



ANA PAULA RIBEIRO MEDEIROS

***Melissa officinalis* L.: CULTIVO COM ÁGUA
MAGNETIZADA, REGULADORES DE CRESCIMENTO E
ELICITORES AFETAM A PRODUÇÃO DE ÓLEO
ESSENCIAL**

LAVRAS-MG

2020

ANA PAULA RIBEIRO MEDEIROS

***Melissa officinalis* L.: CULTIVO COM ÁGUA MAGNETIZADA, REGULADORES DE
CRESCIMENTO E ELICITORES AFETAM A PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Manejo de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Prof^(a) Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2020**

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

Medeiros, Ana Paula Ribeiro.

Melissa officinalis L.: Cultivo com água magnetizada, reguladores de crescimento e elicitores afetam a produção de óleo essencial / Ana Paula Ribeiro Medeiros. - 2020.

92 p.: il.

Orientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Erva cidreira. 2. Irrigação magnetizada. 3. Indutores de resistência em plantas. I. Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. II. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. III. Título.

ANA PAULA RIBEIRO MEDEIROS

***Melissa officinalis* L.: CULTIVO COM ÁGUA MAGNETIZADA, REGULADORES DE CRESCIMENTO E ELICITORES AFETAM A PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL**

***Melissa officinalis* L.: CULTIVATION WITH MAGNETIZED WATER, GROWTH REGULATORS AND ELICITORS AFFECT ESSENTIAL OIL PRODUCTION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Manejo de Plantas Mediciniais, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 06 de março de 2020.

Dr. Alexandre Alves de Carvalho	UFLA
Dra. Luciane Vilela Resende	UFLA
Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA
Dr. Osmar Alves Lameira	EMBRAPA
Dra. Priscila Pereira Botrel	IFSULDEMINAS

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Prof^(a) Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Coorientadora

LAVRAS-MG

2020

AGRADECIMENTOS

Á Deus com sua infinita bondade para com todos nessa vida passageira, que nos inúmeros momentos de tribulações acalmou meu coração com sua natureza perfeita e pessoas amigas!

Aos meus pais Dulcinéia e Paulo Sérgio (*in memorian*) por terem me concebido e amado muito em cada gesto, palavras e silêncio, e me ensinado que a felicidade está na simplicidade do viver, pois somos eternos aprendizes nessa vida.

As minhas irmãs Lilian, Leidiane e Marcinha que independente da distância mantiveram-se perto de mim. Amo vocês eternamente!

A minha grande, amada, amiga e guerreira avó Maria Laura (*in memorian*) por toda dedicação e amor a mim concebido, sou eternamente grata a Deus por ter me concebido uma avó tão especial como essa! Meu amor é eterno por esse ser de Luz!

Aos meus tios pelo carinho e cuidados, em especial aos meus tios Marco Aurélio, Gerciléia, Antenor e Franciney, que com a ausência do meu pai são até hoje companheiros, amigos e ajudam dentro de suas possibilidades em todos os ramos da minha vida!

Ao meu namorado Juliano Jorge e seus pais Beatriz e Jorge Salgado pelos 10 anos de amizade, incentivo, paciência e companheirismo. Tudo que Deus faz é bom e vocês são obra Dele. Grata por tudo! Amo vocês.

As minhas irmãs e irmão paraenses Tainá, Fernanda, Diene, Raissa, Marlon, e em especial a minha queridona e amada Carol Germano que com sua bondade, companheirismo, profissionalismo, pedaladas, aventuras e pizzas deliciosas me fez desenvolver muito como pessoa e profissional, além de ficar bem alimentada (risos)! Vocês foram verdadeiros anjos que Deus colocou em minha vida. Grata a todos!

A querida e linda Terezinha Bello (*in memorian*) que Deus me presenteou em pouco tempo em Lavras com seu amor, cafezinhos da tarde e histórias que nos uniram de uma forma mágica nessa vida! Vozinha como você deveria ser eterna!

Aos amigos do horto de plantas medicinais e de Lavras Giulia Duarte, Leandro (Dico), Paulinho, Luiz Eduardo, Fatinha, Natália, Alan, Jéssica e Krisnanda pelo auxílio na condução dos experimentos e pelas brincadeiras descontraídas. Que Deus ilumine sempre vocês!

Aos Técnicos do Laboratório Annete e Evaldo pelo auxílio nas análises dos experimentos e boas conversas.

Ao Professor Dr. Osmar Alves Lameira, por ser um dedicado mentor profissional, compartilhando de forma paciente e elegante suas experiências de sucesso e de desafio. Sou eternamente grata por sua amizade e orientação, o senhor foi um diferencial na minha trajetória! Que Deus lhe ilumine sempre!

Ao meu orientador professor Dr. José Eduardo e co-orientadora Suzan Kelly pela orientação, paciência, dedicação e por sempre estarem dispostos a ajudar faça chuva ou faça sol, o que foi essencial para a execução e conclusão desta tese. Que Deus abençoe vocês!

A minha querida professora Luciane Vilela por seus generosos e acolhedores abraços materno, carinho e atenção. Deus lhe fortaleça e ilumine sempre!

Aos membros da banca examinadora, por dedicarem seu precioso tempo na melhoria deste trabalho.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG) pela oportunidade concedida para a realização do doutorado!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos. E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

MELISSA QUE TE QUERO BEM

No tempo de emoções

A natureza pintou Melissa para acalmar o coração

Nativa da Europa, Ásia e cultivada no Brasil

O chá de Melissa todo o mundo já consumiu

Melissa que Te Quero Bem

Igual a você não tem

Fácil de cultivar, usada no dia-a-dia para aliviar

Aliviar dor de cabeça, ansiedade e depressão

Todos os sentimentos que fazem apertar o coração

De uma beleza simples e singular

Com seus odores e sabores a natureza veio a te criar!

(Ana Paula Ribeiro Medeiros)

RESUMO

Melissa officinalis L. (Lamiaceae) é uma planta medicinal aromática com alto potencial econômico para as indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos, devido sua vasta aplicabilidade. O constituinte citral presente no seu óleo essencial e o ácido rosmarínico presente no extrato de suas folhas destacam-se nessa espécie, por suas atividades biológicas. Todavia, as condições de cultivo podem afetar a qualidade e quantidade do produto final dessa espécie. Assim, foram realizados três experimentos para avaliar o efeito de diferentes níveis de água magnetizada, elicitores e reguladores de crescimento na produção de matéria seca e nas características quantitativa e qualitativa do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. Para avaliar o efeito da água magnetizada, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4, com dois tipos de água (magnetizada e não magnetizada) e quatro níveis de irrigação 25, 75, 100 e 125% de evapotranspiração da cultura (ETc) e 4 repetições. Para avaliar o efeito dos reguladores de crescimento, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial com um tratamento adicional (3x3 + 1), com 4 repetições, sendo três níveis de reguladores de crescimento ANA (ácido naftaleno acético), BAP (benzilaminopurina), GA₃ (ácido giberélico), e quatro níveis de concentrações (0, 25, 50 e 100 mg L⁻¹), mais o tratamento adicional (água destilada + Tween 80). Para avaliar o efeito dos elicitores metil jasmonato (MJ), ácido salicílico (AS) e quitosana (QT), utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com diferentes concentrações de MJ (0, 0,5, 2 e 8mM), AS (0, 0,25, 0,5 e 1,0 mM) e QT (0, 2, 4 e 6 g L⁻¹). Os experimentos com água magnetizada e elicitores foram os que mais afetaram significativamente o acúmulo de matéria seca, os pigmentos fotossintéticos, o teor de fenóis totais e as proteínas solúveis, e o rendimento e a concentração dos constituintes citral (neral + geranial) e citronelal do óleo essencial. No experimento com os reguladores de crescimento, o BAP e o GA₃ foram os que mais favoreceram essas variáveis comparados ao ANA, sendo apenas inferior ao tratamento controle. Dessa forma, a aplicação das técnicas de irrigação com água magnetizada e pulverização via foliar de elicitores são favoráveis na produção agrícola de *M. officinalis*.

Palavras-chave: Erva cidreira. Irrigação magnetizada. Indutores de resistência em plantas.

ABSTRACT

Melissa officinalis L. (Lamiaceae) is an aromatic medicinal plant with high economic potential for the pharmaceutical, food and cosmetics industries, due to its wide applicability. The citral constituent present in its essential oil and the rosmarinic acid present in the extract of its leaves stand out in this species, for their biological activities. However, cultivation conditions can affect the quality and quantity of the final product of this species. Thus, three experiments were carried out to evaluate the effect of different levels of magnetized water, elicitors and growth regulators on the production of dry matter and on the quantitative and qualitative characteristics of the essential oil of *Melissa officinalis* L. To evaluate the effect of magnetized water, used a completely randomized design, in a 2 x 4 factorial scheme, with two types of water (magnetized and non-magnetized) and four levels of irrigation 25, 75, 100 and 125% of crop evapotranspiration (ETc) and 4 repetitions. To evaluate the effect of growth regulators, a completely randomized design was used, in a factorial scheme with an additional treatment (3x3 + 1), with 4 repetitions, with three levels of growth regulators ANA (naphthalene acetic acid), BAP (benzylaminopurine), GA₃ (gibberellic acid), and four levels of concentrations (0, 25, 50 and 100 mg L⁻¹), plus additional treatment (distilled water + Tween 80). To evaluate the effect of the elicitors methyl jasmonate (MJ), salicylic acid (AS) and chitosan (QT), a completely randomized design with different concentrations of MJ (0, 0.5, 2 and 8 mM), AS (0, 0.25, 0.5 and 1.0 mM) and QT (0, 2, 4 and 6 g L⁻¹). The experiments with magnetized water and elicitors were the ones that most significantly affected the accumulation of dry matter, photosynthetic pigments, the content of total phenols and soluble proteins, and the yield and concentration of the citral (neral + geranial) and citronellal constituents of the essential oil. In the experiment with growth regulators, BAP and GA₃ were the ones that most favored these variables compared to ANA, being only inferior to the control treatment. Thus, the application of irrigation techniques with magnetized water and leaf spraying of elicitors are favorable in the agricultural production of *M. officinalis*.

Keywords: Lemon balm. magnetized irrigation. Inductors of plant resistance.

LISTA DE ABREVIATURAS

AM.	Água magnetizada
AS.	Ácido salicílico
B.	Boro
Ca.	Cálcio
Cu.	Cobre
ETc.	Evapotranspiração da cultura
Fe.	Ferro
K.	Potássio
Mg.	Magnésio
MJ.	Metil jasmonato
Mn.	Manganês
N.	Nitrogênio
NM.	Água não magnetizada
P.	Fósforo
QT.	Quitosana
S.	Enxofre
Zn.	Zinco

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	11
1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	12
2.1	Características da <i>Melissa officinalis</i> L.: aspectos botânicos, agronômicos e terapêuticos	12
2.2	Biossíntese e composição volátil de <i>melissa officinalis</i> l.	15
2.3	Irrigação com água magnetizada	18
2.4	Reguladores de crescimento vegetal	20
2.5	Elicitores	22
	REFERÊNCIAS	25
	 CAPÍTULO 2	 32
	ÁGUA MAGNETIZADA AFETA O CRESCIMENTO, ESTADO NUTRICIONAL E CARACTERÍSTICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melissa officinalis</i> L.	32
1	INTRODUÇÃO	33
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1	Caracterização da área de estudo e material vegetal	34
2.2	Condução experimental da irrigação	35
2.3	Análise das características de crescimento	37
2.4	Análise dos aspectos químicos	37
2.4.1	Quantificação de pigmentos fotossintetizantes	37
2.4.2	Estado nutricional e proteínas solúveis	38
2.4.3	Destilação e análises dos óleos essenciais	39
2.5	Análise estatística	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
3.1	Crescimento vegetativo	41
3.2	Pigmentos fotossintéticos e estado nutricional	43
3.3	Teor, rendimento e composição química dos óleos essenciais	49
4	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	 CAPÍTULO 3	 51
	REGULADORES DE CRESCIMENTO VIA FOLIAR AFETAM O CRESCIMENTO E O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melissa officinalis</i> L.	51
1	INTRODUÇÃO	52
2	MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1	Área de estudo e produção de mudas	53
2.2	Delineamento e condução experimental	54
2.3	Análise do crescimento, pigmentos fotossintéticos, proteínas e compostos fenólicos	54
2.4	Extração, teor e rendimento do óleo essencial	56
2.4.1	Análise quantitativa e qualitativa dos constituintes químicos	57
2.5	Análise estatística	58
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1	Crescimento vegetativo	58
3.2	Pigmentos fotossintéticos	63

3.2	Teor de proteína e fenóis totais.....	64
3.3	Teor, rendimento e composição química do óleo essencial	65
4	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	CAPÍTULO 4	72
	ELICITORES AFETAM O CRESCIMENTO E OS TEORES DE ÓLEO	
	ESSENCIAL EM <i>Melissa officinalis</i> L.	72
1	INTRODUÇÃO.....	73
2	MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1	Área de estudo e produção de mudas	74
2.2	Condições experimentais da elicitação.....	74
2.3	Determinação do crescimento vegetal.....	75
2.4	Quantificação de pigmentos fotossintetizantes	75
2.5	Proteínas solúveis e fenóis totais.....	76
2.6	Destilação e análise dos óleos essenciais.....	77
2.7	Análise estatística	79
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
3.1	Crescimento vegetal.....	79
3.2	Quantificação de Pigmentos Fotossintetizantes	82
3.3	Proteínas solúveis e fenóis totais.....	82
3.4	Teor, rendimento e composição química do óleo essencial	84
4	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS.....	90

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A espécie aromática *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) possui na composição química do seu óleo essencial, o componente citral (neral + geranial), cujo valor econômico é de grande interesse para as indústrias do ramo alimentício, farmacêutico e cosméticos (KREMER et al., 2019; CHIEN et al., 2019; LONG et al., 2019). Conforme Kremer et al. (2019), o citral é um composto natural com aroma de limão que tem o potencial de reduzir os níveis de estresse oxidativos e citocinas pró-inflamatórias causadas pela exposição à luz solar.

Além do óleo essencial, o polifenol ácido rosmarínico é outro constituinte extraído das folhas dessa espécie, o qual possui efeitos terapêuticos significativos na saúde humana, principalmente como sedativo e antioxidante (MAGALHÃES et al., 2018; ŚWIDER; STARTEK; WIJAYA, 2019; ALICE et al., 2019).

No Brasil, o rendimento médio de óleo essencial de *M. officinalis* varia de 0,43 e 4,63 L ha⁻¹, com teor de 0,5 a 0,48%, valores esses considerados baixos quando comparado com a espécie *Cymbopogon citratus*, fato este que eleva seu preço mercadológico (BIASI et al., 2009; PINTO et al., 2014). A área para cultivo comercial de *M. officinalis* em algumas localidades da europa é de cerca de 40 hectare (MAŠÁN; KOPTA, 2016), sendo seu cultivo mais favorável em solos de textura média, rico em matéria orgânica e em lugares parcialmente sombreados, não tolerando temperaturas altas, geadas e vento frio (LORENZI; MATOS, 2008).

Pesquisas relacionadas a técnicas agronômicas que visam o aumento da produção de matéria seca foliar e de óleo essencial de plantas medicinais têm crescido muito nas últimas décadas (NÉMETH-ZÁMBORINÉ et al., 2017; YADEGARI, 2017). Dentre essas técnicas têm-se as relacionadas aos níveis de irrigação, aplicação foliar de elicitores e reguladores vegetais (MEIRA et al., 2013; NÉMETH-ZÁMBORINÉ et al., 2017; PIRBALOUTI et al., 2019).

