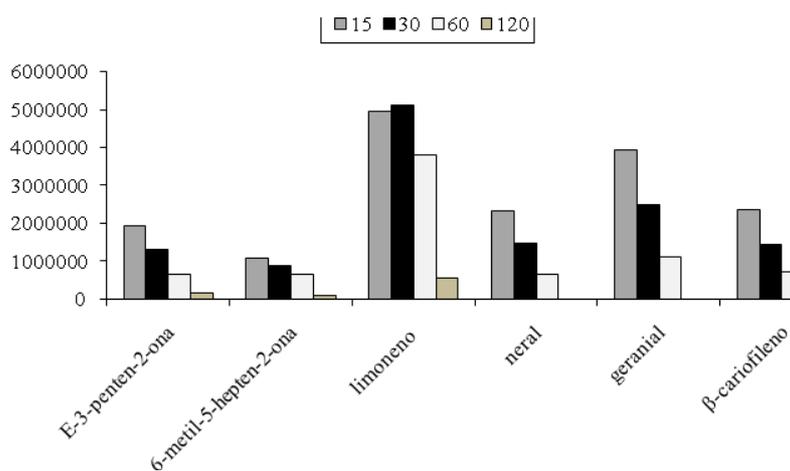


Gráfico 9. Comparação do teor de constituintes voláteis majoritários em folhas de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio (15, 30, 60 e 120 mM). UFLA, Lavras, 2013.

Os perfis cromatográficos apresentados na Figura 1 demonstram o efeito tóxico para a biossíntese de constituintes voláteis, causado em plântulas de *A. triphylla* pela adição de altas concentrações de nitrogênio no meio de cultura. Nota-se uma drástica redução na altura dos picos cromatográficos eluídos até 6,5 minutos e ausência de picos após esse tempo de retenção, mesmo a concentração usual de nitrogênio do meio de cultura MS (60 mM), não é adequada para a produção de constituintes voláteis *in vitro* por plântulas de *A. triphylla*, pois também reduziram a altura dos picos cromatográficos em relação aos cromatogramas correspondentes às concentrações de 15 mM e 30 mM.

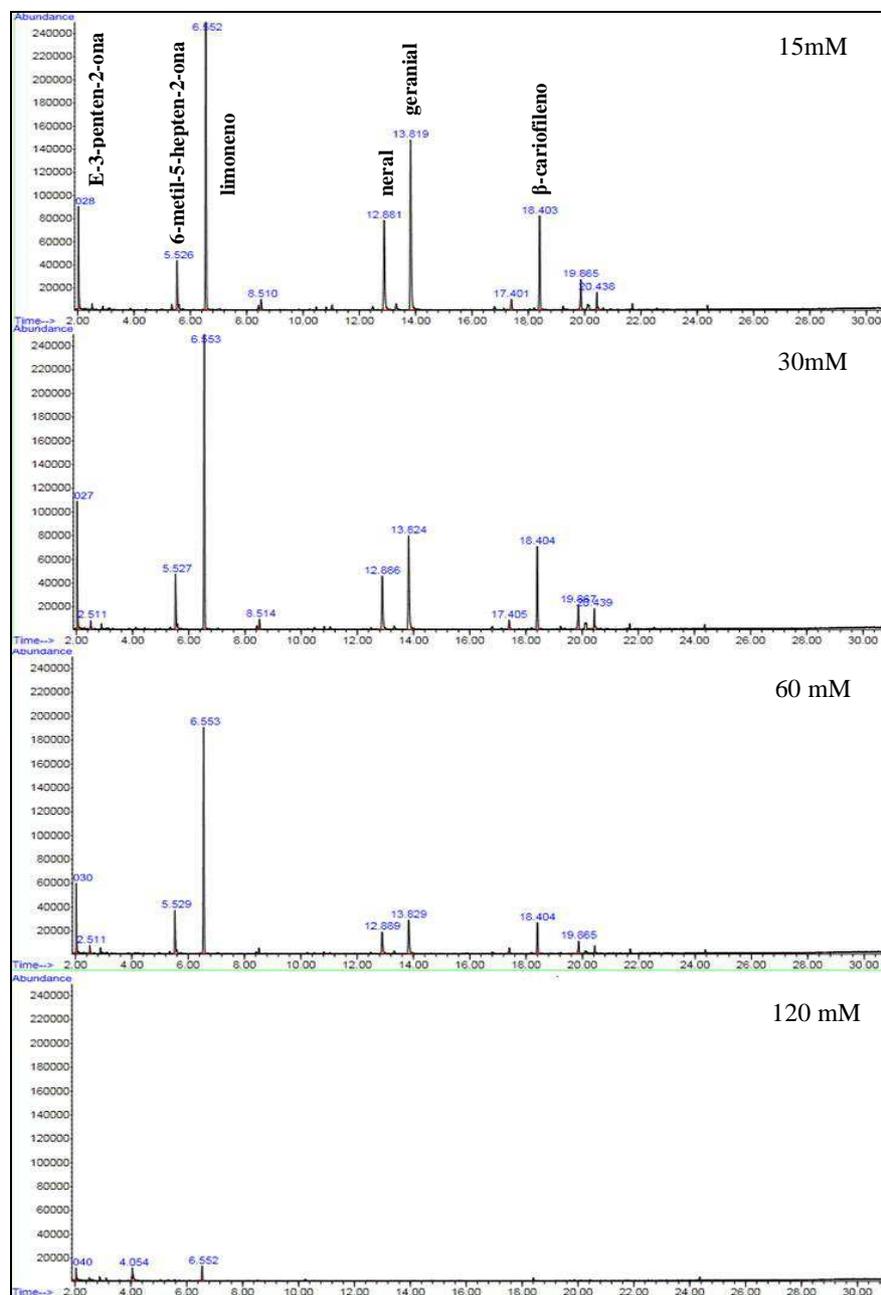


Figura 2. Cromatogramas totais de íons obtidos da fração volátil de folhas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro* nas concentrações de 15 mM , 30 mM, 60 mM e 120 mM. UFLA, Lavras, 2013.

3.5- Aclimatização

A percentagem de sobrevivência das plantas aclimatizadas foi de 100%. As plantas apresentaram-se vigorosas e com um sistema radicular bem desenvolvido (Figura 2E- vide página 48). Esses resultados indicam que, plântulas de *A. triphylla* podem ser aclimatizadas sem uso de reguladores de crescimento, e que o substrato comercial Plantmax® é eficiente para o crescimento dessa planta.

A comparação da fração volátil em diferentes condições de cultivo de plantas de *A. triphylla* está demonstrada na tabela 8. Foram identificados 31 constituintes químicos, que representaram mais de 97% da composição química da fração volátil.

Verificou-se consideráveis diferenças quantitativas e qualitativas dos constituintes voláteis majoritários. O limoneno, apresentou baixo teor em plantas cultivadas no campo ($1,06 \pm 0,25\%$), não foi detectado nas plantas aclimatizadas em casa de vegetação, mas no cultivo *in vitro* foi detectado em teores bastante expressivos ($37,88 \pm 0,87\%$). O citral apresentou os seguintes teores: 18,21%, 34,23% e 16,42%, em condições de campo, casa de vegetação e *in vitro*, respectivamente. O β -cariofileno, foi mais expressivo nas condições de cultivo *in vitro*.

Tabela 8. Comparação da constituição química de plantas de *A. triphylla* cultivadas em campo, em casa de vegetação e *in vitro* (meio WPM). UFLA, Lavras, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	Campo	Casa de vegetação	<i>in vitro</i>
		Área % ± DP		
1-octen-3-ol	977	nd	0,24±0,01	1,33±0,22
6-metil-5-hepten-2-ona	987	11,95±0,55	8,64±0,29	12,57±0,41
mircenol	991	nd	nd	0,82±0,01
limoneno	1029	1,06±0,25	nd	37,88±0,87
α-ocimeno	1047	nd	nd	tr
butanoato de linalila	1098	1,63±0,09	1,72±0,08	0,62±0,03
linalol	1101	nd	0,47±0,02	1,68±0,02
Z-isocitral	1165	nd	0,77±0,02	tr
epóxido de rosefurano	1176	1,65±0,05	2,24±0,05	0,66±0,01
trans-verbenol	1183	nd	1,27±0,02	0,33±0,02
2-metilenobornano	1219	0,95±0,03	tr	nd
pseudolimoneno	1229	nd	nd	0,35±0,03
neral	1242	7,08±0,09	12,62±0,26	6,53±0,08
cis-geraniol	1255	nd	nd	0,73±0,04
geranial	1271	11,13±0,18	21,61±0,24	9,89±0,10
isobutirato de linalila	1367	0,77±0,02	0,76±0,2	0,55±0,01
acetato de nerila	1386	7,17±0,15	7,78±0,04	2,00±0,09
α-cedreno	1416	0,98±0,06	0,43±0,01	0,25±0,01
β-cariofileno	1424	10,49±0,09	7,79±0,14	11,37±0,13
α-humuleno	1460	0,81±0	0,66±0,03	0,34±0,02
não identificado	1466	1,02±0,9	0,43±0,01	nd
α-curcumeno	1486	16,77±0,18	10,63±0,20	4,04±0,25
α-zingibereno	1497	nd	1,07±0,03	1,61±0,05
biciclogermacreno	1500	3,90±0,16	nd	1,09±0,06
β-curcumeno	1515	2,49±0,03	3,72±0,07	2,88±0,11
δ-amorfeno	1517	1,84±0,04	nd	0,44±0,02
δ-cadineno	1527	0,73±0,01	0,51±0,01	nd
α-cadineno	1542	0,52±0,04	0,33±0,02	nd
espatulenol	1584	5,47±0,13	1,92±0,03	nd
óxido de cariofileno	1590	8,54±0,21	6,79±0,06	0,59±0,04
α-muurolol	1649	2,05±0,07	1,33±0,01	0,22±0,01
Total identificado (%)		98,97	97,93	98,77

^aÍndice de retenção relativo a série *n*-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%); DP: desvio padrão (*n*=3).