A irrigação realizada com água tratada magneticamente pode ser uma ferramenta facilitadora no processo de irrigação, por afetar o fenômeno de troca iônica, alterando suas propriedades físico-químicas e conseqüentemente seu grau de pureza (LOPES et al., 2007; WANG; WEI; LI, 2018). Estudos recentes, afirmam que o efeito da magnetização na água aumenta a permanência da umidade do solo e facilita a sua absorção pela cultura, além de reduzir o desperdício de água pela cultura (WANG et al., 2020). De acordo com Zarrinabadi et

al. (2019), a técnica de irrigação no cultivo de plantas medicinais pode compensar os efeitos danosos da escassez hídrica, além de influenciar no desenvolvimento e rendimento de metabólitos secundários.

Outra técnica de produção agrícola que influencia os metabólitos secundários é a aplicação de elicitores, como o ácido salicílico, quitosana e o metil jasmonato (AN et al., 2020; PIRBALOUTI et al., 2019; VANDA; SHABANI; RAZAVIZADEH, 2019) e os reguladores de crescimento como o 6-benzilaminopurina (BAP), ácido α -naftaleno acético (ANA) e giberelina (GA_3) que podem também proporcionar efeitos como a resistência contra o ataque de insetos-pragas a aumento na concentração de um determinado metabólito secundários de interesse, como os óleos essenciais (MOHEBALIPOUR et al., 2012; STORCK et al., 2013).

Para plantas medicinais, a determinação de técnicas de manejo que possam assegurar a produção de metabólitos secundários em quantidade e com qualidade é fundamental no processo de cultivo de uma cultura (AMER; ABDALLAH; NORELDIN, 2019). Diante do exposto, objetivou-se avaliar a produção de matéria seca e as características quantitativa e qualitativa do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. submetida a diferentes níveis de água magnetizada, elicitores e reguladores de crescimento.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Características da *Melissa officinalis* L.: aspectos botânicos, agronômicos e terapêuticos

A *Melissa officinalis* L. é uma planta medicinal, aromática e condimentar, originária da Europa e da Ásia, pertencente à família Lamiaceae e conhecida popularmente como cidreira, planta cidreira, cidreira-verdadeira, melissa, cidrilha, melitéia, chá-da-frança, limonete, citronela-menor, melissa romana, planta-luísa, salva-do-Brasil, chá-de-tabuleiro (LORENZI; MATOS, 2008).

No Brasil, as espécies *Lippia alba* (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (Poaceae) também são conhecidas como planta-cidreira, porém somente a *Melissa officinalis* L. (Figura 1) é considerada Erva-cidreira verdadeira ou “oficial”, distinguindo-se das demais plantas por ser uma planta perene, com caules ramificados desde a base, eretos ou com ramos ascendentes, de 30-60 cm de altura, possui folhas membranáceas, verde-escura na parte superior e verde-clara na parte inferior, rugosas, de 3-6 cm de comprimento, sendo suas flores

de cor creme, dispostas em racemos axilares, e não florescendo no Brasil (LORENZI; MATOS, 2008; FERRO; OLIVEIRA; JORGE, 1996).

Essa é uma planta de clima temperado a subtropical, desenvolve-se bem em ambientes parcialmente sombreados, com plasticidade fenotípica sob condições de baixa luminosidade, não tolerando temperaturas altas, geadas e vento frio. Seu cultivo deve ser em solo de textura média, rico em nutrientes e matéria orgânica, não muito aerada. A adubação e correção nutricional podem ser realizadas com esterco de animal curtido, húmus ou matéria orgânica (LORENZI; MATOS, 2002; BRANT et al., 2011; SODRÉ, et al., 2013).

Figura 1- *Melissa officinalis* L.



Fonte: Do autor (2018).

A sua propagação pode ser por sementes, divisão de touceiras ou por estaquia de ramos novos. Nas condições climáticas do Brasil a espécie não produz sementes, sendo a germinação dessas favorecidas em temperaturas abaixo de 30 °C (PÓVOA; MONTEIRO, 2009), já o plantio das mudas em ambiente protegido e no campo pode ser realizado tanto no verão quanto no inverno, sendo que em épocas com temperaturas mais elevadas como no verão, o ambiente protegido favorece a produção de matéria seca, rendimento do óleo e teor de citral, já condições amenas favorecem a concentração de neral, geranial e citronelal (LUZ et al., 2014).

Após o plantio, a colheita dessa espécie pode ser feita aos 90 dias no verão a 120 dias no inverno, sendo o corte recomendado a 10 cm acima do solo para garantir a sua capacidade de rebrota, podendo o mesmo ser realizado três vezes ao ano. Além disso, devem-se coletar as folhas no horário da manhã para reduzir as perdas de óleos voláteis (LORENZI; MATOS, 2008; MEIRA; MANGANOTTI; MARTINS, 2011; LUZ et al., 2014). Na condição subtropical úmida, no período de 150 dias em média, a espécie tem maior produção de folhas, decaindo com o aumento de tempo de cultivo. Já o processo de secagem deve ser realizado em temperatura de até 45 °C, evitando a claridade, pois esta pode provocar oxidação das folhas (YUKIZAKI et al., 2008; AOYAMA; INDRIUNAS; FURLAN, 2011).

A *M. officinalis* por constituir muitos componentes químicos ativos como óleos essenciais, taninos e flavonoides são utilizados para fins terapêuticos no tratamento de distúrbios do sono, gastrointestinais e no auxílio do tratamento contra o vírus de herpes labial, sendo as folhas e flores a parte utilizada. Tanto o extrato quanto o óleo essencial apresentam atividades biológicas como antioxidantes e antivirais (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017; MORADPOUR; GHORAN; ASGHARI, 2017).

Estudos recentes mostraram que essa espécie é utilizada no tratamento complementar das desordens do sistema nervoso central, atuando como antitumoral, antiestresse, antiansiolítico, antidepressivo, doenças cardiovasculares, melhoria da memória e concentração, além dos efeitos antiinflamatórios (MIRAJ; AZIZI; KIANI, 2016; DIMITRIS et al., 2020). As propriedades antioxidante e conseqüentemente neuroprotetoras de *M. officinalis* podem ser atribuídas aos constituintes químicos derivados de ácidos fenólicos, como o ácido caféico, ácido clorogênico e principalmente, ao ácido rosmarínico, os quais agem na inibição da replicação do DNA e RNA viral (MOURA et al., 2017; AHMAD et al., 2018).

De acordo com as pesquisas de Chien et al. (2019), os constituintes citral, geranial e β -cariofileno presentes nos extratos das folhas de *M. officinalis* quando combinados a técnicas de pressurização mostraram-se significativamente eficazes na inativação de *Escherichia coli* no processamento de carne moída, demonstrando o forte potencial antimicrobiano dessa espécie. Na medicina alternativa, a espécie é usada em compressas para inchaços, dores de cabeça, cólicas menstruais e intestinais, doenças respiratórias, enjoo, pressão alta, tratamento de doenças de pele, sendo utilizada principalmente na forma de chá, banho, massagem e inalação (GONÇALVES et al., 2017).

2.2 Biossíntese e composição volátil de *Melissa officinalis* L.

Óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis são definidos pela entidade de padronização internacional (ISO 9235:2013), como o produto obtido de flores, folhas, caules, sementes, cascas e outras partes do vegetal, extraídos por destilação a vapor, por processos mecânicos do epicarpo de frutos cítricos ou por destilação seca. Esses óleos são líquidos à temperatura ambiente, constituído por substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, constituídos na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpênica, e com aroma agradável e intenso na maioria dos óleos essenciais (MORAIS, 2009; TAHERPOUR et al., 2017). A composição química dos óleos essenciais é formada por diversas moléculas orgânicas, em geral varia de 20 a 200 componentes, sendo denominados de acordo com sua concentração de constituintes majoritários (20 a 95%), constituintes secundários (de 1 a 20%) e constituintes-traço (abaixo de 1%) (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

Dentre as substâncias da constituição química dos óleos essenciais têm-se, os hidrocarbonetos terpênicos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, dentre outros, sendo constituída basicamente por fenilpropanóides ou terpenóides. De forma geral, os óleos essenciais são constituídos majoritariamente por terpenos ou seus derivados. Nas plantas medicinais, as classes terpênicas encontradas com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C) e com menor frequência os diterpenos (20C) (FELIPE; BICAS, 2016; HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

A biossíntese dos óleos essenciais, e de outros metabólitos secundários no geral, está condicionada aos processos fotossintéticos por meio das reações químicas do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. Os terpenos são sintetizados a partir da acetyl-CoA, via rota do ácido mevalônico, ou via rota do metileritritol fosfato (MEP), considerando que essas duas rotas ocorrem em organelas diferentes da célula vegetal, sendo elas o citoplasma e o cloroplasto, respectivamente. Por sua vez os fenilpropanóides e fenóis são formados pela via biosintética do ácido chiquímico (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017; TAIZ et al., 2017).

Ecologicamente, os óleos voláteis exercem a função de proteção da planta contra herbívoros, defesa contra patógenos, atração de polinizadores, contra perda de água/ aumento de temperatura, proteção contra estresse oxidativo, sinalização entre órgãos vegetativos distintos e efeito alelopático (SOUSA; SERRA, DE MELO, 2012). No ramo industrial, os óleos essenciais de plantas aromáticas têm sido largamente utilizados em indústrias de

perfume, farmacêuticas, alimentícias como aditivos seguros para a manutenção da estabilidade microbiológica de alimentos e aromatização em substituição aos derivados de petróleo. Essa utilização se dá em virtude das suas atividades biológicas, tais como antioxidante, antimicrobiana, antifúngica e antinociceptiva (JACOB et al., 2017; CHIEN et al., 2019).

A obtenção desses óleos é realizada por vários métodos de extração, como hidrodestilação, extração por solventes orgânicos, destilação a vapor, extração por fluido supercrítico, enfloração, prensagem a frio, dentre outros, considerando que a escolha do método depende da espécie e das características agregadas ao produto final, uma vez que a composição do óleo pode variar significativamente com o método (SILVEIRA et al., 2012).

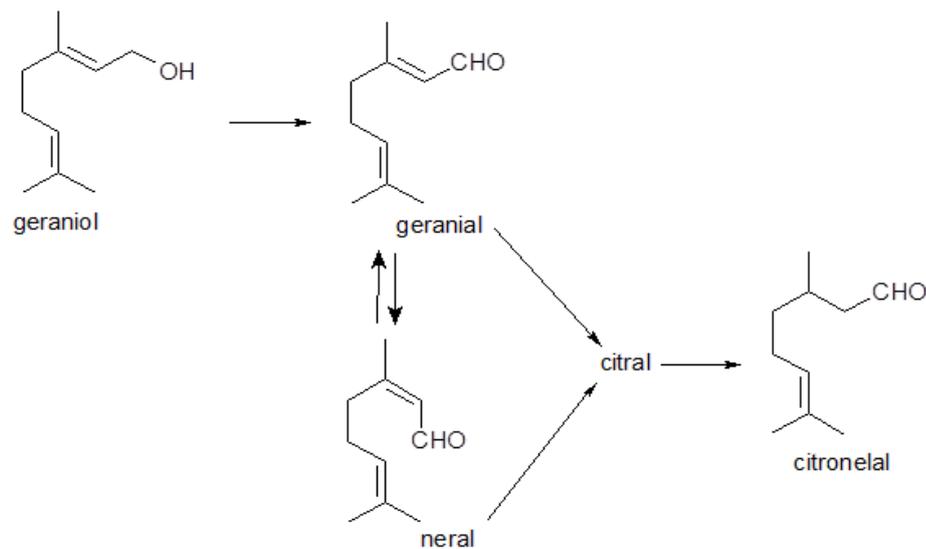
Dentre esses métodos, as técnicas que envolvem a destilação são mais usuais para a obtenção do óleo, sendo o termo hidrodestilação antes empregado para os seguintes métodos: hidrodestilação com água, hidrodestilação com água e vapor e hidrodestilação por vapor, sendo esses baseados na separação dos componentes em função da diferença da pressão de vapor, todavia, considera-se atualmente, hidrodestilação, para o método com a utilização de água, e destilação por arraste a vapor para extrações utilizando água e vapor ou apenas vapor (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Todavia, a obtenção dos óleos essenciais por essas técnicas de destilação apresentam algumas limitações, como: degradação térmica de componentes termolábeis em temperaturas altas, assim como reações de hidrólise, hidratação e solubilização de alguns componentes na água, esses métodos não são recomendados quando se pretende avaliar as atividades biológicas/ farmacológicas do óleo volátil, a hidrodestilação associada a técnicas modernas como o emprego do aparelho de clewenger é mais usual em escala laboratorial em relação a outros métodos (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017). As características químicas dos óleos essenciais são comumente analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), sendo analisadas as regiões de pico para a definição dos seus constituintes (BOTREL et al., 2009).

O óleo essencial de *M. officinalis* esta presente nos tricomas glandulares das folhas apresentando componentes, tais como geranial, geraniol, neral, citronelal, cariofileno, linalol, citral (neral + geranial) e limoneno, onde alguns são considerados princípios ativos para a produção de medicamentos e cosméticos (LORENZI; MATOS, 2008; MEIRA; MANGANOTTI; MARTINS, 2011; MIRAJ; AZIZI; KIANI, 2016).

Na maioria dos estudos, os monoterpênicos geraniol, neral e citronelal (Figura 2) são encontrados no óleo essencial de *M. officinalis* como componentes majoritários, obtidos principalmente das suas folhas (LUZ et al., 2014). É possível ressaltar que os monoterpênicos e sesquiterpenos são altamente voláteis por possuírem estruturas terpênicas de menor massa molecular de forma cíclica e acíclica, sendo utilizados por suas características organolépticas marcantes na aromatização de produtos naturais (FELIPE; BICAS, 2016). Em geral, há sempre um componente que predomina na composição do óleo, porém nem sempre são os componentes responsáveis pelas propriedades biológicas que estes demonstram, sendo as diferenças encontradas no rendimento e composição do óleo diretamente relacionado com a sua qualidade (ACEVEDO; NAVARRO; MONTERO, 2013).

Figura 2- Possível rota biossintética para citral (geraniol + neral) e citronelal.



Fonte: Adaptado de Akhila (1985) e Ganjewala et al. (2012) para *Cymbopogon spp.*

O método mais eficiente para a extração de óleo essencial de *M. officinalis* é por hidrodestilação (ABDELLATIF; HASSANI, 2015). Os teores e a composição química dos constituintes voláteis presentes no óleo essencial dependem de vários fatores, como épocas, sistemas de cultivo, adubações, condições climáticas, época de corte, idade da planta, tempo de extração, dentre outros fatores (MEIRA et al., 2013; ABDELLATIF; HASSANI, 2015; PIRBALOUTI et al., 2019).

2.3 Irrigação com água magnetizada

A irrigação é uma técnica que tem por objetivo fornecer de maneira artificial água ao solo em quantidades apropriadas para suprir as necessidades hídricas da cultura, sendo sua quantidade baseada no suprimento da evapotranspiração da cultura em condições de irrigação total ou suplementar (DASTRANJ; SEPASKHAH, 2019). Além do fornecimento hídrico, essa técnica pode atender outras finalidades secundárias, como na lixiviação do excesso de sais no solo, na fertilização, na proteção das plantas contra geadas, no resfriamento do solo e das plantas e na germinação de sementes (MERAJIPOOR et al., 2020).

Segundo Mantovani et al. (2013), a produtividade de uma planta está relacionada com o uso eficiente que esta faz ao ter contato com a água, a qual é refletida na forma de evapotranspiração, sendo essa eficiência também dependente da espécie. Um dos parâmetros agrometeorológicos fundamentais para o planejamento do manejo de irrigação é a evapotranspiração de uma cultura (ET_c), a qual corresponde a quantidade de água que deverá ser aplicada artificialmente, sendo seu valor obtido por meio da evapotranspiração de referência (ET_o) e do coeficiente de cultivo (K_c), o qual varia com as características de cada cultura (XIANG et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017).

Em plantas medicinais, o sistema de irrigação tem uma relação direta com os processos fisiológicos da produção vegetal, o qual influencia na qualidade e quantidade de metabólitos secundários. Aleman e Marques (2016) trabalhando com níveis de irrigação em plantas de *Calendula officinalis* observaram que o maior fornecimento de água para a espécie promoveu maior produção de flavonóides e óleo essencial. Da mesma forma, Meira et al. (2013) observaram que a submissão de *M. officinalis* L. em diferentes níveis de água afetou o crescimento e a produção de fitomassa da espécie, sendo a maior produção e teor de óleo essencial obtidos na menor disponibilidade hídrica.

O volume de água a ser aplicado no solo dependendo das características desse é determinante no comportamento produtivo do vegetal. Nos estudos de Abdi, Shokrpour e Salami (2019) com *Mentha x piperita* L. constatou-se que a menor disponibilidade de água reduziu a porcentagem de óleo essencial e mudou o perfil de óleo, ressaltando-se aumentos relativos de sesquiterpenos com o estresse hídrico.

Essas mudanças estruturais e fisiológica do vegetal frente a diferentes disponibilidades hídricas correspondem aos mecanismos adaptativos que as plantas desenvolvem para minimizar a perda de água, causada naturalmente pelo processo fotossintético e de

transpiração, evitando assim a desidratação celular e o comprometimento de sua sobrevivência (KARKANIS; BILALIS; EFTHIMIADOU, 2011). Algumas espécies como *M. officinalis* após serem submetidas a mínimas condições hídricas por mais de uma semana, apresentam recuperação total nas suas características morfológicas e fisiológicas após a reidratação, aumentando inclusive o rendimento dos componentes ativos do seu óleo (NÉMETH-ZÁMBORINÉ et al., 2017).

De acordo com Meira et al. (2013), *M. officinalis* é uma espécie que na fase inicial de crescimento possui maior plasticidade fenotípica, a qual não é afetada pela variação de disponibilidade hídrica, todavia na sua fase adulta, por volta dos dois meses de cultivo essa variável afeta as características de crescimento e produção da espécie.

Água é considerada como um líquido altamente estruturado e dinâmico, capaz de formar diferentes tipos de aglomerados denominados clusters, por meio das suas ligações de hidrogênio intermoleculares (TRIPATHY; MAHAWAR; CHANDRAKUMAR, 2020). Esses aglomerados ao serem expostos a campos magnéticos alteram suas propriedades por meio da dissociação das moléculas de água que formam clusters menores, diminuindo assim a tensão superficial da água por meio da quebra das pontes de hidrogênios, o que facilita sua absorção pelas células do vegetal e na redistribuição de cargas espaciais nas micelas coloidais do solo (PANG, 2006).

Conforme o estudo de Tripathy, Mahawar e Chandrakumar (2020), quanto maior o cluster maior é a energia interativa das moléculas de água, sendo sua estrutura e frequência vibracional influenciada também pelo local de confinamento, onde a separação de carga intramolecular para cada molécula de água aumenta sob tubulação com diâmetro menor. A irrigação realizada com água tratada magneticamente melhora a eficiência de uso pelas plantas por meio das alterações causadas na condutividade elétrica, dissolução total de sólidos e dos níveis de salinidade na solução do solo (SURENDRAN; SANDEEP; JOSEPH, 2016).

De acordo com os estudos de LIU et al. (2019), os efeitos da água tratada magneticamente afetam positivamente a taxa fotossintética líquida, condutância estomática, concentração intercelular de CO₂ e eficiência no uso da água, além de promover maior desenvolvimento radicular e capacidade de absorção dos nutrientes do solo. Estudos demonstram que a utilização dessa técnica de irrigação também facilita na eficiência da fertilização nitrogenada, possibilitando a redução da adubação nitrogenada sem afetar a qualidade produtiva da espécie, além de proporcionar um maior retorno econômico (MAHMOUD et al., 2019; MERAJIPOOR et al., 2019).

Selim et al. (2019) observaram que abaixo de 50% da capacidade de campo, plantas irrigadas com água magnetizada são capazes de aumentar o diâmetro do metaxilema dos seus vasos condutores e seu teor de prolina, o que garantem maior ajuste osmótico das células pelas plantas quando submetidas a estresse hídrico, refletindo dessa forma em um maior crescimento e produção da cultura quando comparada com plantas irrigadas com água sem tratamento magnético. A preservação da funcionabilidade do aparato fotossintético e maior assimilação da taxa de carbono em muitas espécies são fatores que elevam a importância da utilização dessa técnica de irrigação (ZHANG et al., 2019).

Outras vantagens da utilização dessa tecnologia no sistema de irrigação é a economia de água desperdiçada no solo, uma vez que as plantas utilizam com eficiência esse recurso natural, outra questão é que o método não necessita de energia elétrica e produtos químicos para melhorar a qualidade da água, o que é feito essencialmente pelo campo magnético do imã (RADHAKRISHNAN, 2019; LOPES et al., 2007; AGEEB et al., 2018). Com a ação do campo magnético na água os metabólitos primário e secundário, as atividades enzimáticas, a absorção de nutrientes e a água são reprogramados, estimulando o crescimento e o rendimento das plantas em condições adversas, por meio da redução do estresse oxidativo nas plantas (RADHAKRISHNAN, 2019).

Mostafa et al. (2016) ao trabalharem com diferentes níveis de água magnetizada na produção vegetal, concluíram que os efeitos do campo magnético favoreceram o crescimento vegetativo da planta e a absorção de nutrientes como nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Da mesma forma, Kadhim (2019) observou que plantas submetidas a água magnetizada aumentam sua capacidade de absorção de nitrogênio no solo.

2.4 Reguladores de crescimento vegetal

Os reguladores vegetais diferem dos fitohormônios, por serem substâncias sintetizadas em laboratórios, sendo utilizados como ferramenta tecnológica no ramo agrícola com o objetivo de aumentar a produtividade e reduzir custos de produção de uma cultura (JENA et al., 2020; TAJ et al., 2019). Eles podem ser aplicados no meio de crescimento do vegetal ou em suas partes vegetativas como folhas, frutos ou sementes, os quais dependendo da concentração, intensidade e do tipo do regulador induzirão diferentes processos metabólicos e estruturais no vegetal (LAZZARINI et al., 2019; SAIKIA; KOTOKY; DAS, 2019).

Dentre os reguladores de crescimento, tem-se as auxinas, citocininas e giberelinas que possuem vários efeitos fisiológicos no vegetal, atuando de forma inibidora ou promotora (AN

et al., 2020). Estudos indicam que a aplicação exógena desses reguladores de crescimento em diferentes concentrações atua de forma positiva na micropropagação e composição química do óleo essencial de *M. officinalis* (SILVA et al., 2005; MOHEBALIPOUR et al., 2012).

As auxinas são hormônios presentes em maior concentração em locais que possuem crescimento ativo como a zona meristemática caulinar, assim como folhas, frutos e flores, sendo encontrada também em outras regiões do vegetal, porém em menor concentração (SERRA et al., 2007; RODRIGUES; KERBAUY, 2009).

O ácido indolilacético (AIA) é a auxina mais comum nos vegetais, além dessas, outras auxinas são muito utilizadas nos processos fisiológicos do vegetal como o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido 1-naftaleno acético (ANA). Essas auxinas são comumente utilizadas no enraizamento de espécies (LIMA NETO; RIBEIRO; BEZERRA NETO, 2007), no retardamento da senescência das folhas, das flores e frutos (LADAV; THIAGARAJAN; HAVARD, 2016), assim como no alongamento celular e no aumento da capacidade antioxidante de muitas espécies (AL-DURRAID et al., 2019).

As giberelinas assim como as auxinas são hormônios que atuam no desenvolvimento do caule vegetal, podendo ser encontradas nas raízes, nas folhas jovens, nas sementes em fase de germinação e nos frutos (PEDROSO et al., 2016). Existem vários tipos de giberelina, sendo o ácido giberélico (GA_3) o mais conhecido, esse dependendo da concentração utilizada, quando aplicado externamente promove aumento na altura das plantas, teor de óleo essencial e produtividade em biomassa (STORCK et al., 2013; SEVIK; GUNNEY, 2013).

Rabiei, Bahador e Kordrostami (2018) observaram que altas concentrações de ácido giberélico (GA_3) pulverizados em plantas de *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) proporcionaram um aumento significativo nos seus internódios, assim como no aumento do nível de expressão dos genes da síntese de monoterpene que se correlacionaram fortemente com os constituintes de γ -terpineno e carvacrol. Por outro lado, esse regulador não teve um papel efetivo na expressão genética do aumento do rendimento do mentol em plantas de *Mentha piperita* L., evidenciando que a ação desse regulador é dependente da constituição genética das espécies (SOLEYMANI; TAHERI; SHAFEINIA, 2017).

As citocininas por sua vez, como a 6-benzylaminopurine (BAP) atuam na diferenciação celular e brotações axilares, sendo antagônicas às auxinas (RODRIGUES et al., 2019). Estudos evidenciam que esse regulador está fortemente associado aos pigmentos fotossintéticos clorofila a e b, assim como no ajuste osmótico, atividades antioxidantes e aumento da área foliar para algumas espécies (XUE-FENG et al., 2019; DI BENEDETTO;

TOGNETTI, 2013). De acordo com Zou et al. (2018), concentração elevada de citocinina promove a inibição do crescimento radicular em algumas espécies, por esse regulador interagir de forma direta com as auxinas.

2.5 Elicitores

As plantas apresentam mecanismos de defesas estruturais e bioquímicos sintetizados em relação à um ataque de herbívoros e patógeno, e dentre as ações bioquímicas têm-se os elicitores, denominados também de eliciadores. Esses são substâncias exógenas (moléculas de patógenos específicas ou fragmentos de paredes celulares) que ativam vários genes nas plantas que iniciam ou potencializam a biossíntese de compostos específicos atuando na defesa induzida do vegetal em resposta às adversidades externas (AKULA; RAVISHANKAR, 2011; LORENZETTI et al., 2018).

Os mecanismos de defesa das plantas são ativados mediante a capacidade de detectar moléculas sinalizadoras, que pode ser de origem biótica ou abiótica, iniciados, geralmente, com um influxo de cálcio e uma explosão oxidativa, seguido da síntese do ácido salicílico, ácido jasmônico e/ou etileno, além do acúmulo de metabólitos secundários (fitoalexinas e compostos fenólicos), macromoléculas estruturais (calose, lignina e glicoproteína rica em hidroxiprolina) entre outros (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013; TAIZ et al., 2017). A sinalização da rota que leva à expressão da defesa vegetal pode ser dividida em duas categorias de resistência: a resistência sistêmica adquirida (systemic acquired resistance, SAR) que tem o ácido salicílico como o principal sinalizador e a resistência sistêmica induzida (induced systemic resistance, ISR) que atua na rota regulada pelo ácido jasmonato e etileno (TAIZ et al., 2017).

A resistência sistêmica adquirida (SAR) permite o aumento da resistência da planta a uma variedade de patógenos após a infecção em determinado local, e para que ela ocorra é necessário que microorganismos patogênicos como fungos, bactérias, vírus ou agentes químicos (fatores abióticos) ocasionam uma infecção inicial, que desencadearão mecanismos de defesa não apenas localmente, mas também em outros locais da planta, de maneira sistematizada, o que aumenta à resistência à infecção secundária (BARROS et al., 2010; TAIZ et al., 2017).

O ácido salicílico (AS) é um composto fenólico presente nos vegetais que desempenha ação sinalizadora contra ataques de patógenos, além de estar presente no metabolismo de crescimento e movimento estomático do vegetal, sendo sintetizado via corismato e/ou via

fenilalanina (VLOT et al., 2009; SZOPA et al., 2019). Segundo Taiz et al. (2017) para a ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR), o ácido salicílico é um dos sinais endógenos da planta em resposta a um estresse, o qual aumenta significativamente na região do ataque inicial, induzindo a planta a sintetizar alguns agentes de defesa, como as PR-Proteínas, que promovem a proteção em partes que não foram submetidas ao estresse, essa é ativada, em geral após o período de vários dias.

Ao contrário da SAR, que ocorre como consequência da infecção por um patógeno, a resistência sistêmica induzida (ISR) é ativada por microrganismos não patogênicos, como rizobactérias, sendo mediada por ácido jasmônico e etileno como moléculas sinalizadoras contra um ataque infeccioso sistêmico na planta, não envolvendo a síntese de proteínas PRs, sendo a resistência da planta associada à eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno através de mecanismos de percepção e transdução de sinais que podem resultar na resistência das plantas ao agente patogênico (CARVALHO, 2012; TAIZ et al., 2017).

Dessa forma, a principal função fisiológica atribuída aos jasmonatos e salicilatos é a de funcionar como uma molécula sinalizadora contra agentes de estresse induzindo compostos de defesa na planta. Além dessa função, o ácido jasmônico desliga o crescimento do vegetal para garantir a realocação de recursos para rotas metabólicas envolvidas na defesa, estimulando também a formação de órgãos de armazenamento. Já o ácido salicílico como fitormônio fenólico regula muitos aspectos do desenvolvimento à várias respostas a estresses abióticos, inclusive na biossíntese dos monos e sesquiterpenos de algumas espécies como o *Panax ginseng* (TAIZ et al., 2017; RAHIMI et al., 2014).

Assim, o sucesso da elicitação na produção de metabólito secundário tem sido demonstrado por algumas pesquisas, utilizando elicitores como o metil jasmonato e seus derivados (PIRBALOUTI et al., 2019), quitosana (DOUSSEAU et al., 2016), e o ácido salicílico (MAIVAN et al., 2017). Diferente do ácido salicílico e metil jasmonato que são sintetizados pelo vegetal, a quitosana é um polissacarídeo policatiônico derivado da quitina, naturalmente encontrado na parede do micélio de alguns fungos e no exoesqueleto dos artrópodes e crustáceos, a qual foi reconhecida como um efetivo fator para a produção de metabólitos secundários de muitas plantas medicinais (VANDA; SHABANI; RAZAVIZADEH, 2019).

Efeitos positivos da aplicação foliar de quitosana foram observados em *Salvia officinalis* L. sob diferentes frequências de irrigação em campo, a qual proporcionou melhoria

nas quantidades de metabólitos secundários, como α -pineno, β -pineno, limoneno, α -tujona, β -tujona, cânfora e 1,8-cineol no óleo essencial da sálvia sob irrigação reduzida, além da melhoria no rendimento do óleo essencial dessa espécie (VOSOUGHI et al., 2018). Além do tipo de substância elicitora, a concentração da mesma é fundamental para a atuação efetiva da ativação biossintética de compostos secundários, a exemplo, do metil jasmonato que em concentrações baixas abaixo de 10 μ M, estimula a defesa vegetal, já em doses elevadas, causa a queda prematura das folhas (PIRBALOUTI et al., 2019; URDOVÁ et al., 2015).