De modo geral, o cultivo *in vitro* ofereceu condições para a síntese de limoneno e β-cariofileno em plântulas de *A. triphylla*. Enquanto que, as

condições em casa de vegetação proporcionaram maior síntese de citral nas plantas.

4-CONCLUSÃO

- Para o estabelecimento *in vitro* de *A. triphylla* indica-se o uso do 1º e 2º segmentos nodais inoculados ao meio de cultura WPM, por produzir maior teor de citral.
- Para melhor desenvolvimento de brotos no subcultivo, os explantes devem ser inoculados na posição horizontal no meio de cultura WPM para obtenção de quantidades significativas de citral, além de teores consideráveis de limoneno e β -cariofileno na fração volátil.
- Concentrações de nitrogênio acima de 60 mM apresentam efeito inibidor na síntese de constituintes voláteis *in vitro* e afetam o crescimento das plântulas.
- Na aclimatização indica-se o substrato comercial Plantmax®.
- Folhas de *A. triphylla* apresentam consideráveis diferenças quantitativas nos teores de limoneno e citral em plantas cultivadas em campo, casa de vegetação e cultivadas *in vitro*.

AGRADECIMENTOS: FAPEMIG, CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ARGYROPOULOU, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; FASSEAS, C.; POLISSIOU, M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 831-837, Dec. 2007.
- ASSIS, K. C. de. **Propagação in vitro de *Anacardium othonianum* rizz., uma espécie frutífera e medicinal do cerrado**. Jataí: Universidade Federal de Goiás, 2010.
- BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, SC. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- BRANT, R. DA S.; BRASIL, J. E. P. P.; KELLY, S. V. B.; SILVA, A. DA; ALBUQUERQUE, C. J. B. Teores do óleo essencial de cidrão [*Aloysia triphylla* (L' hérit) Britton (Verbenaceae)] em diferentes horários de colheita e processamentos pós-colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 2065-2068, 2009. Especial.
- CARNAT, A.; CARNAT, A. P.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 44-49, Feb. 1999.
- COSTA, ANDRÉA S.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; BLANK, ARIE F.; MMENDONÇA, A. B. de; AMANCIO, VERÔNICA, F.; LEDO, ANA da S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 68-72, jan./mar. 2007.

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

DEMYTTENAERE, J. C. R.; HERRERA, M. DEL C.; KIMPE, N. DE. Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* **Phytochemistry**, v. 55, n. 4, p. 363-373, Oct. 2000.

EL-HAWARY, S. S.; YOUSIF, M. F.; ABDEL MOTAAL, A. A.; ABD-HAMEED, L. M. Bioactivities, phenolic compounds and *in-vitro* propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo, v. 50, n. 1, p. 1-6, June 2012.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistemas de análises de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras: UFLA, 2002.

FLÔRES, A. V.; REINIGER, LIA R. S.; CURTI, A. R. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.

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

GIL, A.; BAREN, C. M. van; LEO LIRA, P. M. DI; BANDONI, A. L. Identification of the genotype from the content and composition of the essential oil of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Bueno Aires, v. 55, n. 21, p. 8664-8669, Sept. 2007.

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

GOMES, P. A.; SOUZA, M. F. DE; SOUZA JÚNIOR, I. T. de; CARVALHO JUNIOR, W. G. O.; FIGUEIREDO, L. S. de; MARTINS, E. R. Influência do sombreamento na produção de biomassa , óleo essencial e quantidade de tricomas glandulares em cidrão (*Lippia citriodora* Lam .). **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 4, p. 9-14, dez. 2009.

JESUS, A. M. S.; CARVALHO, S. P. de; VILLA, F.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M. Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 6, p. 431-436, nov./dez. 2010.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. DE C. S.; GONÇALVES, A. N.; DIAS, C. T. DOS S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L . B . Sm . cultivada in vitro. **Hoehnea**, Água Funda, v. 34, n. 1, p. 59-66, 2007.

KIM, N.-S.; LEE, D.-S. Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 1-2, p. 96-100, Jan. 2004.

KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. **Advances in Chromatography**, v. 1, p. 229-247, 1965.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura , concentração de aib e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, jun. 2009.

LLOYD, G. B.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of moutain (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **Proceedings of the international Plant Propagators Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-437, 1980.

MACHADO, M. P.; CIOTTA, M. N.; DESCHAMPS, C.; ZANTTE, F.; COCCO, L. C.; BIASI, L. A. Propagação *in vitro* e caracterização química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* cultivada no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 283-289, fev. 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

MUSARURWA, H. T.; KOEGELENBERG, L.; MAKUNGA, N. P. Chemical variation in essential oil profiles detected using headspace solid-phase microextraction gas chromatography spectrometry in response to potassium, nitrogen, and water available to micropropagated plants of *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, n. 2, p. 207-220, Sept. 2012.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. Topic detection and tracking evaluation. 2008. Disponível em : <[http: www.nist.gov/speech/test/tdt/](http://www.nist.gov/speech/test/tdt/)>. Acesso em: 03 jul. 2012.

REIS, É. S.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA ROSADO, L. D.; 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**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, maio 2009.

ROJAS, J.; PALACIOS, O.; RONCEROS, S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. **Revista Peruana de Medicina Experimentalis y Salud Publica**, Lima, v. 29, n. 1, p. 61-68, mar. 2012

SUZUKI, R. M.; ALMEIDA, V. de; PESCADOR, R.; FERREIRA, D. M. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, Água Funda, v. 37, n. 4, p. 731-742, dez. 2010.

ZUZARTE, M. R.; DINIS, A. M.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. R.; CANHOTO, J. M. Trichomes, essential oil and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**. v. 32, p. 580-587, 2010.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botânica Brasileira**, Feira de Santana, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

ARTIGO 2

EFEITO DE FATORES QUÍMICOS E FÍSICOS NO CULTIVO *IN VITRO*

DE *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton

**Giselly Mota da Silva¹ Suzan Kelly Vilela Bertolucci¹ José Eduardo Brasil
Pereira Pinto¹ Joyce Pereira Alvarenga¹**

¹Setor de Plantas Medicinais, Departamento de Agricultura, Universidade
Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, CEP 37200-000
Email: gisellymota@yahoo.com.br

Preparado Segundo a Norma NBR 6022:2003

RESUMO

A micropropagação é uma alternativa para a produção comercial de plantas medicinais, no entanto alguns fatores de ordem física e química podem afetar a etapa de desenvolvimento e enraizamento das plântulas. Portanto, objetivou-se estudar a influência de fatores químicos e físico no crescimento e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *Aloysia triphylla*. Dentre os fatores químicos foram avaliadas duas citocininas nas concentrações de 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L⁻¹ para TDZ e 0, 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ para BAP e doses de sacarose 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. O fator físico avaliado foi intensidades luminosas (13; 28; 47 e 69 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Observou-se um efeito negativo das citocininas no crescimento e enraizamento das plântulas. A adição de sacarose de 40 g L⁻¹ no meio de cultura proporcionou menor porcentagem de brotos hiperidricados e melhor desenvolvimento das plântulas. Plântulas cultivadas na intensidade luminosa de 69 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ acumularam maior biomassa seca da parte aérea e raízes. No entanto, a adição de reguladores de crescimento na dosagem mínima utilizada aumentou o teor de citral nas plântulas. Resultado similar ocorreu com uso de sacarose a 30 mg L⁻¹ e na exposição das plântulas a uma intensidade de 69 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz. Portanto, para o cultivo *in vitro* de *A. triphylla* recomenda-se a inoculação de explantes em meio de cultura WPM suplementado com 40 g L⁻¹ de sacarose, os quais devem ser mantidos na sala de crescimento com 69 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz para o melhor crescimento e produção de limoneno e citral. Não há necessidade de suplementação de BAP ou TDZ para proliferação de múltiplas brotações.

Palavras-chave: micropropagação, plantas medicinais, citocininas, sacarose e constituintes voláteis.

**EFFECT OF CHEMICAL AND PHYSICAL FACTORS *IN VITRO*
CULTIVATION OF *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton**

ABSTRACT

Micropropagation is an alternative to production of medicinal plants; however some physics and chemistry factors can affect plantlet growth and rooting. The objective was study the influence of chemical and physical factors in the growth and volatile production of *Aloysia triphylla in vitro*. Among the chemical factors were evaluated two cytokinins types at concentrations of 0, 0.125, 0.250, 0.375 and 0.5 mg L⁻¹ TDZ and 0; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mg L⁻¹ of BAP and sucrose levels 5, 10, 20, 30 and 40 g L⁻¹. The physical factor was light intensities (13, 28, 47 and 69 $\mu\text{M m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). It was observed negative effect of cytokinins in growth and rooting of plantlet. Sucrose supplemented with 40 g L⁻¹ on culture medium resulted in a smaller percentage hyperhydricity shoots and better plantlet growth. Shoots growth in light intensity of 69 $\mu\text{M m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ accumulated more shoots and roots dry biomass. However, supplementation of growth regulators used in minimum dosage increased citral content in plantlet. A similar result occurred with 30 g L⁻¹ sucrose and plantlet exposure to an intensity of 69 $\mu\text{M m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ of light. Therefore, for *in vitro* culture of *A. triphylla* indicates the inoculation of explants in WPM supplemented with 40 g L⁻¹ sucrose with 69 $\mu\text{M m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light for better growth and limonene and citral production. For micropropagation the results demonstrated that is not necessary supplementation of BAP or TDZ for multiple shoots proliferation.