Silva et al. (2014) trabalhando com *Melissa officinalis in vitro*, relataram mudanças ocorridas na composição do óleo essencial, onde os tratamentos com metil jasmonato tiveram um aumento de 13% da proporção de geranial, durante 24 h de exposição. Após 48 horas de tratamento, além da presença de 2-metil-2-ciclopenten-1-ona (8,5% do óleo), os autores observaram um aumento de 1,53% de verbenol e 1,11% de citronelal, perdendo o efeito após 96 horas de exposição ao metil jasmonato.

Em *Piper mollicomum*, a aplicação de quitosana (10 g L⁻¹) reduziu o teor de óleo essencial nas folhas e raízes, enquanto a menor concentração (2,5 g L⁻¹) não alterou o teor do óleo nas folhas, mas aumentou nas raízes (DOUSSEAU et al., 2016). Em *Mentha piperita* L. esse regulador diminuiu o rendimento de limoneno (SOLEYMANI; TAHERI; SHAFEINIA, 2017).

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, F., HASSANI, A. Chemical composition of the essential oils from leaves of *Melissa officinalis* extracted by hydrodistillation, steam distillation, organic solvent and microwave hydrodistillation. **Journal of Materials and Environmental Science**, v.6, n.1, p. 207-213, 2015.
- ABDI, G.; SHOKRPOUR, M.; SALAMI, S.A. Essential oil composition at different plant growth development of Peppermint (*Mentha x piperita* L.) Under Water Deficit Stress. **TEOP**, v.22, n.2, p.431-440, 2019.
- ACEVEDO, D.; NAVARRO, M.; MONTERO, P. Composición química del aceite esencial de las hojas de Toronjil (*Melissa officinalis* L.). **Inf. tecnol.**, La Serena, v. 24, n. 4, p. 49-54, 2013.
- AGEEB, G.W.A.; TALAAB, A.S.B.; EL-HADY, M.A.C.; ELDARDIRY, E.I.C.; WAHAB, M.A.M.A. The impact of magnetized saline irrigation water treatment on soil, water and plant. **Bioscience Research**, v.15, n.4, p.4106-4112, 2018.
- AHMAD, W.; AHMAD, M.; KHAN, R.A.; MUSHTAQ, N.; KAMDEM, J.P.; ROCHA, J.B.T. Neuroprotective effects of *Melissa officinalis* on oxygen and glucose deficiency induced damage in rat's brain cortex slices. **International Journal of Pharmacology**, v.14, n.6, p. 781-786, 2018.
- AKHILA, A. Biosynthesis of monoterpenes in *Cymbopogon winterianus*. **Phytochemistry**, v.25, n.2, p. 421-424, 1986.
- AKULA, R.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plants signaling & Behavior**, v.6, p. 1720-1731, 2011.
- AL-DURRAID, M.H., AL-TAEY, K.A., AL-KIKHANI, A.H.J. Effect of Phenylalanine and Naphthalene Acetic Acid on Growth, Yield and Antioxidant Activity of Fenugreek *Trigonella foenum-graecum*. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.388, n.1, 2019.
- ALEMAN, C.C.; MARQUES, P. A.A. Manejo e viabilidade econômica da irrigação no cultivo de *Calendula officinalis* L. **Irriga & Inovagri**, p. 29-37, 2016.
- ALICE, G., CORINA, B., LUCIA, P.; SULTANA, N.; BAZDOACA, C.; BAZDOACA, C.; NICOLETA, D. Polyphenol Content Dynamics in Hydrodistillation Water Residues of Lamiaceae Species. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v.22, n.3, p. 858-864, 2019.
- AMER, A.; ABDALLAH, M.; NORELDIN, T. Enhancing spearmint productivity and water use efficiency under alternative planting practices. **Journal of Central European Agriculture**, v. 20, n.3, p.852-865, 2019.
- AN, J., ALTHIAB ALMASAUD, R., BOUZAYEN, M., ZOUINE, M., CHERVIN, C. Auxin and ethylene regulation of fruit set. **Plant Science**, v.292, 2020.

- AOYAMA, E. M.; INDRIUNAS, A.; FURLAN, M. R. Produção de folhas em *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) em Taubaté, São Paulo. **Revista Biociências**, UNITAU. v.17, n.1, 2011.
- BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda. 2009.
- BIASI, L. A. et al. Tipos de cobertura do solo e épocas de colheita na produção de melissa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p. 314-318, 2009.
- BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.P.; FIGUEIREDO, F.C. ; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERRI, P.H. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epling (Lamiaceae) em diferentes genótipos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.2, p.164-169, 2009.
- BRANT, RS; PINTO, JEBP; ROSAL, LF; ALVES, C., OLIVEIRA, C. ALBUQUERQUE, CJB. Adaptações fisiológicas e anatômicas de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) cultivadas sob malhas termorrefletoras em diferentes intensidades luminosas. **Rev. bras. plantas med.** v.13, n.4, 2011.
- CHIEN, S.Y.; SHEEN, S.; SOMMERS, C.; SHEEN, L.Y. Combination Effect of High-pressure processing and essential oil (*Melissa officinalis* Extracts) or their constituents for the inactivation of *Escherichia coli* in Ground Beef. **Food and Bioprocess Technology**, v.12, n.3, pp. 359-370, 2019.
- DASTRANJ, M., SEPASKHAH, A.R. Response of saffron (*Crocus sativus* L.) to irrigation water salinity, irrigation regime and planting method: Physiological growth and gas Exchange. **Scientia Horticulturae**, v.257, 2019.
- DIMITRIS, D.; EKATERINA-MICHAELA, T.; CHRISTINA, K.; LOANNIS, S.; LOANNA, S.K.; AGGELIKI, L.; SOPHIA, H.; MICHAEL, R.; HELEN, S. *Melissa officinalis* ssp. altissima extracts: A therapeutic approach targeting psoriasis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.246, 2020.
- FELIPE, L.O.; BICAS, J.L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Quím. nova esc.** v.39, n.2, p.120-130, 2017.
- FERRO, V. DE O.; OLIVEIRA, I.; JORGE, L.I. F. Diagnose comparativa de três espécies vegetais comercializadas como "plantas cidreiras" *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. ex Britt & Wilson, *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stap e *Melissa officinalis* L. **Lecta-USF**. Bragança Paulista, v.14, n.2, p.53-63, 1996.
- GANJEWALA, D., GUPTA, A.K., MUHURY, R. An Update on Bioactive Potential of a Monoterpene Aldehyde Citral. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v.2, n.4, p.186-199, 2012.
- GONÇALVES, R.N.; GONÇALVES, J.R. DA S.N.; BUFFON, M. DA C.M.; NEGRELLE, R.R.B. Plantas medicinais: relacionando conhecimento popular e científico na atenção primária à saúde. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.18, n.4, 2017.

HEINZMANN, B. M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. **Óleos voláteis**. In: SIMOES CMO, SCHENKEL EP, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017.

JACOB, R.G.; OLIVEIRA, D.H.; DIAS, I.F.C.; SCHUMACHER, R.F.; SAVEGNAGO, L. Óleos Essenciais como Matéria-Prima Sustentável para o Preparo de Produtos com Maior Valor Agregado. **Rev. Virtual Quim.** v.9, n.1, 2017.

JENA, S.; RAY, A.; SAHOO, A.; SAHOO, S.; DASH, B.; KAR, B.; NAYAK. Rapid plant regeneration in industrially important *Curcuma zedoaria* revealing genetic and biochemical fidelity of the regenerants. **3 Biotech**, v.10, n.1, p.10-17, 2020.

KADHIM, R.J.M. Effects of magnetically treated irrigation water and exposure the roots to constant magnetic field on nodules formation in the bean crops. **Plant Archives**, v.19, n.1, p. 92-96. 2019.

KARKANIS, A.; BILALIS, D.; EFTHIMIADOU, A. Architectural plasticity, photosynthesis and growth responses of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medicus) plants to water stress in a semi-arid environment. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.4, p. 369-374, 2011.

KREMER, J.L.; MELO, G.P.; MARINELLO, P.C.; BORDINI, H.P.; ROSSANEIS, A.C.; SÁBIO, L.R.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L.; VERRI, W.A., LUIZ, R.C. Citral prevents UVB-induced skin carcinogenesis in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.198, n.111565, 2019.

LADAV, R.R., THIAGARAJAN, A., HAVARD, A. Postharvest needle abscission responses of balsam fir (*Abies balsamea* L.) to foliar application of naphthalene acetic acid. **Acta Horticulturae**, v.1119, p.105-110, 2016.

LAZZARINI, L.E.S; BERTOLUCCI, S.K.V.; CARVALHO, A.A.D.; SANTIAGO, A.C.; PACHECO, F.V.; CÉLIO, M.M.F.; PINTO, J.E.B.P. Growth regulators affect the dry weight production, carvacrol and thymol content of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, v.129, p.35-44, 2019.

LIMA NETO, M. C.; RIBEIRO, J.D.L.; BEZERRA NETO, E. Enraizamento de estacas de bambu com o uso de auxinas. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 7, n. 2, 2009.

LIU, X.; ZHU, H.; MENG, S.; BI, S.; ZHANG, Y.; WANG, H.; SONG, C.; MA, F. The effects of magnetic treatment of irrigation water on seedling growth, photosynthetic capacity and nutrient contents of *Populus × euramericana* ‘Neva’ under NaCl stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, p. 41-11, 2019.

LONG, N.; TANG, H.; SUN, F.; LIN, L.; DAI, M. Effect and mechanism of citral against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vivo. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.99, n. 9, p. 4423-4429, 2019.

LOPES, G.N.; KROETZ, V. J.; ALVES, J.M.A.; SMIDERLE, O. J. Irrigação magnética. **Agro@mbiente**, v.1, n.1, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 1.ed. Nova Odessa: Ed.Plantarum, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p

LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; HABBER, L.L.; MARQUEZ, M.O.M. Produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, p.552-560, 2014.

MAGALHÃES, D.B.; CASTRO, I.; LOPES-RODRIGUES, V.; PEREIRA, J.M.; BARROS, L.E.; FERREIRA, I.C.F.R.; XAVIER, C.P.R., VASCONCELOS, M.H. *Melissa officinalis* L. ethanolic extract inhibits the growth of a lung cancer cell line by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis. **Food and Function**, v.9, n.6, p.3134-3142, 2018.

MAHMOUD, T.A; YOUSSEF, EA.; EL-HAROUNY, SB; ABO EID, MAM. Effect of irrigation with magnetic water on nitrogen fertilization efficiency of navel orange trees. **Plant Archives**, v.19, p.966-975, 2019.

MAŠÁN, V.; KOPTA, T. The economic analysis of semi-mechanised harvesting of lemon balm. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 64, n.1, p. 291-296, 2016.

MEIRA, M. R.; MANGANOTTI, S. A.; MARTINS, E. R. Crescimento e produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. nas condições climáticas de Montes Claros –MG. **Revista Biotemas**, v.24, n. 1, 2011.

MEIRA, M.R.; MELO, M.T.P.; MARTINS, E.R.; PINTO, M.J.S.; SANTANA, C.S. Crescimento vegetativo, produção de fitomassa e de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob diferentes níveis de irrigação. **Ciência Rural**, v. 43, n.5, p. 779-785, 2013.

MERAJIPOOR, M.; DEHNAVI, M.M.; SALEHI, A.; YADAVI, A. Improving grain yield, water and nitrogen use efficiency of *Nigella sativa* with biological and chemical nitrogen under different irrigation regimes. **Scientia Horticulturae**, v.260, 2020.

MIRAJ, S.; AZIZI, N.; KIANI, S. A review of chemical components and pharmacological effects of *Melissa officinalis* L. **Scholars Research Library. der Pharmacia Lettre**, v.8, n.6, p.229-237, 2016.

MOHEBALIPOUR, N.; AHARIZAD, S.; MOHAMMADI, S.A.; MOTALLEBIAZAR, A.R.; AREFI, H.M. Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v.10, n.1, p.280-286, 2012.

- MORADPOUR, M.; GHORAN, S.H.; ASGHARI, J. Phytochemical investigation of *Melissa officinalis* L. flowers from Northern part of Iran (Kelardasht). **Journal of Medicinal Plants Studies**, v.5, n.3, p.176-181, 2017.
- MOSTAFA, M. F. M.; EL-BORAY, M.S.S.; SHALAN, A.M. N.; GHAFFAR, A.H. Effect of magnetized irrigation water levels and compost on vegetative growth, leaf mineral content and water use efficiency of Washington navel orange trees. **J. Plant Production, Mansoura Univ.**, v.7, n.2, p.249 - 255, 2016.
- MOURA, D. DA S. C.; SILVA, D.DE B.; BISSACO, E.L.; MIGUEL, I.F.; CUNHA, M. F.; DOS SANTOS, M.J.T.; DA SILVA, M.A.; YOSHIDA, S.Y.; CUNHA, M.F. Gloss para herpes simples *Melissa officinalis*. **Pesquisa e Ação**, v.3, n.1, 2017.
- NÉMETH-ZÁMBORINÉ, É.; RADÁCSI, P., GOSZTOLA, B., RAJHÁRT, P., SZABÓ, K. Influence of water supply and fluctuations on yield and quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n.12, pp. 1539-1546, 2017.
- OLIVEIRA, G. M. DE; SANTIAGO, E.J. P.; LEITÃO, M. DE M. V. B.R.; ROCHA, R.DE C.; GONÇALVES, I. S.; DA SILVA, R. R. Estimativa da evapotranspiração de referência para ambiente protegido. **Irriga & Inovagri**, v.1, n.1, p. 21-30, 2017.
- PANG, X. F. The conductivity properties of protons in ice and mechanism of magnetization of liquid water. **Eur. Phys. J. B**, Roma, v. 49, p.5-23, 2006.
- PEDROSO, L.; BERTOLDO, J. L.; MARCHI, B. de A.; CRUZ, R. M. S. da; SOUZA, B. C. de; LERMEN, C.; ALBERTON, O. Avaliação dos fitoreguladores auxina e giberelina na germinação e crescimento do arroz. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 19, n. 4, p. 241-245, 2016.
- PINTO D.A.; MANTOVANI E.C.; MELO E. DE C.; SEDIYAMA G.C.; VIEIRA G.H.S. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Rev. bras. plantas med.** v.16, n.1, p. 54-61, 2014.
- PIRBALOUTI, A.G.; NEKOEI, M.; RAHIMMALEK, M.; MALEKPOOR, F. Chemical composition and yield of essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under foliar applications of jasmonic and salicylic acids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, 2019.
- PÓVOA, O.; MONTEIRO, A. Geographic distribution and propagation of agrimonia eupatoria l. and *Melissa officinalis* l. from Portugal. **Acta Horticultura**, v.826, p. 185-192, 2009.
- RADHAKRISHNAN, R. Magnetic field regulates plant functions, growth and enhances tolerance against environmental stresses. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.25, n.5, p. 1107-1119, 2019.

RODRIGUES, M.A.; KERBAUY, G.B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, v.36, n.4, p.: 525-549, 2009.

SAIKIA, D., KOTOKY, U., DAS, K. Regulation of flowering in guava (*Psidium guajava* L.) cv. lucknow-49. **Research on Crops**, v.20, n.1, p.81-87, 2019.

SELIM, D.A.-F.H., NASSAR, R.M.A., BOGHDADY, M.S., BONFILL, M. Physiological and anatomical studies of two wheat cultivars irrigated with magnetic water under drought stress conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.135, p. 480-488, 2019.