Keywords: micropropagation, medicinal plants, cytokinins, sucrose and volatile constituents.

1-INTRODUÇÃO

Aloysia triphylla (L'Hérit) Britton, conhecida popularmente como cidrão ou erva-luísa, é uma planta medicinal muito utilizada como antiespasmódico, sedativo, expectorante e digestivo (RAGONE et al., 2007; ROJAS et al., 2012). É um arbusto perene, que pode alcançar mais de 1,5 metros de altura, suas folhas são simples e exalam um intenso aroma de limão, devido ao acúmulo de óleo essencial rico em citral, ao qual se deve suas propriedades medicinais (GIL et al., 2007; GOMES et al., 2009).

A micropropagação tem auxiliado na produção comercial de plantas medicinais, através da propagação de mudas homogêneas e de qualidade, na conservação de germoplasma, além de selecionar o genótipo de interesse para a indústria farmacêutica (FLORES et al., 2009; MOSAVI, 2012). No entanto, alguns fatores no processo de micropropagação são de fundamental importância para as fases de multiplicação e enraizamento, os quais são indispensáveis para obtenção de novas mudas. Dentre os fatores estão o meio nutritivo, o balanço hormonal e a disponibilidade de luz (PASA et al., 2012).

Quanto aos meios nutritivos, seus componentes podem sofrer modificações específicas para cada espécie. O cultivo *in vitro* necessita de uma fonte exógena de carboidratos, os quais são adicionados ao meio de cultivo a um nível ótimo, pois acima ou abaixo do qual pode interferir no crescimento da planta. Os níveis de sacarose no meio nutritivo influenciam o desenvolvimento e diferenciação nos tecidos da plântula (LONDE et al., 2012; PIVETTA et al., 2010; SCHMILDT, et al., 2007).

Em muitas culturas *in vitro*, o crescimento e emissão de brotos são intensificados com a adição de citocininas ao meio de cultura. As citocininas estimulam a divisão celular, quando em concentrações elevadas, induzem a

proliferação de brotações e inibem a formação de raízes (FLORES et al., 2009; MACHADO et al., 2011).

No entanto, alguns componentes do meio de cultura, como níveis de sacarose e reguladores de crescimento, podem causar algumas desordens fisiológicas nas plantas. A hiperidricidade, anteriormente chamada de vitrificação, é uma desordem fisiológica que ocorre no cultivo *in vitro*, deixando as plantas com uma aparência inchada, coloração verde claro, folhas translúcidas e baixa relação número de células/ área. (VASCONCELOS, 2012; WHITEHOUSE, 2002).

A qualidade da luz é outro fator importante na micropropagação, sendo fundamental para as fases de multiplicação, enraizamento e crescimento da planta *in vitro* (BRAGA et al., 2009; PASA et al., 2012). Diferentes intensidades luminosas causam mudanças fisiológicas e morfológicas na plantas, e seu potencial vai depender de sua adaptação a esses diferentes níveis (RESENDE et al., 2011). Além de que, a iluminação adequada influencia na síntese de óleo essencial (GOMES et al., 2009).

Portanto, objetivou-se estudar fatores químicos (concentrações de citocininas e sacarose) e físicos (intensidade luminosa) no cultivo e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *Aloysia triphylla*.

2-MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG. Exsiccatas foram depositados no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras e corresponde ao número 19677.

Após a inoculação, todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas de luz, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (exceção para o experimento que avaliou diferentes níveis de luz).

As determinações das biomassa secas da parte aérea (BSPA) e da raiz (BSR) nos experimentos foram realizadas por secagem em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C, até peso constante, as quais foram expressas em miligramas (mg).

2.1-Efeito de citocininas no cultivo e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *A.triphylla*.

Segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento, foram inoculados horizontalmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura WPM suplementado com 2% de sacarose, 0,6 % de ágar e de diferentes concentrações de reguladores de crescimento. O pH foi aferido para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

Os reguladores de crescimento avaliados foram TDZ (thidiazuron) e BAP (6-benzilaminopurina) em experimentos individualizados. Para o TDZ avaliaram-se as concentrações de 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L^{-1} e para o BAP 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L^{-1} .

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado constituído de cinco repetições, com quatro tubos de ensaio contendo um explante por repetição. As variáveis de respostas foram número e comprimento das brotações, número e comprimento das raízes, porcentagem de hiperidricidade e necrose, biomassas seca da parte aérea e raízes e análise química dos constituintes voláteis. Para as análises químicas utilizaram-se 100 mg de folhas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro* com BAP e 30 mg com TDZ.

2.2-Efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *A.triphylla*.

Visando diminuir a porcentagem da hiperidricidade nas plântulas, segmentos nodais foram inoculados horizontalmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura WPM, suplementado com 0,6% de ágar e 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem.

O delineamento foi inteiramente casualizado sendo utilizados seis repetições com seis tubos de ensaio, contendo um explante por tubo. Foram avaliados a porcentagem de hiperidricidade de brotos, altura da maior brotação, número de brotos, comprimento da maior raiz, biomassas seca de brotos e de raízes e, análise química dos constituintes voláteis, empregando-se 65 mg da amostra.

2.3- Avaliação das condições de luminosidade na regeneração de segmentos nodais de *A. triphylla*.

O efeito das condições de luminosidade foi avaliado utilizando-se segmentos nodais de plântulas com 30 dias de cultivo *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL do meio de cultura WPM, contendo 2% de sacarose, acrescido de 0,6 % de ágar e o pH aferido em 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem.

Após inoculação, o material foi levado para sala de crescimento e mantido nas seguintes condições de luminosidade: 13; 28; 47 e 69 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, oriundas de lâmpadas fluorescente branca. Aos 45 dias avaliou-se o número e o comprimento das brotações, o número e o comprimento das raízes, o número de

folhas, as biomassas seca da parte aérea e das raízes e análise química dos constituintes voláteis, a partir de 80 mg da amostra.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições contendo seis tubos de ensaio com um explante por repetição.

2.4-Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância. Para os parâmetros químicos empregou-se a análise de regressão e para o experimento de parâmetro físico as médias foram comparadas ao teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Para variáveis necrose (BAP), número de raiz (BAP e TDZ) e biomassa seca da raiz (TDZ, BAP e sacarose), os dados foram transformados em $\sqrt{Y} + 0,5$. O programa estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2002) foi utilizado para o processamento dos dados.

2.5-Análise da fração volátil por HS-CG/EM

Amostras de folhas de *A. triphylla* foram coletadas de plântulas aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes níveis de reguladores de crescimento, sacarose e luz. As amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 39 ± 1 °C.

As análises químicas foram re-aliadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA. Para extração da fração volátil de *A. triphylla* empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, empregou-seo extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System* (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 110 °C durante 30 min,

temperatura de seringa a 120 °C. Foram utilizadas folhas secas, 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. A fração volátil foi analisada 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 a linha de transferência para o MS foram mantidas em 220 °C e 240 °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 240 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 270 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os constituintes da fração volátil foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos a co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C₈-C₂₀, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por (KOVÁTS, 1965) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Efeito de citocininas no cultivo *in vitro* de *A.triphylla*.

Independente da concentração de citocinina avaliada observou-se a emissão de brotos axilares em todos os tratamentos (Figura 1A). Os explantes inoculados aos meios com adição de TDZ emitiram maior número de brotos em comparação ao tratamento controle (0 mg L⁻¹) que emitiu em média 2 brotos/explante (Gráfico 1). O maior número de brotos, em média 4,5 brotos/explante, ocorreu na maior concentração avaliada (0,5 mg L⁻¹).



Figura 10. Plântulas de *Aloysia triphylla* cultivadas *in vitro*. A- diferentes concentrações de TDZ. B- diferentes concentrações de BAP. C- diferentes níveis de sacarose. D- diferentes intensidades luminosas.

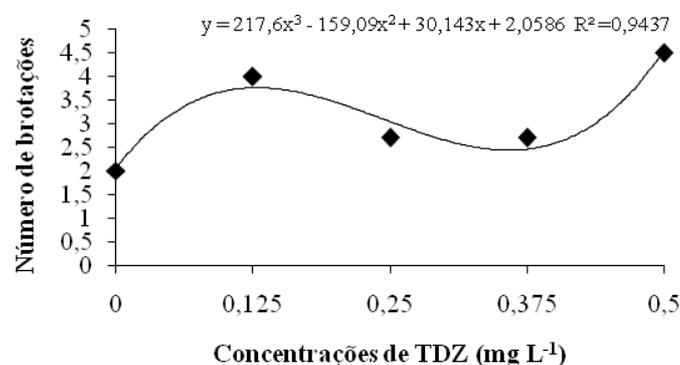


Gráfico 1. Número de botos de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

Já, a adição de 0,5 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura proporcionou um aumento no número de brotações em relação ao controle (Figura 1B- vide página 82). O número máximo de brotos (3,52 brotos) foi estimado na concentração de 0,64 mg L⁻¹. No entanto aumentando as dosagens ocorreu um decréscimo na emissão de brotos segundo o modelo quadrático, até alcançar seu menor valor na concentração de 2,0 mg L⁻¹ (Gráfico 2). Portanto, o TDZ mostrou-se mais eficiente que o BAP na emissão de brotos em *A. triphylla*. FLORES et al. (2009), verificaram que os meios acrescidos com 1 μM de TDZ proporcionaram maior emissão de brotações em plântulas do acesso BRA de *Pfaffia glomerata*, que aqueles onde foram adicionados a mesma concentração de BAP.