SERRA, C.; ANTUNES, R.; HEGEWALD, H.; COSTA, C.; PINTO, A. P.; PEIXE, A. Quantificação dos níveis endógenos de auxinas e da actividade enzimática das polifenoloxidasas em oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista de Ciências Agrárias**, v.30, n.1, p.491-499, 2007.

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

SILVEIRA, J.C.; BUSATO, N. V.; DA COSTA, A.O.S.; DA COSTA JÚNIOR, E.F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.15, 2012.

SODRÉ, A.C.B.; HABER, L.L.; LUZ, J.M.Q.; MARQUES, M.O.M.; RODRIGUES, C.R. Adubação orgânica e mineral em Melissa. **Horticultura Brasileira**, v.31, n.1, pp. 147-152, 2013.

SOUSA, R.M.S.de; SERRA, I.M.R. de S.; DE MELO, T.A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v.38, n.1, p. 42-47, 2012.

STORCK, R.C.; DESCHAMPS, C.; MÓGOR, A.F.; COCCÔ, L.C.; SCHEER, A.P.; YAMAMOTO, C.I. Desenvolvimento vegetativo e produção de óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) após a aplicação de ácido giberélico e extrato de alga marinha. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.3, p.391-396, 2013.

SURENDRAN, U.; SANDEEP, O.; JOSEPH, E.J. The impacts of magnetic treatment of irrigation water on plant, water and soil characteristics. **Agricultural Water Management**, v.178, p.21–29, 2016.

ŚWIDER, K.; STARTEK, K.; WIJAYA, C.H. The therapeutic properties of Lemon balm (*Melissa officinalis* L.): Reviewing novel findings and medical indications. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.92, p.327-335, 2019.

TAHERPOUR, A.; KHAEF, S.; YARI, A.; NIKEAFSHAR, S.; MEHDI FATHI, M.; GHAMBARI, S. Chemical composition analysis of the essential oil of *Mentha piperita* L.

from Kermanshah, Iran by hydrodistillation and HS/SPME methods. **Journal of Analytical Science and Technology**, v.8, n.1, p.11, 2017.

TAJ, F., KHAN, M.A., ALI, H., KHAN, R.S. Improved production of industrially important essential oils through elicitation in the adventitious roots of *Artemisia amygdalina*. **Plants**, v.8, n.10, p.430, 2019.

TRIPATHY, M.K., MAHAWAR, D.K., CHANDRAKUMAR, K.R.S. Effect of nano-confinement on the structure and properties of water clusters: An ab initio study. **Journal of Chemical Sciences**, v.132, n.7, 2020.

WANG, Q.; XIE, J.; ZHANG, J.; WEI, K.; SUN, Y., LI, Z. Effects of Magnetic Field Strength on Magnetized Water Infiltration and Soil Water and Salt Movement. **Nongye Jixie Xuebao/Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**, v.51, n.2, p. 292-298, 2020.

WANG, Y.; WEI, H.; LI, Z. Effect of magnetic field on the physical properties of water. **Results in Physics**, v.8, p.262–267, 2018.

XIANG, K.; LI, Y.; HORTON, R.; FENG, H. Similarity and difference of potential evapotranspiration and reference crop evapotranspiration – a review. **Agricultural Water Management**, v.232, n.106043, 2020.

YADEGARI, M. Effects of Zn, Fe, Mn and Cu foliar application on essential oils and morpho-physiological traits of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v.20, n. 2, p. 485-495, 2017.

YUKIZAKI, C.; SAKAI, M.; KOSAKA, T.; DOSONO, M.; SAKONO, M., FUKUDA, N. Effects of drying temperature on antioxidant activity of lemon balm (*Melissa officinalis*) leaves. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v.55, n.6, pp. 293-298, 2008.

ZARRINABADI, I.G.; RAZMJOO, J.; ABDALI MASHHADI, A. KARIMMOJENI, H.; TSENG, T.-M. Irrigation effect on yield and desirable metabolites of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) genotypes. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v.60, n.4, pp. 467-478, 2019.

ZHANG, Y.; LIU, X.; ZHANG, Z.; MENG, S.; WANG, Q.; WEI, Y.; WANG, H.; CHEN, S.; CONG, G.; TANG, J.; QIN, D. Effect of magnetized water treatment on photosynthetic and growth characteristics of *Populuseur americanna* 'Neva' seedlings under exogenous cadmium stress. **Chinese Journal of Eco-Agriculture**, v.27, n.2, pp. 305-313, 2019.

CAPÍTULO 2

ÁGUA MAGNETIZADA AFETA O CRESCIMENTO, ESTADO NUTRICIONAL E CARACTERÍSTICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melissa officinalis* L.

RESUMO

A irrigação por gotejamento é uma das técnicas agrícolas mais utilizadas no cultivo da maioria das culturas vegetais. O aprimoramento dessa técnica associado a água magnetizada e seus efeitos na produção de plantas medicinais é ainda incipiente na literatura. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito dos níveis de irrigação com água magnetizada e não magnetizada sobre o crescimento, estado nutricional e características do óleo essencial de *Melissa officinalis* em ambiente protegido. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4, com dois tipos de água (magnetizada e não magnetizada) e quatro níveis de irrigação 25, 75, 100 e 125% de evapotranspiração da cultura (ETc) e 4 repetições. A irrigação com diferentes níveis de água magnetizada teve efeitos significativos no acúmulo foliar de nitrogênio, fósforo, enxofre, e todos os micronutrientes, no teor das proteínas solúveis e na concentração dos constituintes citral (neral + geranial) e citronelal no óleo essencial de *M. officinalis*. Os níveis acima de 25% ETc foram os mais favoráveis para a maioria dessas variáveis, exceto para as clorofilas que foram mais afetadas positivamente por esse nível. O teor de óleo essencial foi beneficiado pelo menor nível de água não magnetizada. Apenas os diferentes níveis de água tiveram efeitos significativos na produção de matéria seca da espécie. Assim, pode-se dizer que o crescimento da espécie e a composição química do seu óleo essencial são beneficiados com a utilização de água magnetizada nos níveis acima de 25% ETc.

Palavras-chave: Erva cidreira verdadeira. Água Imantada. Metabolismo.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) tem despertado grande interesse da comunidade acadêmica, das indústrias farmacêuticas, alimentícias e da medicina fitoterápica, devido as atividades biológicas do seu óleo essencial, como: antibacteriana (CHIEN et al., 2019), antiviral (MOURA et al., 2017) e por suas propriedades ansiolítica (HAYBAR et al., 2018; MAHBOUBI., 2019).

As atividades biológicas do óleo essencial de *Melissa officinalis* estão associadas a sua composição química, a qual é formada por vários constituintes, dentre eles, o citral (neral e geranial), que confere o seu aroma característico levemente cítrico, e outros constituintes que aparecem em menor quantidade como *trans*-cariofileno, citronelol, pulegona e linalol (BONACINA et al., 2018; CHIEN et al., 2019). Localizados nos tricomas secretores das folhas, os óleos essenciais são sintetizados a partir da água, dos nutrientes e da luz que as plantas recebem para o seu desenvolvimento (MARTINS; PASTORI, 2004; YADEGARI, 2017).

Nesse sentido, a água é um dos fatores ambientais mais limitantes para o crescimento, produção de biomassa, qualidade e quantidade do óleo essencial, por alterar os processos metabólicos das plantas (ZÁMBORINÉ et al., 2017). Segundo Macedo (2015), a escassez hídrica, em diversos países, inclusive no Brasil, tem sido um desafio para os produtores agrícolas, como os de plantas medicinais, por afetar tanto o setor produtivo da economia interna e externa quanto na dignidade da população a ter garantia de acesso aos alimentos.

A técnica de irrigação e suas inovações, como os métodos por gotejamento e a utilização de água magnetizada, apresentam-se como importantes ferramentas para o fornecimento de água em quantidades adequadas durante o desenvolvimento da cultura (MACEDO, 2015; LIU et al., 2019). Segundo os estudos desenvolvidos por Generoso et al. (2017), a utilização de água magnetizada na irrigação localizada proporciona maior umidade de solos argilosos e disponibilidade de nutrientes, como o fósforo, uma vez que a ação do campo magnético em doses reduzidas diminui a adsorção desse elemento químico e aumenta sua mobilidade na solução do solo. Conforme Esmailnezhad et al. (2018), o campo magnético também diminui a tensão superficial da água, aumenta o pH, e inibir a formação de incrustações na tubulação da irrigação, por meio da dissociação das moléculas de água.

Estudos, como os de Liu et al. (2019) e Selim et al. (2019) demonstraram que a água da irrigação tratada magneticamente possui efeitos significativos nas características de

crescimento, fotossíntese, teores de nutrientes minerais, e de compostos fenólicos em plantas cultivadas em casa de vegetação, durante condições adversas. Não há informações disponíveis na literatura sobre irrigação de água tratada magneticamente em *M. officinalis*. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito dos níveis de irrigação com água magnetizada e não magnetizada sobre o crescimento, estado nutricional e características do óleo essencial de *Melissa officinalis* em ambiente protegido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área de estudo e material vegetal

O experimento foi realizado em ambiente protegido do Departamento de Recursos Hídricos e Saneamento da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, Brasil, nas coordenadas geográficas 21°14'00" de latitude sul, 45°00' de longitude oeste e altitude média de 918,8 metros, no período de março a junho de 2018. A região apresenta Clima Temperado Chuvoso (Cwa), de acordo com a classificação climática de Köppen.

Os valores médios das variáveis meteorológicas para o período avaliado foram obtidos pela estação meteorológica automática modelo Davis vantage pro2, instalada dentro do ambiente protegido, com registro de temperatura máxima e mínima de 34,75 e 16,25°C, umidade relativa do ar máxima e mínima de 86,25 e 34,5%, radiação global incidente de 517,75 w/m², evapotranspiração de 2,25mm e velocidade do vento 2,31 Km/h.

O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico argiloso. As condições da fertilidade química inicial, apresentadas na Tabela 1, foram realizadas no Laboratório de Análises de Solo do Departamento de Ciência do Solo da Universidade de Lavras, mediante análise de amostra composta coletada.

Tabela 1- Análise química do solo. Lavras, MG, 2018.

*pH	K	P	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T
	-----mg/dm ³ ----			-----cmolc/dm ³ -----					
7,6	191,84	27,05	2,11	0,77	0,05	0,81	3,37	3,42	4,18
	V	M		M.O.			P-Rem		
	-----%-----		-----dag/Kg----			-----mg/L----			
	80,67	1,46		2,67			30,76		

*pH em água; K, P-extração por Mehlich 1; Ca, Mg, Al- extração por KCL-1 mol/L; H+Al- extrator SMP; SB-soma de base trocáveis; t- Capacidade de Troca Catiônica Efetiva; T- Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; V- Índice de Saturação de Bases; M- Índice de Saturação de Alumínio- M.O.- matéria orgânica; P-Rem- fósforo remanescente.

As mudas de *M. officinalis* L. foram produzidas a partir da propagação de plantas selecionadas cultivadas no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras- MG. Uma exsicata da espécie está depositada no Herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA e corresponde ao nº 22155.

A propagação foi realizada com a utilização de estacas apicais de 7 a 8 cm postas para enraizar em bandejas de isopor de 128 células, preenchidas com substrato tropstrato HA por um período de 15 dias, aclimatizadas posteriormente por meio do aumento gradativo de luminosidade por mais 15 dias. Posteriormente, as mudas foram transplantadas com ± 10 cm de comprimento para vasos plásticos com capacidade de 13 L, preenchidos com a mistura de areia e latossolo vermelho distrófico na proporção 1:2 (v:v), respectivamente, sendo acrescentado 450 g de esterco bovino/ vaso. Nos dez primeiros dias após o transplântio foi aplicada uma lâmina com água não magnetizada correspondente a 100 % em todas as plantas visando uniformizar o estande e garantir o estabelecimento, sendo então aplicados os tratamentos de irrigação.

2.2 Condução experimental da irrigação

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 com quatro repetições, constituído por seis parcelas, totalizando 192 parcelas. Os tratamentos foram compostos por quatro níveis de água (25, 75, 100 e 125% da evapotranspiração da cultura-ETc) e dois tipos de água (magnetizada e não magnetizada).

Para a irrigação, foram utilizados dois reservatórios de 250 L, um para água magnetizada e outro não magnetizada, sendo adicionado no interior de um desses reservatório um aparelho magnetizador Sylocimol® modelo Residence (Figura 1) de 16 cm de altura, 10 de circunferência e capacidade de magnetização 1000 L h⁻¹ para o fornecimento de água magnetizada.

A quantidade de água aplicada diariamente por vaso por um período de 90 dias (Tabela 2) foi baseada no volume de água evapotranspirada pela cultura (ETc L dia⁻¹), determinado pela pesagem de três vasos adicionais para cada tipo de água em um turno de rega de dois dias, obtido pela diferença do peso do vaso antes e depois da adição da água, por uma balança de precisão de 5 g, instalada dentro da área experimental. O sistema de irrigação utilizado foi por gotejamento com um emissor por vaso, com vazão de 4 L h⁻¹ e pressão de serviço de 10 a 40 mca. Foram determinados também o pH, com o auxílio de um pHmetro de

bancada, e a condutividade elétrica da água magnetizada e não magnetizada no início e final do experimento, utilizando um condutivímetro tipo Caneta (Tabela 3).

Figura 1- Aparelho magnetizador Sylocimol® modelo Residence.



NM: água não magnetizada, AM: água magnetizada
Foto: José Eduardo Brasil Pereira Pinto (2018).

Tabela 2- Volume de água magnetizada (AM) e não magnetizada (NM) por vaso (médias individuais e acumuladas) fornecido a *M. officinalis* L. baseado no %ETc no período de 90 dias. Lavras, MG, 2020.

% Etc	Volume médio de água aplicada (L)		Volume total de água aplicada (L)	
	AM	NM	AM	NM
25	0,116	0,122	5,237	5,347
75	0,349	0,364	15,709	16,025
100	0,465	0,486	20,938	21,365
125	0,582	0,607	26,175	26,707
Total	1,512	1,579	68,059	69,444

Tabela 3- Determinação do pH e condutividade elétrica da água magnetizada (AM) e não magnetizada (NM) aplicada no início e no término do experimento com *M. officinalis* L no período de 90 dias. Lavras, MG, 2020.

Tipo de água	INÍCIO		FINAL	
	pH	Condut. X 100 μ S/cm	pH	Condut. X 100 μ S/cm
NM	7,8	1,6	8,0	1,5
AM	7,3	1,3	7,4	1,5

A coleta dos dados para *M. officinalis* L. foi realizada aos 90 dias após o plantio, considerando que durante a permanência das mudas no ambiente protegido, procedeu-se o monitoramento de pragas e eventos climáticos garantindo a qualidade do experimento.

2.3 Análise das características de crescimento

Foram analisados os caracteres agronômicos como comprimento da parte aérea das plantas (CPA-cm), medida com o auxílio de fita métrica; diâmetro do caule (DC-mm), medido com um paquímetro digital; matéria seca de folhas (MSF, g planta⁻¹); do caule (MSC, g planta⁻¹); do sistema radicular (MSR, g planta⁻¹); da parte aérea (MSPA, g planta⁻¹), que é dada pela soma da MSF e MSC, da matéria seca total (MST, g planta⁻¹) e razão raiz/parte aérea (R/PA). Foi determinado também a área foliar total (cm²), para isso avaliou-se todas as folhas de 32 parcelas (8 tratamentos x 4 repetições) do experimento. O método foi o destrutivo, utilizando-se para a leitura o integrador de área foliar modelo LI-COR 3100.

Após a obtenção das medidas de crescimento aos 90 dias após o cultivo, realizou-se a colheita de folhas, caules e raízes. O material coletado foi armazenado em sacos de papel Kraft identificado individualmente e colocado para secar em estufas de circulação de ar forçado, reguladas para a temperatura de 40 °C, correspondente, a um período de 72 h. Após a secagem, o material foi pesado em balança analítica, determinando sua matéria seca.

2.4 Análise dos aspectos químicos

2.4.1 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes

A determinação dos teores dos pigmentos fotossintetizantes foi realizada com material foliar fresco no final do experimento. Foram coletadas três pares de folhas completamente expandidas do terceiro nó superior de três plantas de cada tratamento, tomadas ao acaso. As folhas coletadas foram embrulhadas em papel alumínio e condicionadas em caixa de isopor contendo gelo até a transferência ao Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA.

Os procedimentos adotados para a extração e análise das clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides foram realizados conforme a metodologia de Hiscox e Israelstam (1979). Foram utilizados 50 mg de folhas frescas rasuradas, sem a nervura central, homogeneizada em 10 mL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO), e inseridas em tubos Falcon envoltos em folha de alumínio, acondicionadas em estufa sob temperatura de 65 °C, por 24 h.

Após esse período, realizaram-se as leituras das absorbâncias, utilizando 3 mL das alíquotas das soluções em cubeta de quartzo, em espectrofotometro TECAN INFINITY M200 PRO operado com o sistema de processamento de dados I-control[®] (versão 3.37). Utilizaram-

se os comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm para clorofila *a*, *b* e carotenoides, respectivamente. A leitura do branco foi com DMSO. Todas as leituras foram realizadas no escuro e em triplicata, sendo os teores expressos em mg g⁻¹ de matéria fresca (MF) de acordo com a metodologia de Wellburn (1994), sendo:

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

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

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

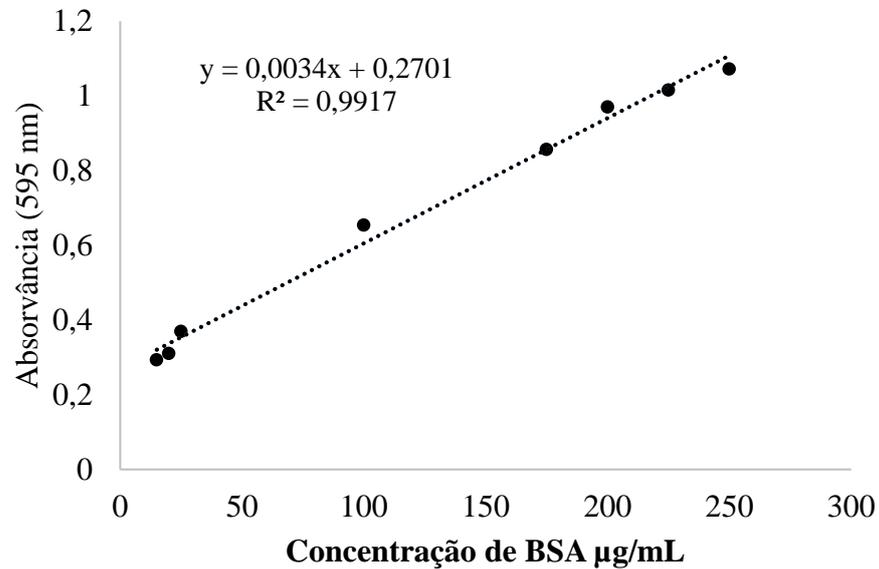
$$\text{Clorofila total} = a + b$$

2.4.2 Estado nutricional e proteínas solúveis

Para a diagnose do estado nutricional foram utilizadas 5 g de amostras compostas de folhas secas, moídas em moinho tipo Wiley, realizadas em triplicatas para cada tratamento. A determinação das concentrações de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), boro (B) e manganês (Mn) foram feitas no Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química da UFLA, seguindo a metodologia descrita por Bataglia et al. (1983).

Para a análise das proteínas, foram amostradas 15 mg de folhas de cada tratamento em triplicata. O teor de proteínas solúveis foi determinado conforme metodologia descrita por Bradford (1976). As leituras foram efetuadas no espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO no comprimento de onda a 595 nm e as concentrações de proteínas foram calculadas conforme a curva-padrão de soro albumina bovina (BSA) (Figura 2) ajustadas a partir de concentrações crescentes de BSA, sendo o teor proteico da amostra expresso em mg de proteína por mL extrato proteico.

Figura 2 – Curva-padrão de soro albumina bovina (BSA), com coeficiente linear (R^2)



2.4.3 Destilação e análises dos óleos essenciais

A hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado empregou 60 g de folhas secas rasuradas para cada repetição dos tratamentos. A destilação foi realizada com 1000 mL de água destilada em balões de destilação com capacidade de 2 litros durante de 60 min.

O óleo essencial foi purificado através de partição líquido-líquido com diclorometano (3 x 5 mL). A fase orgânica foi reunida e tratada com sulfato de magnésio anidro e, posteriormente filtrado em papel. A fração orgânica foi evaporada a temperatura ambiente sob capela de exaustão de gases. As massas dos óleos foram mensuradas em balança digital, com sensibilidade 0,0001g. Os óleos essenciais foram mantidos em frascos âmbar hermeticamente fechados e armazenados em geladeira a 4 °C, até as análises cromatográficas.

O teor de óleo essencial foi determinado utilizando-se a fórmula: $\text{TOE\%} = (\text{massa do óleo (g)} / 60\text{g}) \times 100$. Os dados de teor foram expressos em mL.100 g de folha seca⁻¹. O rendimento do óleo (g planta⁻¹) foi calculado pela fórmula: $\text{RE} = (\text{massa do óleo (g)} / 60\text{g}) \times \text{massa seca das folhas/ planta (g)}$.

As análises químicas dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA. Utilizou-se um sistema de Cromatografia Gasosa (CG) acoplado a um Detector de Ionização em Chama (CG-DIC) Agilent® 7890A, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler

System (CTC Analytic AG, Switzerland) e operado pelo sistema de processamento de dados MSD CHEM Station Ver. E.02.02.1431.

As análises químicas quantitativas dos óleos voláteis foram realizadas em triplicatas, empregando sistema de Cromatografia em Fase Gasosa Agilent® 7890A, operado com sistema de processamento de dados MSD CHEM Station G1701EA E.02.02.1431, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) e um Detector de Ionização em Chama (DIC). Carvacrol foi usado como padrão interno. As amostras foram preparadas acrescentando-se 10 µL de solução estoque do padrão interno à massas conhecidas do óleo essencial e diluindo-se com 1 mL de diclorometano. O volume de injeção foi de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 50:1. Empregou-se coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250°C e 300 °C, respectivamente. A condição de análise foi de rampa de aquecimento de 60 a 240°C, com taxa de aquecimento de 3°C min⁻¹, seguido de uma rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹ até 280 °C. As concentrações dos analitos foram expressas em mg/mL, calculados pelo método do padrão interno, usando fator de resposta relativo de acordo com IOFI Working Group on Methods of Analysis (IOFI, 2011), assim como pela porcentagem do analito na amostra.

As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC. Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C₈-C₂₀) e/ou por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literaturas (ADAMS, 2017). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção descritos em literatura (ADAMS, 2017).

As análises foram realizadas em triplicata utilizando-se 10 µL de solução estoque de Carvacrol como padrão interno, adicionado às massas conhecidas do óleo essencial, diluindo-se com 1 mL de acetato de etila. O volume de injeção foi de 1,0 µL, no modo *split* a uma

razão de injeção de 50:1. Os óleos essenciais foram analisados empregando coluna HP-5MS (30m de comprimento x 250 μm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura do filme - Califórnia, EUA), utilizando-se gás hélio para o arraste dos constituintes, com fluxo de 1,0 mL min^{-1} . As temperaturas do injetor e do detector foram na faixa de 240° e 300 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, com uma rampa de temperatura de 3 °C min^{-1} até 240°C, seguido de uma rampa de 10°C min^{-1} até 280°C.

As análises qualitativas foram realizadas pela técnica de separação por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), utilizando-se um cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z.

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

2.5 Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F, sendo os tratamentos comparados pelo teste de média Scott-Knott ($p < 0,05$) utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011). Realizou-se também análise de componente principal (ACP) no programa software Statistica® com nível de significância de $\alpha = 0,05$ com as variáveis fotossintéticas e nutricional com a finalidade de explicar as relações entre essas e os níveis dos diferentes tipos de água.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Crescimento vegetativo

Os parâmetros de crescimento usando a água magnetizada (AM) e não magnetizada (NM) não foram significativos (Tabela 4). O uso da água magnetizada proporcionou um ganho de 3,5% na matéria seca total. Entretanto, as características de crescimento,

comprimento da parte aérea da planta, diâmetro do caule, área foliar e matéria secas de *M. officinalis* foram afetadas significativamente pelos níveis de água baseada na evapotranspiração da cultura (%ETc), onde o aumento dos níveis de irrigação favoreceu o crescimento da espécie (Tabela 4). O nível de água (% ETc) com 125% proporcionou um acúmulo de matéria seca total de 2,4 vezes em relação ao nível de 25% ETc, e também de 1,68 vezes (MSR), 3,07 (MSC), 3,53 (MSF). As plantas irrigadas com 125% ETc ficaram mais vistosas e apresentaram uma área foliar total de 3,7 vezes em relação ao nível de 25% ETc.

De acordo com Radácsi et al. (2016), *M. officinalis* quando submetida a moderadas limitações hídricas reduziu principalmente o comprimento da parte aérea, o diâmetro da planta, matéria e expandiu o seu sistema radicular como estratégia de sobrevivência. Estudando a mesma espécie Brant et al. (2011) verificaram que ela possui uma significativa plasticidade fenotípica a condições abióticas, refletindo inicialmente nos pigmentos fotossintéticos, os quais são responsáveis pelos processos metabólicos de crescimento e desenvolvimento.

Tabela 4- Influência de diferentes níveis de irrigação com água magnetizada (AM) e não magnetizada (NM) no comprimento da parte aérea da planta (CPA), diâmetro do caule (DC), AFT (área foliar total), matéria seca da folha (MSF), do caule (MSC), da raiz (MSR), da parte aérea (MSPA), total (MST), e relação raiz/parte aérea (R/PA) de plantas de *M. Officinalis*. Lavras, MG, 2020.

FATORES	CPA	DC	AFT	MSF	MSC	MSR	MST	MSPA	R:PA
	cm	mm	cm ²	g planta ⁻¹					
Tipo de água									
AM	25,64 ^{ns}	5,44 ^{ns}	1838,2 ^{ns}	8,20 ^{ns}	3,91 ^{ns}	8,24 ^{ns}	20,37 ^{ns}	12,13 ^{ns}	0,79 ^{ns}
NM	26,56 ^{ns}	5,36 ^{ns}	1712,9 ^{ns}	8,22 ^{ns}	4,01 ^{ns}	8,88 ^{ns}	21,09 ^{ns}	12,21 ^{ns}	0,82 ^{ns}
Nível de água (%ETc)									
25	20,00 ^b	4,18 ^b	593,6 ^b	2,94 ^b	1,69 ^b	5,78 ^b	10,41 ^b	4,63 ^b	1,25 ^a
75	27,98 ^a	5,66 ^a	2105,9 ^a	9,16 ^a	4,26 ^a	9,74 ^a	23,17 ^a	13,43 ^a	0,73 ^b
100	27,98 ^a	5,99 ^a	2199,6 ^a	10,33 ^a	4,69 ^a	9,28 ^a	24,31 ^a	15,03 ^a	0,62 ^b
125	28,48 ^a	5,79 ^a	2203,4 ^a	10,40 ^a	5,20 ^a	9,74 ^a	25,04 ^a	15,60 ^a	0,61 ^b
C.V.%	7,44	6,15	25,02	13,56	16,83	17,25	12,2	14,28	20,3

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna dentro de cada fator não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). ns - não significativo.

Considerando que o acúmulo de matéria seca vegetal é o resultado do processo fotossintético, o qual incorpora matéria orgânica na planta, Taiz et al. (2017) consideraram

que à baixa disponibilidade de água afeta o acúmulo de matéria seca, em consequência da redução da condutância estomática de CO₂ ao fechar seus estômatos para evitar perda excessiva de água pela evapotranspiração foliar. Meira et al. (2013), ao submeterem *M. officinalis* sob diferentes níveis de água, observaram que a espécie tem maior produção de matéria seca com o aumento da disponibilidade hídrica, indicando que a quantidade de água está diretamente relacionada com o crescimento vegetal.

3.2 Pigmentos fotossintéticos e estado nutricional

Os teores de clorofila *a* (1,27 mg g⁻¹MF), total (2,04 mg g⁻¹MF) e carotenoides (0,35 mg g⁻¹MF) foram maiores quando se utilizou a água magnetizada no nível a 25% ETc, sendo diferente estatisticamente da água não magnetizada. Já para os outros níveis de água não houve diferença estatística entre as variáveis analisadas (Tabela 5).

Plantas em condições hídricas adequadas aumentam sua eficiência do uso da água, condutância estomática e taxas fotossintéticas (KARKANIS; BILALIS; EFTHIMIADOU, 2011). Segundo Bianchi, Germino e Silva (2016), agentes estressores como a baixa disponibilidade de água podem induzir a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são prejudiciais aos processos metabólicos essenciais ao vegetal, reduzindo o teor de pigmentos fotossintéticos.

Tabela 5- Efeito de irrigação com diferentes níveis (% ETc) de água magnetizada (AM) e não magnetizada (NM) em ambiente protegido nos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides em folhas de *M. officinalis*. Lavras-MG, 2020.

Níveis de água % ETc	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>		Clorofila total		Carotenoides	
	mg g ⁻¹ MF				AM	NM	AM	NM
	AM	NM	AM	NM	AM	NM	AM	NM
25	1,27 aA	0,68 bB	0,77 aA	0,69 aA	2,04 aA	1,37 bB	0,35aA	0,22bB
75	1,15 aA	1,13 aA	0,59 aA	0,52 bA	1,74 aA	1,65 aA	0,33aA	0,31aA
100	1,10 aA	1,18 aA	0,53 bA	0,54 bA	1,63 aA	1,73 aA	0,31aA	0,33aA
125	1,26 aA	1,17 aA	0,60 aA	0,62 aA	1,86 aA	1,78 aA	0,35aA	0,34aA
C.V.%	12,76		16,77		13,31		12,19	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A eficiência do uso da água em quantidades limitadas está diretamente relacionada ao genótipo de muitas espécies, assim como a qualidade da água (SELIM et al., 2019; DASTRANJ; SEPASKHAH, 2019). A água tratada magneticamente pode melhorar as

condições fotossintéticas de plantas, mesmo quando submetidas a estresse hídrico, por meio da otimização de regulação dos estômatos e redução aos danos causados pela baixa disponibilidade de água nos mecanismos fotossintéticos (LIU et al., 2019). Esse tipo de água também pode aumentar o conteúdo de água do solo da camada superior e reduzir a infiltração de água no solo profundo, o que facilita o maior aproveitamento pela planta e o menor desperdício (WANG et al., 2020)

Os níveis de água superiores a 25% ETc foram favoráveis na absorção de macronutrientes na matéria seca foliar de *M. officinalis* L. As plantas irrigadas com água magnetizada (AM) ao nível de 100% ETc apresentaram maiores teores de nitrogênio (17,00 g kg⁻¹), fósforo (6,14 g kg⁻¹) e enxofre (10 g kg⁻¹). E água não magnetizada (NM) ao nível de 125% ETc favoreceu absorção de cálcio (16,71 g kg⁻¹) e magnésio (6,83 g kg⁻¹). Em média, a espécie apresentou a seguinte ordem de teores de macronutrientes: K (32,43 g kg⁻¹) > Ca (14,82 g kg⁻¹) > N (14,40 g kg⁻¹) > S (7,54 g kg⁻¹) > Mg (6,27 g kg⁻¹) > P (4,59 g kg⁻¹), indicando que ela necessita de maiores quantidades de potássio que de fósforo para realizar seus processos metabólicos (Tabela 6).