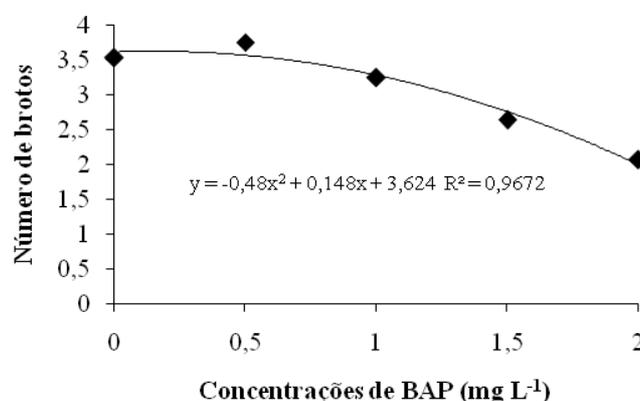


Gráfico 2. Número de brotos de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; ; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013.
*Significativo pelo teste F.

No entanto, a adição de TDZ ao meio de cultura causou hiperidricidade nos brotos (Gráfico 3). As maiores porcentagens de hiperidricidade foram observadas na menor (0,125 mg L⁻¹) e na maior concentração (0,5 mg L⁻¹) de TDZ avaliadas, com médias de 85,8% e 86,5%, respectivamente. Assim, como para as variáveis de respostas número e comprimento das brotações, a porcentagem de hiperidricidade apresentou um comportamento cúbico. Na dose de 0, 250 mg L⁻¹ de TDZ ocorreu redução da porcentagem de brotos hiperidricificados, aumentando novamente a cada 0,125 mg L⁻¹ adicionado ao meio. Plântulas desenvolvidas na ausência de TDZ não hiperidrificaram. De acordo com VASCONCELOS et al. (2012), reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultura podem desencadear a hiperidricidade dos brotos, principalmente quando empregadas em altas concentrações.

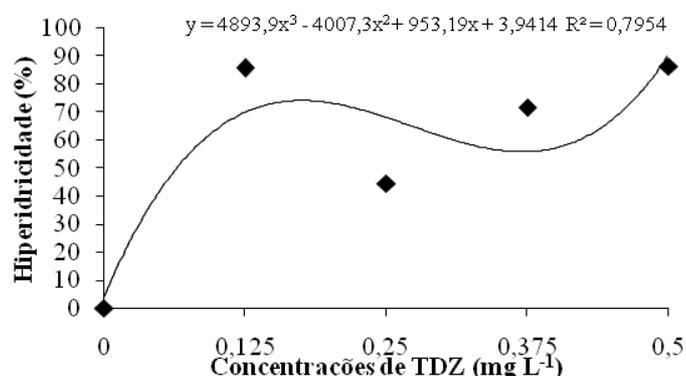


Gráfico 3. Porcentagem de hiperidricidade em botos de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

A adição de TDZ e BAP reduziu o crescimento dos brotos (Gráficos 4 e 5). Na ausência de TDZ os brotos alcançaram em média uma altura de 8,4 cm, com a adição de 0,125 mg L⁻¹ de TDZ ao meio os brotos cresceram a uma altura média de 3,2 cm, e na maior concentração (0,5 mg L⁻¹) os brotos chegaram, em média, a 1,0 cm de altura. A suplementação de BAP ao meio de cultura também inibiu o alongamento das brotações de *A. triphylla*, o qual apresentou um comportamento linear decrescente com o aumento das concentrações de BAP. A adição dessas duas citocininas ao meio de cultura também reduziu o comprimento de brotos de *Pfaffia glomerata* (FLORES et al., 2009) e, em *Alpinia purpurata*, o TDZ induziu brotos poucos alongados (VICTÓRIO et al., 2008).

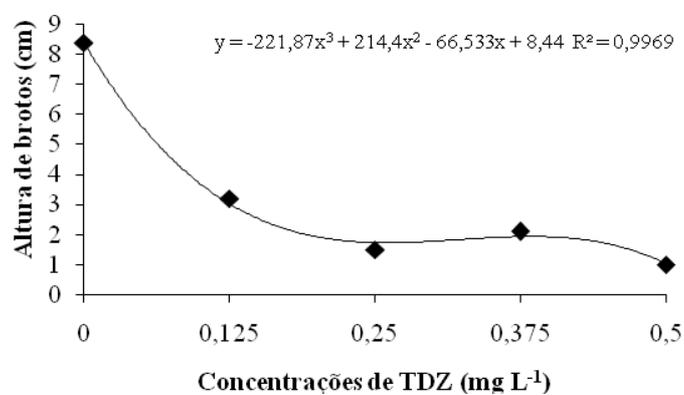


Gráfico 4. Altura de brotos (cm) de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

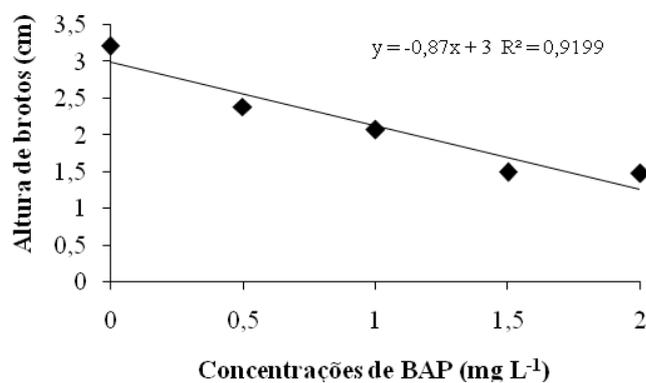


Gráfico 5. Altura de brotos (cm) de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

A adição de citocinina também influenciou o acúmulo de biomassa seca da parte aérea. Na ausência de TDZ as plântulas acumularam em média 55,5 mg

de biomassa seca, reduzindo de 46,1 mg para 15,3 mg, nas doses mínima e máxima de TDZ avaliadas (Gráfico 6).

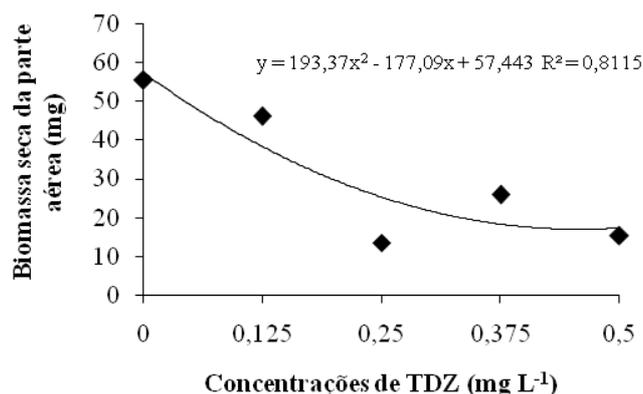


Gráfico 6. Biomassa seca da parte aérea de plântulas de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013.
*Significativo pelo teste F.

Com relação ao BAP, a biomassa seca da parte aérea decresceu linearmente à medida que suas concentrações foram aumentadas no meio de cultura (Gráfico 7). MURTI et al. (2012), verificou que o aumento na concentração de TDZ proporcionou maior acúmulo de biomassa seca em brotos de *Fragaria × ananassa* (morango). ASMAR et al. (2011), também observaram um aumento na massa seca de plântulas de *Mentha piperita* L., ao aumentar a concentração de BAP no meio de cultura.

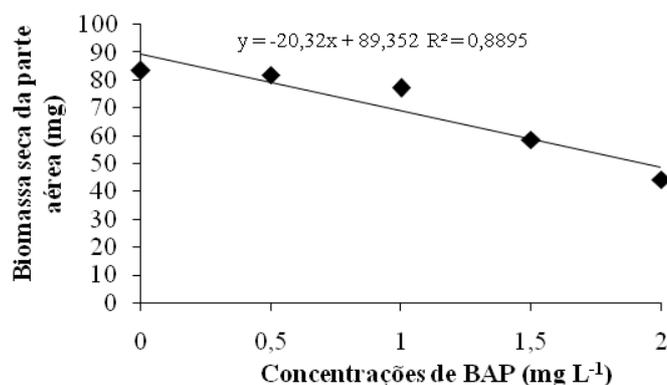


Gráfico 7. Biomassa seca da parte aérea de plântulas de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013.
*Significativo pelo teste F.

A adição de ambas citocininas ao meio causou necrose de alguns brotos (Gráficos 8 e 9), pois na ausência desses reguladores não houve plântulas necrosadas. No entanto, à medida que as concentrações de TDZ e BAP ao meio foram aumentadas, aumentaram-se as porcentagens de brotos necrosados. No entanto, o TDZ na maior dose utilizada (0,5 mg L⁻¹) apresentou maior porcentagem de brotos necrosados (44,1%), enquanto que no BAP, a ocorrência de necrose ocorreu nos dois maiores níveis adicionados, os quais atingiram porcentagem de necrose de 18,5% e 34,5% nas doses de 1,5 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹, respectivamente.

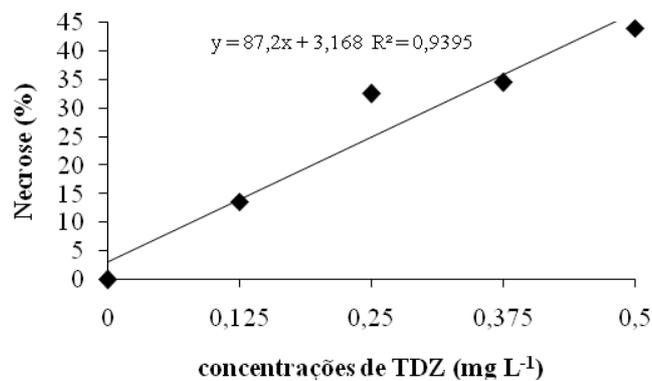
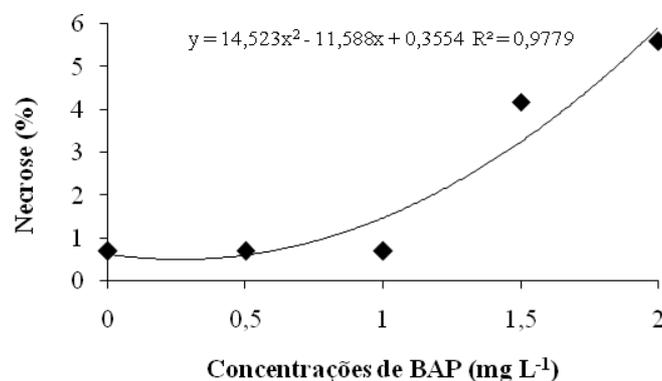


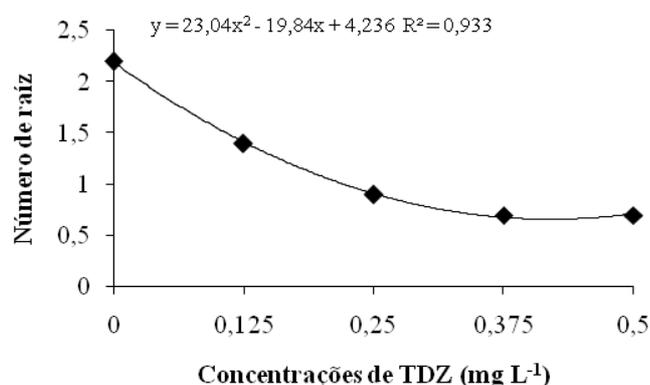
Gráfico 8. Necrose em botos de e *A.triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.



Valor transformado	Valor observado (%)
0,7	= 0
0,7	= 0
0,7	= 0
4,2	= 18,2
5,6	= 34,5

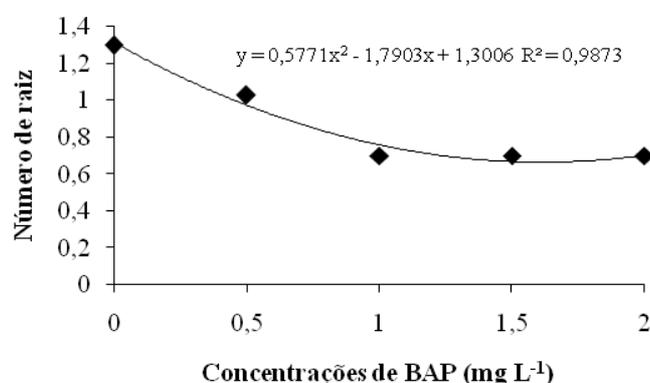
Gráfico 9. Necrose em botos de e *A.triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F. Dados transformados em $\sqrt{Y} + 0,5$. A tabela demonstra a correspondência entre os valores transformados e observados.

O número e a biomassa seca de raízes por planta também foi afetado pela adição de TDZ e BAP ao meio (Gráficos 10 e 11). Na ausência do TDZ e BAP ocorreu emissão, em média, de 4,5 e 1,3 raízes por plântula, respectivamente. No entanto, para ambas as citocininas houve redução na emissão de raízes nas doses de 0,125 mg L⁻¹ e 0,250 mg L⁻¹ de TDZ e 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Nas demais doses de TDZ e BAP avaliadas houve inibição na emissão de raízes.



Valor transformado	Valor observado (%)
2,2	= 4,5
1,4	= 1,4
0,9	= 1,3
0,7	= 0
0,7	= 0

Gráfico 10. Necrose em botos de e *A.triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F. Dados transformados em $\sqrt{Y + 0,5}$. A tabela demonstra a correspondência entre os valores transformados e observados.



Valor transformado	=	Valor observado (%)
1,9	=	3,1
1,6	=	2,2
0,9	=	0,3
0,7	=	0
0,7	=	0

Gráfico 11. Número de raízes em botos de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F. Dados transformados em $\sqrt{Y} + 0,5$. A tabela demonstra a correspondência entre os valores transformados e observados.

Consequentemente, resultados similares ao número de brotações foram observados para biomassa seca das raízes (Gráficos 12 e 13). Esses resultados indicam que altas concentrações de TDZ e BAP inibem a formação de sistema radicular em plântulas de *A. triphylla*. Corroborando com o presente estudo, MURTI et al. (2012) observaram que a emissão de raízes em plântulas de *Fragaria* × ananassa (morango) foram aumentando até um nível ótimo de TDZ, a partir desse nível um aumento na concentração desse regulador passou a inibir a emissão de raízes.

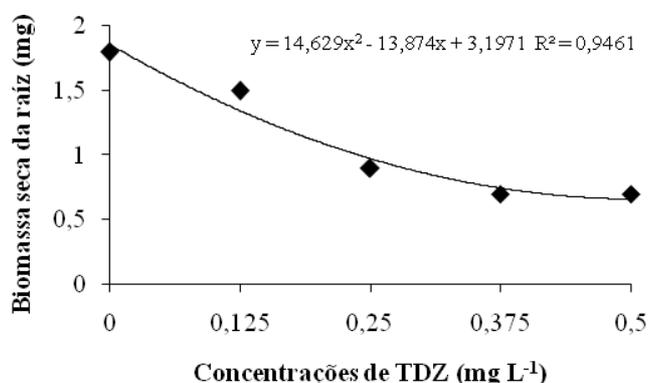
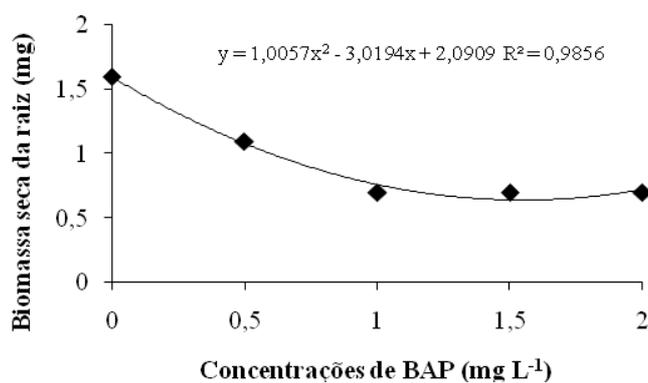


Gráfico 12. Biomassa seca de raízes de plântulas de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de TDZ: 0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013.* Significativo pelo teste F. Dados transformados em $\sqrt{Y} + 0,5$.



Valor transformado	=	Valor observado (%)
1,6	=	2,1
1,1	=	0,8
0,7	=	0
0,7	=	0
0,7	=	0

Gráfico 13. Biomassa seca de raízes de plântulas de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013.* Significativo pelo teste F. Dados transformados em $\sqrt{Y} + 0,5$. A tabela demonstra a correspondência entre os valores transformados e observados.

Análises químicas por HS-CG/EM demonstraram diferenças na composição química qualitativa e quantitativa das folhas secas de plântulas de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de TDZ e BAP (Tabelas 1 e 2). Para o TDZ foram identificados 7 constituintes químicos que representaram mais de 95,72% da composição química da fração volátil.

Tabela 1. Constituição química de plântulas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de TDZ (0; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 mg L⁻¹). UFLA, Lavras, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	Concentrações de TDZ (mg L ⁻¹)				
		0	0,125	0,250	0,375	0,5
		Área % ± DP				
6-metil-5-hepten-2-ona	987	tr	tr	nd	nd	nd
limoneno	1029	42,16±1,20	32,07±0,44	37,60±5,75	44±3,18	45±5,69
neral	1241	9,84±1,02	13,87±0,07	11,06±2,31	7,40±1,02	tr
geranial	1271	21,08±2,53	35,63±2,03	28,88±5,45	21,14±1,75	17,06±3,78
β-cariofileno	1424	15,59±0,78	10,81±0,78	15,48±1,30	17,77±0,81	19,04±1,30
α-curcumeno	1486	8,12±0,77	5,27±0,06	6,99±0,71	9,68±0,40	9,42±0,92
β-curcumeno	1515	Nd	tr	nd	nd	5,21±0,15
Total identificado (%)		96,79	97,65	100	100	95,72

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (n = 2). nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%).

Os constituintes majoritários das cinco concentrações de TDZ avaliadas foram o limoneno, o citral (neral + geranial) e o β-cariofileno. Desses constituintes, verificou-se que o teor de citral na concentração de 0,125 mg L⁻¹ e 0,250 mg L⁻¹ de TDZ (49,5±2,10% e 39,94±7,76%), aumentou expressivamente em relação aos tratamentos controle e demais concentrações de TDZ (17,06±3,78% a 30,92±3,55%). Nos tratamentos suplementados com TDZ, nas doses superiores a 0,125 mg L⁻¹, observou-se diminuição dos teores de neral e geranial com o aumento das doses, sendo que na maior dose de TDZ (0,500

mg.L⁻¹) o teor de neral foi reduzido para quantidades traço ($\leq 0,01\%$). O contrário ocorreu com o teor de β -cariofileno nos tratamentos suplementados com TDZ, na menor concentração de TDZ o teor desse constituinte foi menor ($15,59\pm 0,78\%$) e na maior concentração foi observado o maior teor de β -cariofileno ($19,04\pm 1,30\%$).