Tabela 6- Efeito da irrigação com diferentes níveis (% ETc) de água magnetizada (AM) e não magnetizada (NM) em ambiente protegido, nos teores de macronutrientes na matéria seca foliar de *M. officinalis*. Lavras-MG, 2020.

Macronutriente (g kg ⁻¹)	Tipo de água	25	75	100	125	CV (%)
		% ETc				
Nitrogênio	AM	14,59 aB	13,73 aB	17,00 aA	12,62 bB	1,22
	NM	12,34 bB	14,56 aA	14,73 bA	15,67aA	
Fósforo	AM	3,00 aB	4,96 aB	6,14 aA	3,99 bB	2,09
	NM	1,92 bB	5,57 aA	5,46 aA	5,73 aA	
Potássio	AM	31,10 aA	33,38 aA	33,25aA	30,12aA	9,56
	NM	33,56 aA	32,92 aA	33,27 aA	31,95aA	
Cálcio	AM	13,50 aB	14,76 aA	15,35 aA	15,50 aA	3,36
	NM	13,73 aB	14,45 aB	14,63 aB	16,71 aA	
Magnésio	AM	5,55 aB	6,03 aA	6,72 aA	6,50 aA	3,6
	NM	5,92 aB	6,34 aB	6,32 aB	6,83 aA	
Enxofre	AM	5,77 aC	9,02 aA	10,00 aA	8,08 aB	3,02
	NM	3,66 bC	9,23 aA	7,40 aB	7,19 aB	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula coluna e maiúscula na linha dentro de cada nutriente não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

A baixa demanda de fósforo para essa espécie também foi descrita no estudo de Souza et al. (2012), os quais avaliando o efeito de diferentes doses desse elemento nas características biométricas dessa espécie cultivada em latossolo amarelo concluíram que o acréscimo de fósforo na adubação da espécie não influenciou a produção de matéria seca da espécie, sendo esta mais dependente de matéria orgânica, cálcio e magnésio. Por outro lado, Blank et al. (2006) avaliando os efeitos da adubação química e da calagem no crescimento e na nutrição de *Melissa officinalis* L. observaram que a ausência de calagem, nitrogênio e fósforo influenciaram na queda de produção foliar da espécie. E a omissão de potássio e enxofre não foram fatores limitantes em solo Argissolo Vermelho-Amarelo, demonstrando assim o conteúdo foliar é dependente da espécie e do solo utilizado.

Entre os nutrientes, vale a pena destacar o fósforo, pois ele constitui as membranas celulares, as moléculas do DNA e do trifosfato de adenosina (ATP), principal forma de armazenamento de energia das células produzida durante a fotossíntese (TAIZ et al., 2017). Todavia, a sua baixa mobilidade no solo afeta a sua absorção em muitas espécies (LI et al., 2020).

De acordo com Generoso et al. (2017), solos com alto teor de argila, como os latossolos vermelhos, quando irrigados com níveis alto de água magnetizada tendem a reter o íon nas partículas do solo em função da condutividade da solução, não sendo disponibilizado para a planta. Shabani, Bolandnazar e Tabatabaei (2019) mostraram em seu experimento com *Ocimum basilicum* que soluções de fósforo magnetizadas favorecem a absorção do elemento pela planta, aumentando também o teor de clorofila, o que facilita a sua capacidade fotossintética.

Os teores de micronutrientes foliares de *M. officinalis* foram favorecidos em sua maioria pela água magnetizada (AM) em todos os níveis de água aplicada. Os maiores valores de cobre, manganês e ferro foram obtidos em plantas irrigadas com água magnetizada a 25% ETc (Tabela 7). A espécie quando cultivada em vasos e sob o manejo da irrigação apresentou a seguinte demanda de micronutrientes para o seu desenvolvimento: Fe (1177, 36 mg kg⁻¹) > Mn (74, 38mg kg⁻¹) > B (60, 36 mg kg⁻¹) > Zn(40,62 mg kg⁻¹) > Cu (12,28 mg kg⁻¹).

Tabela 7- Efeito de irrigação com diferentes níveis (% ETc) de água magnetizada (AM) e não magnetizada (NM) em ambiente protegido, nos teores de micronutrientes na matéria seca foliar de *M. officinalis*. Lavras-MG, 2020.

Micronutriente (mg kg ⁻¹)	Tipo de água	25	75	100	125	CV (%)
		% ETc				
Boro	AM	61,98 aA	68,3 aA	68,79 aA	66,23 aA	2,99
	NM	49,57 bB	55,5 bA	51,31 bB	61,17 bA	
Cobre	AM	17,44 aA	13,74 aB	12,33 aB	9,42 aA	13,64
	NM	6,84 bC	11,57 bB	15,69 aA	11,18 aB	
Manganês	AM	186,78 aA	65,5A aB	55,18 aC	53,28 aC	13,21
	NM	78,38 bA	55,57 bB	50,88 bB	40,57 bC	
Zinco	AM	38,09 aB	50,59 aA	48,32 aA	35,1 aB	4,35
	NM	27,23 bB	40,16 bA	44,52 aA	40,95 aA	
Ferro	AM	1692,99 aA	905,75 bB	1097,71 bB	986,92 bB	5,62
	NM	1126,24 bB	1213,92 aA	1218,02 aA	1204,73 aA	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro de cada nutriente não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Esse resultado pressupõe que a espécie tem mecanismos de eficiência fotossintética na absorção de micronutrientes, em razão do Fe e Mn atuarem como catalisador e ativador enzimático das reações essenciais na síntese de clorofila e proteínas (MALAVOLTA, 2006; TAIZ et al., 2017). Segundo Yadegari (2017), os micronutrientes em baixa concentração são necessários para o crescimento e desenvolvimento do vegetal, o ferro, manganês e cobre por exemplo, favoreceram as características de crescimento de *M. officinalis*, assim como os teores de óleo essencial e compostos fenólicos.

O efeito do campo magnético na água pode dissociar a molécula da água (H₂O) em íons de hidroxila (OH⁻) e hidrogênio (H⁺), alterando suas propriedades como tensão superficial, acidificação da água e, conseqüentemente do pH do solo (PANG, 2006). A elevação do pH de solos, como os Latossolos vermelhos tendem a reduzir a disponibilidade de micronutrientes para as plantas, os quais são mais absorvidos em solos ácidos (MALAVOLTA, 2006).

Além disso, o estresse hídrico afeta negativamente a mobilidade dos elementos cobre, zinco e boro que tem sua mobilidade reduzida pela difusão (RAHMAN; HANGS; SCHOENAU, 2020). No estudo de Liu et al. (2019), a água magnetizada promoveu o desenvolvimento radicular de plantas de *Populus*, assim como no aumento do teor foliar de ferro, zinco e cobre, e menor teor de manganês.

As diferenças nutricionais podem ser mais bem observadas na Figura 3, onde plantas irrigadas com água não magnetizada manifestaram folhas adultas amareladas, com menor volume foliar e algumas com zona foliar em necrose. Observa-se essas alterações principalmente nas plantas irrigadas com 25% ETc. De acordo com Veigas et al. (2013), a deficiências de nitrogênio e fósforo têm como principais sintomas as características acima citadas, assim pode-se dizer que a água magnetizada favoreceu a melhor absorção e aproveitamento desses nutrientes.

Figura 3- Aspecto nutricional de plantas de *M. officinalis* cultivadas em função da lâmina de irrigação (% ETc) com água magnetizada (AM) e não magnetizada (AC). Lavras-MG, 2020.

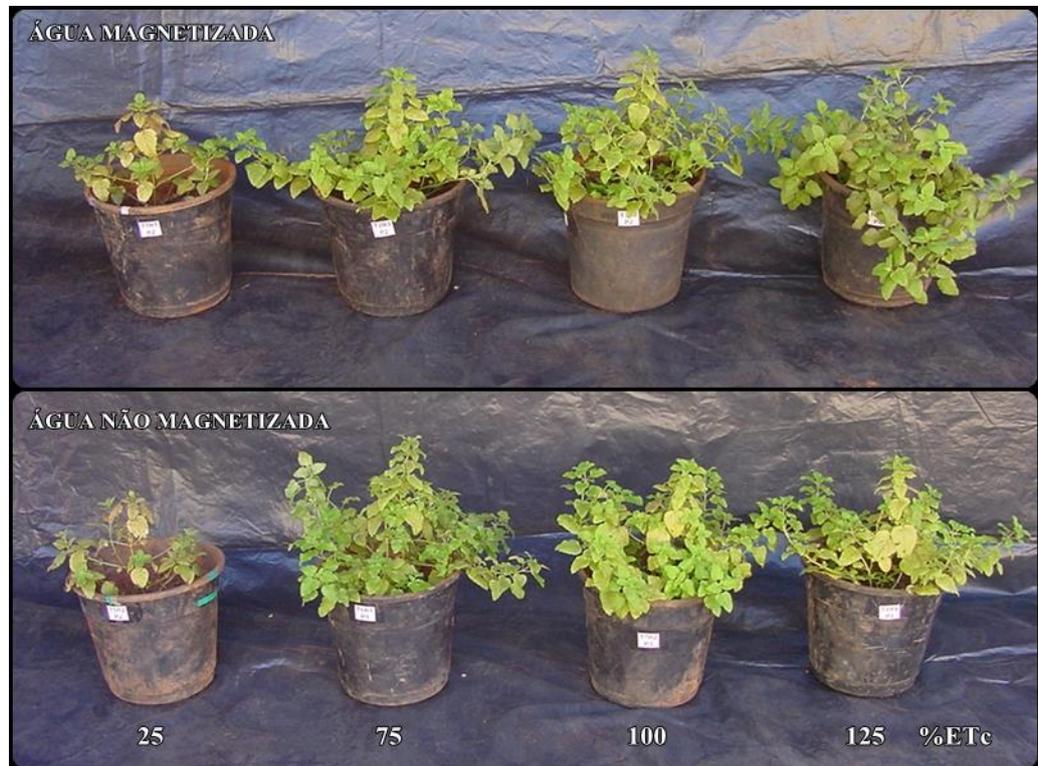
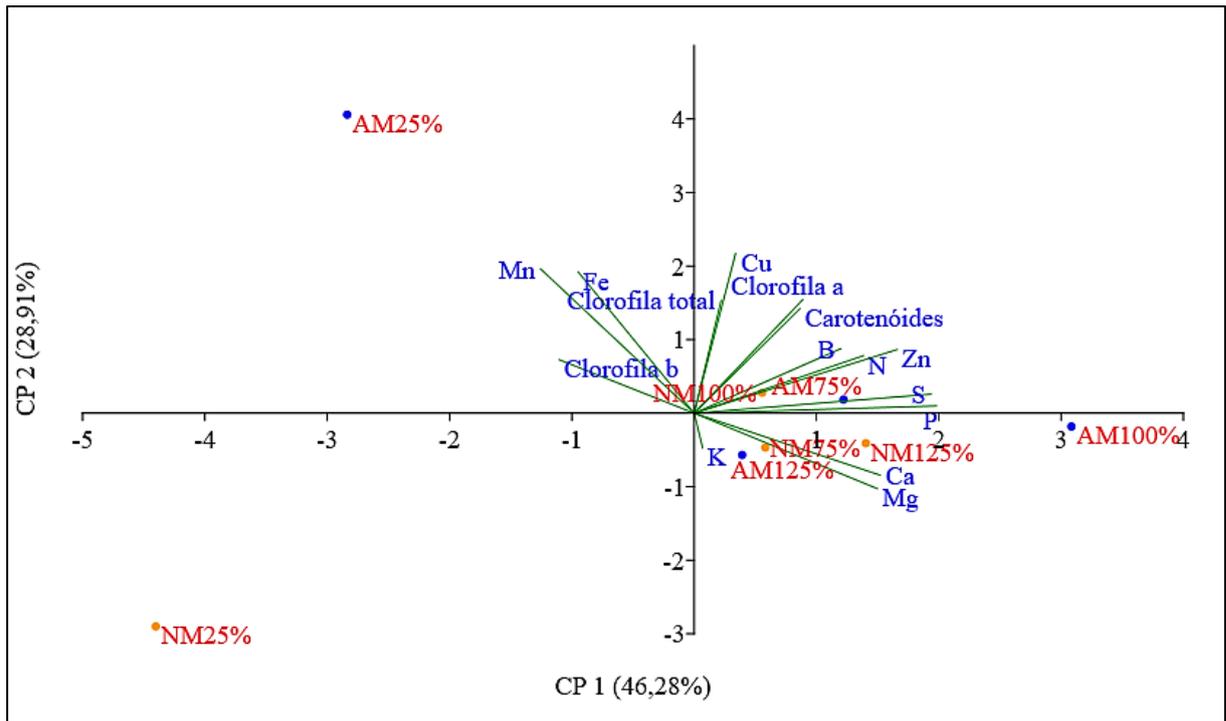


Foto: José Eduardo Brasil Pereira Pinto (2018).

Conforme a análise de componentes principais, a distribuição das variáveis selecionadas apresentou variação acumulada de 75,19% para os dois eixos, sendo a primeira componente responsável por 46,28% da variabilidade dos dados, enquanto que a segunda explica 28,91% (Figura 4). Verificou-se que os elementos manganês, ferro e clorofila *b* são correlacionados positivamente entre si, o que significa que plantas com alto teor de clorofila *b*, tendem a apresentar também alta concentração desses elementos quando irrigados com níveis 25% ETc de água magnetizada. As clorofilas *a*, total e carotenoides correlacionaram

fortemente aos elementos nitrogênio (N), boro (B), zinco (Zn), enxofre (S) e cobre (Cu) quando irrigados, principalmente com a lâmina 75% ETc com água magnetizada (AM).

Figura 4- Análise de componentes principais (PCA) dos atributos foliares das plantas de *Melissa officinalis* irrigadas com diferentes níveis de água magnetizada (25, 75, 100 e 125% ETc) e não magnetizada (25, 75, 100 e 125% ETc) em ambiente protegido. Lavras-MG, 2020.



De acordo com Garrone, Campos e Silveira (2016), os macronutrientes N e Ca são os que mais influenciam significativamente nas características anatômicas e fisiológicas que ocorrem nas folhas, como a síntese proteica, fotossíntese e integridade da parede celular das plantas, sendo que o aumento da disponibilidade de N é um agravante para a disponibilidade de Ca. Blank et al. (2006) trabalhando com a mesma espécie observou que a omissão de N e Ca juntamente com P afetaram a produção de folhas, órgão essencial para a reação da fotossíntese e produção de biomassa.