A análise da fração volátil para diferentes concentrações de BAP está demonstrada na tabela 2. Foram identificados 14 constituintes químicos, o dobro encontrado nas plântulas desenvolvidas no meio contendo TDZ, que correspondem à mais de 95,70% da composição total.

Tabela 2. Constituição química de plântulas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹). UFLA, Lavras, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)				
		0	0,5	1,0	1,5	2,0
Área % \pm DP						
1-octen-3-ol	977	2,41 \pm 0,62	1,84 \pm 0,72	2,37 \pm 0,24	tr	tr
6-metil-5-hepten-2-ona	987	4,62 \pm 0,83	4,46 \pm 1,64	3,80 \pm 0,19	4,01 \pm 0,07	4,96
limoneno	1029	37,69 \pm 4,16	27,75 \pm 7,68	36,84 \pm 0,48	40,82 \pm 1,65	33,59 \pm 1,88
linalol	1101	nd	tr	nd	nd	tr
pseudolimoneno	1229	nd	nd	nd	nd	tr
neral	1242	11,78 \pm 1,63	17,50 \pm 4,37	13,03 \pm 0,17	12,99 \pm 1,40	14,98 \pm 1,18
cis-geraniol	1255	nd	nd	nd	nd	tr
geranial	1271	20,93 \pm 3,16	28,08 \pm 6,30	22,99 \pm 0,68	24,26 \pm 3,11	26,81 \pm 2,35
acetato de nerila	1386	tr	tr	nd	nd	tr
β -cariofileno	1424	13,43 \pm 1,20	11,90 \pm 0,18	13,18 \pm 0,88	13,64 \pm 1,93	12,99 \pm 1,29
α -curcumeno	1486	4,98 \pm 0,31	4,22 \pm 0,23	4,51 \pm 0,35	tr	3,86 \pm 0,30
biciclogermacreno	1498	tr	tr	tr	nd	nd
β -curcumeno	1515	1,53 \pm 0,12	tr	1,96 \pm 0,47	nd	nd
óxido de cariofileno	1590	tr	tr	nd	nd	nd
Total identificado (%)		97,56	95,75	98,69	95,70	97,07

^aÍndice de retenção relativo a série *n*-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (*n* = 2). nd = não detectado; tr = traço ($\leq 0,01\%$).

O maior teor de citral foi observado na menor concentração utilizada ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), com uma teor médio de 45,58%. Esse resultado foi semelhante ao encontrado nos níveis de TDZ, onde o maior teor médio de citral foi detectado na menor concentração do regulador de crescimento, indicando que as citocininas em baixa concentrações podem favorecer a síntese *in vitro* de citral em plântulas de *A. triphylla*.

Apesar de detectados poucos constituintes na adição de reguladores ao meio de cultura, verificou-se a presença dos constituintes considerados majoritários em quantidades expressivas.

3.2-Efeito de diferentes concentrações de sacarose na redução da hiperidricidade e desenvolvimento de plântulas de *A. triphylla*.

A dosagem de 20 g L^{-1} de sacarose intensificou a porcentagem de plântulas hiperídricas (Gráfico 14). A partir desta concentração a porcentagem de hiperidricidade decresceu, indicando que a dosagem máxima utilizada (40 g L^{-1}) proporcionou maior número de plântulas sem esta desordem fisiológica. Esse resultado corrobora com WHITEHOUSE et al. (2002), que afirmaram que o aumento nos níveis de carboidratos podem minimizar os efeitos da hiperidricidade.

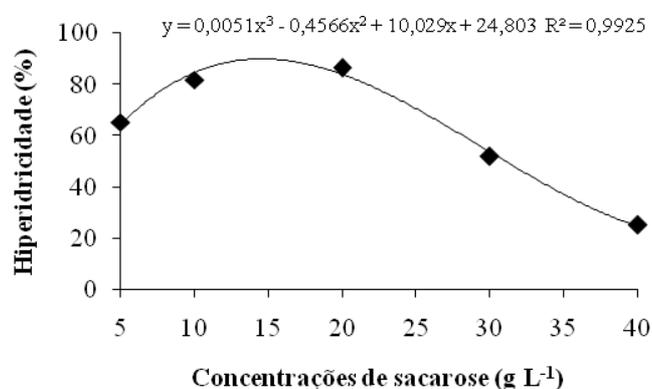


Gráfico 14. Porcentagem de hiperidricidade em brotos de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

Outras características foram observadas, no sentido de assegurar a melhor dosagem de sacarose no desenvolvimento *in vitro* da espécie. Verificou-se que os explantes emitiram maior quantidade de brotos com o aumento na concentração de sacarose até 20 g L⁻¹ (Gráfico 15). A partir desta concentração a emissão de brotos foi reduzida, isso pode ser devido à hiperidricidade, pois esta desordem proporciona uma maior liberação de brotos (VASCONCELOS et al., 2012).

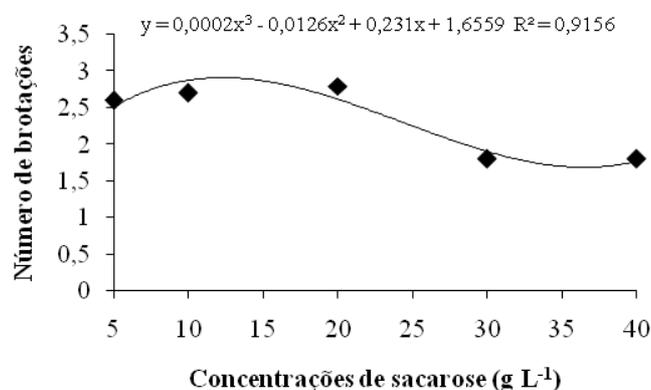


Gráfico 15. Número de brotações de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. Significativo ao nível de 5% pelo teste F.

As plântulas apresentaram respostas quadráticas para as variáveis de respostas altura da maior brotação, biomassa seca da parte aérea, número de raízes e comprimento da raiz principal, havendo uma tendência de aumento nas maiores concentrações avaliadas. No que se refere à altura das brotações (Gráfico 16 e Figura 1C- vide página 82), a altura máxima foi estimada na concentração de 36,6 g L⁻¹. De acordo com VASCONCELOS et al. (2012), a hiperidricidade causa encurtamento nos entrenós, causando hipertrofias no caule, o que pode explicar a menor altura dos brotos nas menores concentrações de sacarose.

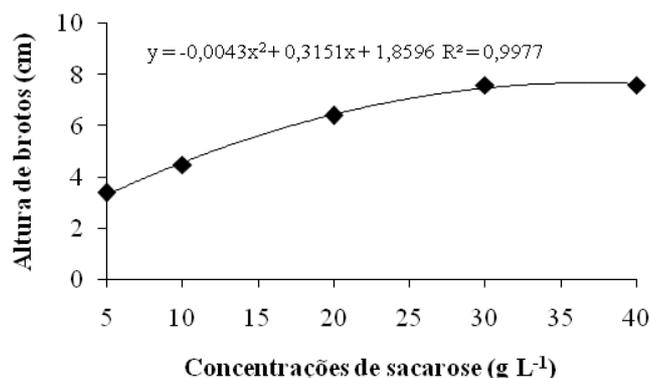


Gráfico 16. Altura da maior brotação de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

Quanto a biomassa seca da parte aérea (Gráfico 17), plântulas com menor média de peso seco (49 mg) foi encontrado na concentração mais baixa (5 g L⁻¹), o que pode ser devido a grande porcentagem de brotos hiperidricados, e a maior média de biomassa seca (154,9 mg) foi estimada na dosagem de 34,1 g L⁻¹. Este resultado é similar àqueles observados por NICOLOSO et al. (2003). Estes autores verificaram que *Panax ginseng* C.A. Meyer acumulou maior biomassa na presença de 30 g L⁻¹. No entanto na dosagem de 40 g L⁻¹, ocorreu um pequeno decréscimo no acúmulo de biomassa da parte aérea das plântulas (149,7 mg), mesmo com baixas porcentagem de hiperidricidade. Para PIVETTA et al. (2010), o excesso de sacarose pode prejudicar o metabolismo das plântulas, pois inibe a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética das culturas.

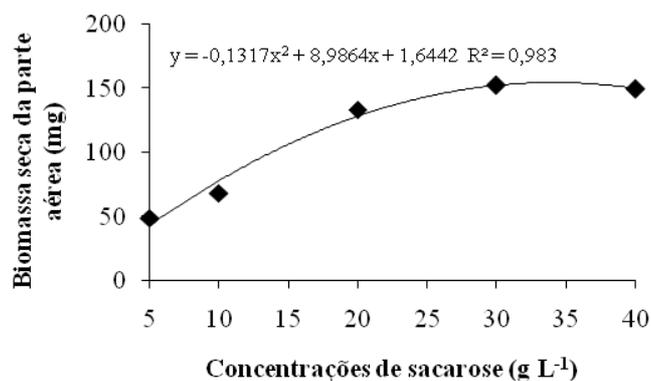


Gráfico 17. Biomassa seca de plântulas de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

O número de raiz também foi influenciado pelo aumento na dosagem de sacarose (Gráfico 18), sendo crescente com o aumento na concentração desse carboidrato no meio até 33,86 g L⁻¹. No entanto, aumentando as doses para 40 g L⁻¹, ocorreu diminuição na emissão de raízes. SCHMILDT et al. (2007) observaram que concentrações de carbono abaixo ou acima das concentrações consideradas ótimas, podem ocorrer inibição na formação *in vitro* de raízes adventícias de *Carica papaya* L. híbrido 'Tainung 01'.

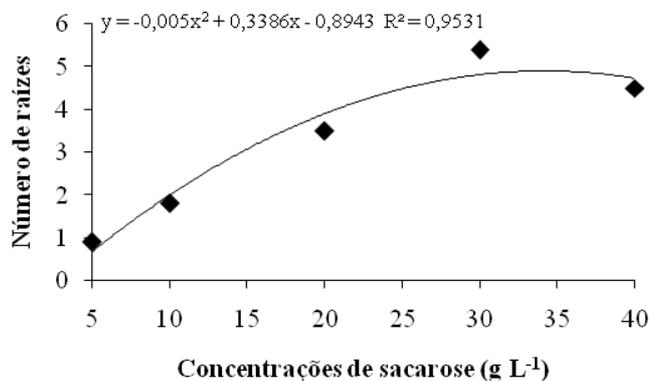


Gráfico 18. Número de raízes em plântulas de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.

O aumento na concentração de sacarose no meio proporcionou maior desenvolvimento da raiz principal (Gráfico 19), com média de 1,7 cm de comprimento na menor concentração (5,0 g L⁻¹) e atingindo 6,3 cm na dosagem máxima utilizada (40 g L⁻¹), sendo o maior comprimento estimado na concentração de 37,62 g L⁻¹ (6,4 cm), o que provavelmente pode ser devido ao efeito do carbono em proporcionar crescimento dos tecidos (CALVETE et al., 2002). Esse resultado pode ter afetado a biomassa seca das raízes, pois se verificou que quanto maior a concentração de sacarose no meio, maior acúmulo de biomassa do sistema radicular foi observado (Gráfico 20).

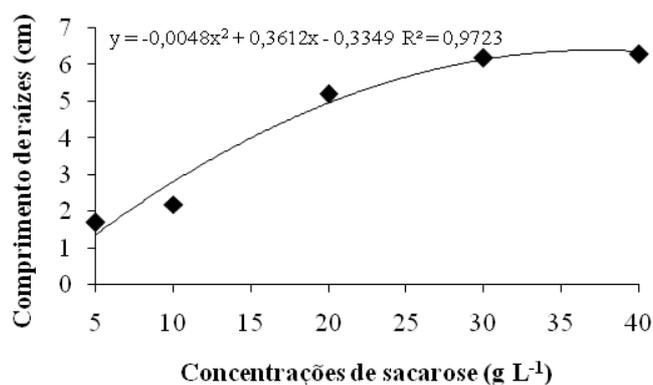
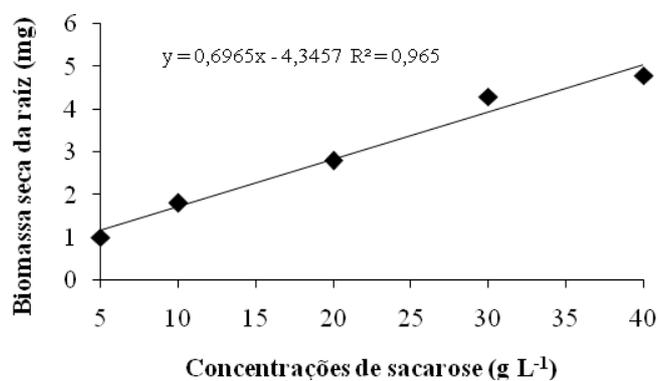


Gráfico 19. Comprimento da raiz principal de plântulas de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F.



Valor transformado	Valor observado (%)
1,0	= 0,5
1,3	= 1,2
3,0	= 8,0
4,4	= 19,2
4,8	= 22,5

Gráfico 20. Biomassa seca de raízes de plântulas de *A. triphylla* cultivadas em diferentes concentrações de sacarose: 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. UFLA, Lavras, 2013. *Significativo pelo teste F. Dados transformados em $\sqrt{Y + 0,5}$.

Como em todas as concentrações de sacarose avaliadas houve a presença de plântulas hiperidrificadas (H) e não hiperidrificadas (NH), a fim de estabelecer possíveis diferenças químicas em função dessa desordem fisiológica, as amostras das plântulas foram separadas em H e NH para as análises químicas.

Com relação à análise da fração volátil para plântulas desenvolvidas em diferentes concentrações de sacarose, foram identificados 13 constituintes químicos que representaram 100% da constituição química da fração volátil (Tabela 3). Os constituintes majoritários encontrados na ordem de eluição, limoneno, neral, geranial e β -cariofileno.

A comparação das análises em plantas não hiperidrificadas com as hiperidrificadas, identificaram diferenças qualitativas e quantitativas da fração volátil. Houve redução de cerca de 50% nos teores de 6-metil-5-hepten-2-ona entre plântulas normais e hiperidrificadas, considerando as concentrações de 10 a 40 g L⁻¹ de sacarose. Na concentração de 5 g L⁻¹ de sacarose esse constituinte não foi detectado nas plantas hiperidrificadas. Na concentração de 5 mg.L⁻¹ de sacarose também não foi detectado a presença de geranial nas plantas hiperidrificadas. Ainda na menor concentração utilizada (5 g L⁻¹) não se detectou a presença de neral em ambas as plântulas. E quanto a diferenças quantitativas verificou-se a detecção do *cis*-geraniol em plântulas não hiperidrificadas na concentração de 10 g L⁻¹, e do β -curcumeno nas plântulas hiperidrificadas na concentração de 40 g L⁻¹.

Tabela 3. Constituição química de plântulas de *A. triphylla* normais (N) e hiperidrificada (H) cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose (5; 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹).

PLANTA	CONSTITUINTES	IR ^a	CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE (g L ⁻¹)				
			5	10	20	30	40
			Área%				
N	E-3-penten-2-ona	-	5,78	nd	nd	nd	1,52
H			12,99	2,93	nd	nd	nd
N	1-octen-3-ol	977	3,72	4,20	3,29	nd	nd
H			7,52	3,53	nd	0,95	0,87
N	6-metil-5-hepten-2-ona	987	7,68	8,46	7,59	4,40	4,47
H			nd	3,86	3,13	2,82	2,49
N	limoneno	1028	49,70	42,62	43,12	40,44	35,83
H			60,56	50,82	35,34	34,98	30,11
N	linalol	1101	nd	2,18	nd	nd	nd
H			nd	nd	nd	nd	0,82
N	neral	1242	nd	8,50	8,76	13,35	13,27
H			nd	8,32	13,25	14,30	11,48
N	cis-geraniol	1255	nd	1,18	nd	nd	nd
H			-	-	-	-	-
N	geranial	1271	6,39	14,21	14,51	25,48	23,07
H			nd	14,68	25,21	29,84	24,00
N	acetato de nerila	1386	nd	1,23	nd	nd	nd
H			nd	nd	nd	1,64	1,31
N	β-cariofileno	1424	19,19	10,81	16,25	12,46	15,14
H			11,30	11,30	17,20	11,43	18,13
N	α-curcumeno	1486	7,54	4,58	6,48	3,87	4,80
H			4,58	4,58	5,86	4,03	5,36
N	biciclogermacreno	1499	-	-	-	-	-
H			nd	nd	nd	nd	2,77
N	β-curcumeno	1515	nd	2,02	nd	nd	1,89
H			nd	nd	nd	nd	2,68
Total identificado N (%)			100	100	100	100	100
Total identificado H (%)			100	100	100	100	100

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (n = 1). nd = não detectado; tr = traço (≤0,01%).

Entre as diferenças quantitativas mais consideráveis destacam o maior teor de citral (N- 38,83%, H-44,14%). O limoneno (N-49,70%, H-60,56%) e o β-cariofileno (N- 19,19%, H-11,30%) foram detectados em maior teor em

plântulas cultivadas com 5 g L⁻¹ de sacarose, e a concentração de 10 g L⁻¹ favoreceu um maior teor para o 6-metil-5-hepten-2-ona.

3.3- Avaliação das condições de luminosidade na regeneração de segmentos nodais de *A. triphylla*.

As plântulas de *A. triphylla* sofreram influência das diferentes intensidades luminosas para a maioria das variáveis analisadas (Tabela 4). Para número de brotações não houve diferenças significativas para as intensidades de luz avaliadas. No entanto, as maiores plântulas foram àquelas desenvolvidas nas duas maiores intensidades (47 e 69 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) com altura média de 6,8 e 7,0 cm, respectivamente (Figura 1D- vide página 82). A intensidade de 69 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ também proporcionou maior número de folhas por plântulas, o que pode ser favorável, já que o óleo essencial da espécie está acumulado em suas folhas (GIL et al., 2007). Nesta intensidade também houve maior acúmulo de biomassa seca da parte aérea, com peso médio de 221,4 g.

Tabela 4. Número de broto (NB), tamanho do maior broto (TMB-cm), número de folhas (NF) e biomassa seca da parte aérea (BSPA) em brotações de *A. triphylla* com 45 dias de cultivo, exposta a diferentes intensidades luminosas. UFLA, Lavras, 2013

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	NB	TMB	NF	BSPA
13	2,8 a	4,1 c	16,5 c	85,6 c
28	2,9 a	5,4 b	26,1 b	160,9 b
47	3,2 a	6,8 a	27,0 b	167,4 b
69	3,2 a	7,0 a	30,4 a	221,4 a

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância.

As diferentes intensidades luminosas também influenciaram o desenvolvimento radicular de plântulas de *A. triphylla*, pois apresentaram efeito semelhante àquele observado para o número de brotos (Tabela 5). Não houve diferenças estatísticas para o número de raízes. No entanto, as maiores

intensidades (47 e 69 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) proporcionaram maior desenvolvimento da raiz principal, com média de 4,2 e 4,5 cm de comprimento, respectivamente.

A intensidade de 69 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ favoreceu maior acúmulo de biomassa seca do sistema radicular. As menores intensidades luminosas inibiram o crescimento do sistema radicular de *A. triphylla in vitro*. A luz utilizada na cultura de tecidos é um dos fatores que interferem na multiplicação e enraizamento *in vitro* da plântula, e muitas vezes não favorece a indução e desenvolvimento de raízes (PASA et al., 2012; RADMANN et al., 2003).

Tabela 5. Número de raiz (NR), comprimento da raiz principal (CRP-cm) e biomassa seca da raiz (BSR) de brotações de *A. triphylla* com 45 dias de cultivo, exposta a diferentes intensidades luminosas. UFLA, Lavras, 2013.

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	NR	CRP	BSR
13,14	2,9 a	2,8 b	5,3 c
27,79	3,6 a	2,9 b	11,3 b
47,03	3,8 a	4,2 a	17,2 b
69,00	3,9 a	4,5 a	22,6 a

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância.

A qualidade da luz na micropropagação é fundamental para multiplicação, enraizamento e crescimento da planta *in vitro* (BRAGA et al., 2009; PASA et al., 2012). Sendo assim, a avaliação de diferentes intensidades de luz é um fator importante no crescimento e desenvolvimento do vegetativo, pois seu êxito depende da sua adaptação a um determinado nível de luz (RESENDE et al., 2011).

A análise da fração volátil identificou a presença de 19 constituintes químicos, representando mais de 98,95% da composição total. Os constituintes majoritários foram limoneno, o citral (neral + geranial) e o β -cariofileno (Tabela 6).

Verificou-se que o teor de citral (25,46%; 30,03%; 33,45% e 36,18%), respectivamente, apresentou uma tendência de aumento com o aumento dos níveis de luz. O mesmo foi observado para o 6-metil-5-hepten-2-ona. Já para os constituintes minoritários α -zingibereno, biciclogermacreno e β -curcumeno, à medida que os níveis de luz aumentaram, seus teores diminuíram discretamente.

De acordo com GOMES et al. (2009), o cidrão é adaptável à ambientes luminosos, e uma luminosidade adequada influenciará o teor de óleo essencial da planta.

Tabela 6. Constituição química de plântulas de *A. triphylla* cultivadas *in vitro* em diferentes diferente intensidade de luz (13; 28; 47 e 69 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). UFLA, Lavras, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	NÍVEIS DE LUZ ($\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)			
		13	28	47	69
Área%±DP					
E-3-penten-2-ona	a	0,43±0,13	1,38±0,07	0,62±0,16	0,69±0,16
1-octen-3-ol	977	4,59±0,77	2,70±0,66	2,19±0,50	1,96±0,56
6-metil-5-hepten-2-ona	987	2,95±0,36	3,04±0,51	3,68±0,33	5,23±1,92
mirreno	991	tr	tr	tr	tr
limoneno	1029	31,69±1,21	32,01±1,95	33,30±3,51	31,03±3,44
linalol	1101	1,23±0,05	1,17±0,12	1,23±0,07	1,51±0,41
trans-verbenol	1183	tr	0,59±0,01	0,74±0,11	0,72±0,23
pseudolimoneno	1229	0,73±0,15	0,59±0,00	0,53±0,06	tr
neral	1242	9,35±0,48	11,17±1,20	12,32±1,86	13,24±2,42
cis-geraniol	1255	1,11±0,13	1,02±0,25	1,02±0,10	0,94±0,19
geraniol	1271	16,11±1,35	18,86±2,52	21,13±2,86	22,94±4,01
acetato de nerila	1386	1,09±0,09	1,25±0,08	1,35±0,10	1,25±0,07
β -cariofileno	1424	14,61±0,66	14,50±0,98	11,95±1,86	11,72±2,22
α -humuleno	1460	0,53±0,04	0,52±0,04	tr	tr
α -curcumeno	1486	6,89±0,17	6,03±0,41	5,13±0,07	4,62±1,05
α -zingibereno	1497	1,45±0,04	1,09±0,29	1,07±0,28	0,86±0,65
biciclogermacreno	1500	2,76±1,43	0,81±0,14	0,66±0,25	nd
β -curcumeno	1515	2,25±0,33	1,49±0,38	1,12±0,44	1,02±0,32
óxido de cariofileno	1590	1,40±0,08	1,60±0,15	1,60±0,28	1,30±0,07
Total identificado (%)		99,19	99,80	99,44	98,95

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP = desvio padrão ($n = 3$). nd = não detectado; tr = traço ($\leq 0,01\%$).

a: identificação NIST.

3.5- CONCLUSÃO

Para o cultivo *in vitro* de *A. triphylla* indica-se a inoculação de explantes em meio de cultura WPM ausente de citocininas e à 40 g L⁻¹ de sacarose, os quais devem ser mantidos na sala de crescimento com 69 μmol m⁻².s⁻¹ de luz, para o melhor crescimento das plântulas e produção de elevados teores de limoneno e citral.

AGRADECIMENTOS: FAPEMIG, CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L .). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, p. 533-538, 2011. Especial.
- BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. DE; et al. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage□: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, mar./abr. 2009.
- CALVETE, E. O.; KAMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 20, n. 2, p. 186-191, jun. 2002.
- DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of chromatography**, v. 503, p. 1-24, 1990.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistemas de análises de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras: UFLA, 2002.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. . Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng .) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 292-299, 2009.

GIL, A.; BAREN, C. M. van; LEO LIRA, P. M. DI; BANDONI, A. L. Identification of the genotype from the content and composition of the essential oil of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Bueno Aires, v. 55, n. 21, p. 8664-8669, Sept. 2007.

GOMES, P. A.; SOUZA, M. F. DE; SOUZA JÚNIOR, I. T. de; CARVALHO JUNIOR, W. G. O.; FIGUEIREDO, L. S. de; MARTINS, E. R. Influência do sombreamento na produção de biomassa, óleo essencial e quantidade de tricomas glandulares em cidrão (*Lippia citriodora* Lam.). **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 4, p. 9-14, dez. 2009.

KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. **Advances in Chromatography**, v. 1, p. 229-247, 1965.

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 Luis, v. 6, n. 2, p. 67-78, 2012.

MACHADO, M. P.; LUÍS, A.; BIASI, L. A. Effect of plant growth regulators on *in vitro* regeneration of *Lavandula dentata* L. shoot tips. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. p. 28-31, Aug. 2011.

MOSAVI, A. A. The Optimization of Lemon Verbena (*Lippia citriodora*) Medicinal Plant Tissue Culture. **International Journal of Agronomy and Plant Production**, London, v. 3, n. 11, p. 561-565, 2012.

MURTI, R. H.; DEBNATH, S. C.; YEOUNG, Y. R. Effect of high concentration of thidiazuron (TDZ) combined with 1H-indole-3-butanoic acid (IBA) on Albion strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivar plantlets induction. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 80, p. 14696-14702, Oct. 2012.

NICOLOSO, F.; ERIG, A.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, jan./fev. 2003.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. Topic detection and tracking evaluation. 2008. Disponível em : <http: www.nist.gov/speech/test/tdt/>. Acesso em: 03 jul. 2012.

PASA, M. da S. et al. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta “xavante”. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, ago. 2012.

PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, I.; FARIA, R. T. de; TAKANE, R. J. Crescimento in vitro de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1897-1902, set. 2010.

RADMANN, E. B.; GONÇALVES, E. D.; FORTES, G. R. DE L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro , no enraizamento “in vitro” de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. Ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 124-126, abr. 2003.

RAGONE, M. I.; SELLA, M.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M. G.; CONSOLINI, A. E. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora* , Palau (South American cedr ´ on) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenums. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 258-266, Sept. 2007.

RESENDE, S. V.; CREPALDI, I. C.; PELACANI, C. R.; BRITO, A. L. Influência da luz e substrato na germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de *Calliandra Benth* . (MIMOSOIDEAE - LEGUMINOSAE) endêmicas da chapada diamantina, Bahia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 107-117, jan./fev. 2011.

ROJAS, J.; PALACIOS, O.; RONCEROS, S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. **Revista Peruana de Medicina Experimentalis y Salud Publica**, Lima, v. 29, n. 1, p. 61-68, mar. 2012.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sacarose na fase de enraizamento *in vitro* de mamoeiro "tainung 01". **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2007.

VASCONCELOS, A. G. V. de; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 837-844, maio 2012.

VICTÓRIO, C. P.; CRUZ, I. P. DA; SATO, A.; KUSTER, R. MACHADO; LAGE, C. L. S. Effects of auxins and cytokinins on *in vitro* development of *Alpinia purpurata* K. Schum and phenolic compounds production. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 55-110, 2008.

WHITEHOUSE, A. B.; MARKS, T. R.; EDWARDS, G. A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus axillary* shoot cultures grown in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, n. 3, p. 245-252, Dec. 2002.