Além disso, os maiores níveis de água apresentaram correlação elevada com os nutrientes cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e fósforo (P) (Figura 4). Com exceção do P, os outros elementos dependem do fluxo de massa proporcionado pela presença de água no solo (MALAVOLTA, 2006).

Os diferentes níveis de água de irrigação afetaram significativamente a quantidade de proteínas solúveis totais (mg mL^{-1}) de folhas secas de *M. officinalis* (Tabela 8). A maior concentração de proteína ($0,45 \text{ mg mL}^{-1}$) e a menor ($0,19 \text{ mg mL}^{-1}$) foram observadas em plantas irrigadas com água magnetizada a 125% ETc e não magnetizada a 25% ETc, respectivamente. Em condições de estresse hídrico as plantas diminuem a concentração de proteínas e elevam o conteúdo de aminoácidos livres, a exemplo da prolina, como mecanismos de ajuste osmótico e outros efeitos deletérios as suas células (ZARRINABADI et al., 2019; MEIRA; MARTINS; ALVARENGA, 2019).

Tabela 8 - Efeito da água magnetizada (AM) e não magnetizada (NM) com diferentes níveis (% ETc) na concentração de proteínas solúveis totais (mg mL^{-1}) em folhas secas de *M. officinalis*. Lavras-MG, 2020.

Tipos de água	Níveis de água (% ETc)			
	25	75	100	125
	Proteínas solúveis (mg mL^{-1})			
NM	0,19 bD	0,26 bC	0,33 bB	0,35 bA
AM	0,31 aD	0,37 aC	0,38 aB	0,45 aA
CV%	0,63			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Conforme o estudo de Selim et al. (2019), a irrigação com água magnetizada mitiga as consequências negativas do estresse hídrico para a maioria dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos do vegetal, por meio do maior aproveitamento hídrico que preserva e mantém o conteúdo celular, assim como no acúmulo de aminoácidos como a prolina. Radhakrishnan (2019) relatou que a água magnetizada regula as funções das plantas, o crescimento e reduz o estresse oxidativo ambiental.

3.3 Teor, rendimento e composição química dos óleos essenciais

Verificou-se que o teor e rendimento apresentaram efeitos distintos com a aplicação dos níveis de água (Tabela 9). O nível 25% ETc de água não magnetizada (NM) proporcionou maior teor de óleo essencial (0,49%), e o nível de 125% ETc, independente da água utilizada, foi a que mais afetou positivamente o rendimento de óleo essencial ($32 \text{ mg planta}^{-1}$). *M.*

officinalis quando submetida a baixos volumes de água, tende aumentar o seu teor de óleo essencial como mecanismo de defesa (MEIRA et al., 2013).

O rendimento de óleo essencial extraído das folhas secas de *M. officinalis* foi afetado significativamente apenas entre os níveis de irrigação, variando de 12 a 32 mg planta⁻¹ para água magnetizada e 14 a 32 mg planta⁻¹ para não magnetizada. Já o teor de óleo essencial, apresentou efeito significativo na interação entre os níveis e tipos de água, variando de 0,27% a 0,49% (Tabela 9).

Tabela 9- Efeito de irrigação com diferentes níveis (% ETc) de água magnetizada (AM) e não magnetizada (NM) em ambiente protegido no teor e rendimento de óleo essencial de matéria seca foliar de *M. officinalis* cultivadas por 90 dias. Lavras-MG, 2020.

Níveis de água (% ETc)	Teor de óleo (%)		Rendimento (mg planta ⁻¹)	
	AM	NM	AM	NM
25	0,39 aB	0,49 aA	12 bA	14 bA
75	0,30 bA	0,28 bA	27 aA	26 aA
100	0,27 bA	0,27 bA	28 aA	28 aA
125	0,30 bA	0,31 bA	32 aA	32 aA
C.V.%	9,61		12,53	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Quanto a composição química do óleo essencial da espécie foram identificados 15 componentes químicos no óleo essencial das folhas de *M. officinalis*, sendo os componentes citronelal ($2,06 \pm 0,26$ a $3,66 \pm 0,02\%$), neral (β -citral) ($1,70 \pm 0,01$ a $2,53 \pm 0,02\%$) e geranial (α -citral) ($2,53 \pm 0,00$ a $3,27 \pm 0,02\%$) os majoritários encontrados no óleo essencial de todos os tratamentos (Tabela 10). De maneira geral, não foram observadas diferenças qualitativas entre os tratamentos, salvo a presença de (E)- β -ocimeno nos menores níveis de água, os quais atuam no mecanismo de defesa vegetal com suas propriedades alelopáticas e antifúngicas nas espécies (SOUZA FILHO et al., 2009; VASILAKOGLU et al., 2013).

Com base em possíveis rotas biossintéticas propostas para o citral e citronelal em *Cymbopogon winterianus*, o citral é precursor do citronelal (AKHILA, 1986). A partir da razão da concentração citral/ citronelal (Tabela 10) observou-se que os tratamentos com água magnetizada apresentaram razões maiores que nos tratamentos com água não magnetizada. Esse resultado sugere que a água magnetizada proporcionou a inibição da bioconversão de citral a citronelal. Com isto, plantas irrigadas com água magnetizada em especial com 75% a

125% ETc, acumularam maiores quantidades de citral. A atividade do citral é maior que a de citronelal de acordo com Nhu-Trang et al. (2006).

Para entender a influência do tratamento de água nos constituintes, uma PCA foi usada para distinguir a diferença dos tratamentos em relação a quantidade dos constituintes principais. Os dados obtidos dos scores e loadings da PCA forneceram uma visão conceitual dos tratamentos, explicando um total de 98,51% da variação nos níveis de água magnetizada e não magnetizada. O nível de variação associado ao componente principal 1 foi de 77,81%, enquanto o componente principal 2 explicou 20,70% da variação (Figura 5).

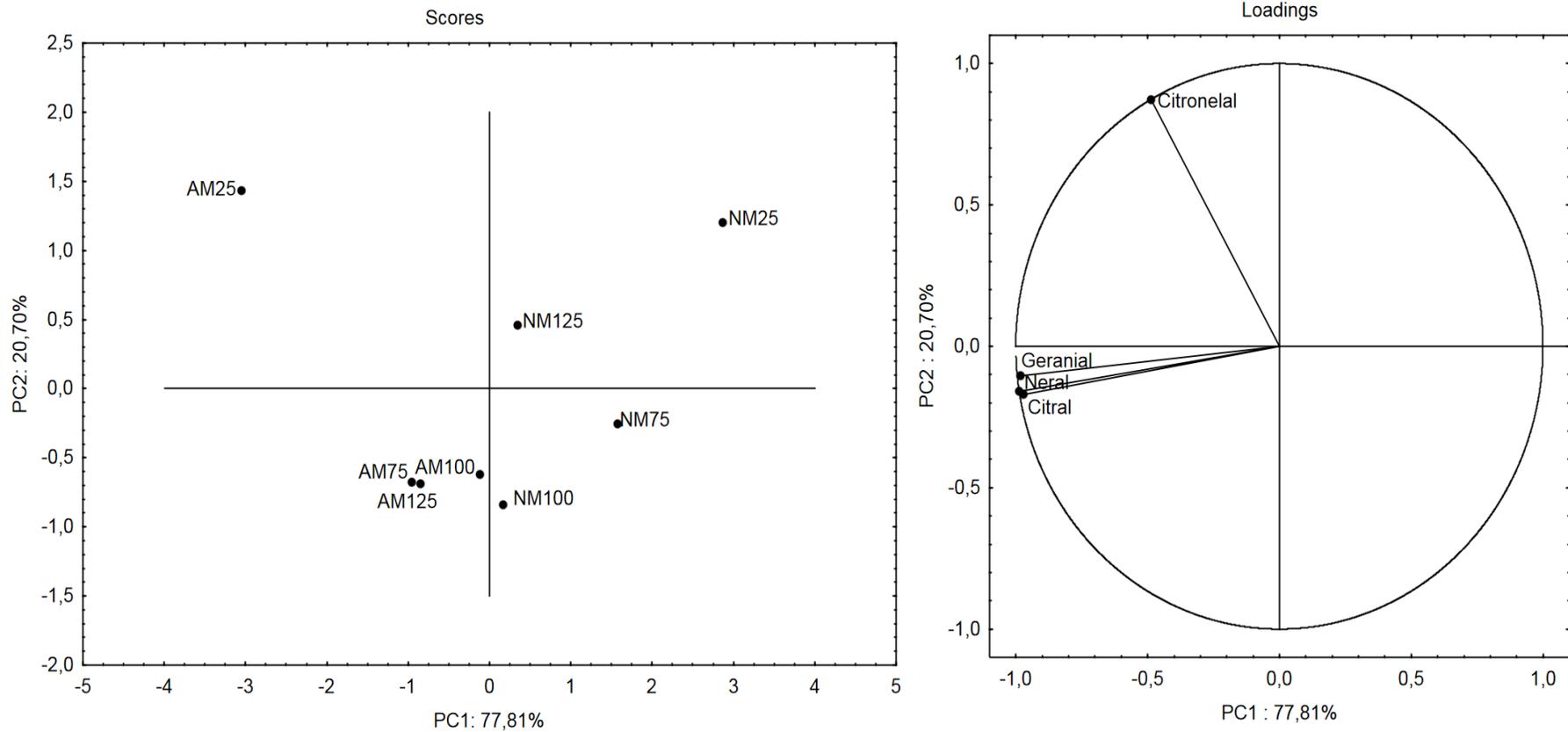
Dois grupos foram observados com água magnetizada: um a 25% ETc e outro acima de 75% ETc. A análise de loadings permitiu uma observação que níveis superiores a 75% ETc, proporcionaram maior acúmulo de citral (neral + geranial). Plantas irrigadas com baixos níveis de água magnetizada (25% ETc) tiveram maior concentração de citronelal. A análise de loadings indicou que neral e geranial tiveram uma correlação positiva. Estes resultados sugerem que o nível de água magnetizada acima de 75% ETc influencia a rota da síntese desses monoterpenos. Este estudo mostra que o conteúdo dos compostos pode mudar em *M. officinalis* com o cultivo com água magnetizada.

Tabela 10- Efeito de diferentes níveis de irrigação (% ETc) com água magnetizada (AM) e não magnetizada (NM) nos constituintes químicos do óleo essencial da matéria seca foliar de *M. officinalis* L. Lavras-MG, 2020.

Pico	Constituintes	Concentração do analito (mg mL ⁻¹) ± DP							
		%ETc							
		25%		75%		100%		125%	
		AM	NM	AM	NM	AM	NM	AM	NM
1	1-Octen-3-ol	0,07±0,00	0,05±0,00	0,06±0,01	0,06±0,00	0,06±0,01	0,06±0,00	0,06±0,01	0,07±0,00
2	6-Metil 5-hepten-2-ona	0,06±0,00	0,03±0,00	0,06±0,01	0,05±0,00	0,06±0,01	0,07±0,02	0,05±0,01	0,07±0,02
3	(E)-B-Ocimene	0,02±0,00	0,02±0,00	-	-	-	-	-	-
4	Óxido de limoneno	0,16±0,00	0,10±0,00	0,09±0,00	0,10±0,01	0,09±0,02	0,12±0,04	0,08±0,01	0,12±0,03
5	Citronelal	3,66±0,02	2,70±0,00	2,30±0,23	2,18±0,12	2,06±0,26	2,28±0,35	2,32±0,07	2,71±0,05
6	Isogeranial	0,07±0,00	0,03±0,00	0,07±0,00	0,06±0,01	0,07±0,01	0,09±0,00	0,07±0,01	0,09±0,01
7	Nerol (cis-Geraniol)	0,06±0,00	0,05±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,05±0,02	0,04±0,00	0,03±0,00
8	Neral (β-citral)	2,53±0,02	1,70±0,01	2,33±0,15	2,05±0,10	2,21±0,04	2,26±0,13	2,33±0,16	2,19±0,09
9	Geraniol	0,18±0,02	0,17±0,00	0,09±0,02	0,11±0,02	0,08±0,02	0,07±0,02	0,08±0,01	0,07±0,01
10	Citronelato de metila	0,07±0,00	0,08±0,01	0,04±0,01	0,05±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,00
11	Geranial (α-citral)	3,27±0,02	2,53±0,00	3,04±0,21	2,64±0,14	2,95±0,17	2,91±0,28	3,07±0,18	2,77±0,08
12	Geraniato de metila	0,07±0,00	0,06±0,00	0,05±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,05±0,00	0,04±0,00
13	Acetato de nerila	0,01±0,00	0,10±0,00	0,04±0,01	0,06±0,03	0,07±0,03	0,05±0,02	0,06±0,00	0,02±0,02
14	Acetato de geranila	0,33±0,01	0,37±0,00	0,26±0,03	0,29±0,08	0,26±0,06	0,19±0,03	0,24±0,02	0,14±0,02
15	Óxido de cariofileno	0,10±0,03	0,10±0,00	0,07±0,01	0,07±0,01	0,09±0,04	0,07±0,00	0,08±0,01	0,05±0,00
	Citral (neral + geranial)	5,79	4,24	5,37	4,69	5,15	5,17	5,40	4,97
	Geranial/ neral	1,29	1,49	1,30	1,29	1,33	1,29	1,32	1,26

DP: desvio padrão (n=3).

Figura 5- Scores e loadings da análise dos principais componentes (PCA) na correlação de matriz construída dos constituintes majoritários do óleo essencial da matéria seca foliar de *M. officinalis* L. em diferentes níveis de irrigação (% ETc) com água magnetizada (AM) e não magnetizada (AC). Lavras-MG, 2020.



4 CONCLUSÃO

O aumento dos níveis de irrigação baseado na evapotranspiração da cultura favorece o comprimento da parte aérea, maior acúmulo de matéria seca de folhas, caules e raízes, além de promover o maior rendimento de óleo essencial de *Melissa officinalis*.

A irrigação com água magnetizada no nível 25% ETc favorece a manutenção dos pigmentos fotossintéticos. E nos níveis acima de 25% ETc promove o maior acúmulo foliar de nutrientes minerais, induz o aumento das proteínas solúveis em folhas e favorece a síntese dos constituintes citral (neral + geranial) e citronelal no óleo essencial de *M. officinalis*. Já o teor de óleo essencial é beneficiado pelo menor nível de água não magnetizada.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.1 ed (online). Illinois: Allured Publishing, p. 804, 2017.
- AKHILA, A. Biosynthesis of monoterpenes in *Cymbopogon winterianus*. **Phytochemistry**, v.25, n.2, p. 421-424, 1986.
- BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; GALLO, J.R. **Métodos de análise química de plantas**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1983. 48p. (Boletim Técnico, 78).
- BIANCHI, L., GERMINO, G.H., SILVA, M. de A. Adaptação das plantas ao Déficit Hídrico. **Acta Iguazu**, Cascavel, v.5, n.4, p. 15-32, 2016.
- BLANK, A. F, OLIVEIRA, A. D.S, ARRIGONI-BLANK, M. DF.; FAQUIN, V. Efeitos da adubação química e da calagem na nutrição de melissa e hortelã-pimenta. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.2, p.195-198, 2006.
- BONACINA, C. et al. Changes in growth, oxidative metabolism and essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) subjected to salt stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 12, p.1665–1674, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976.
- BRANT, R.S; PINTO, J.E.B.P; ROSAL, L.F; ALVES, C.; OLIVEIRA, C. ALBUQUERQUE, C.J.B. Adaptações fisiológicas e anatômicas de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) cultivadas sob malhas termorrefletoras em diferentes intensidades luminosas. **Rev. bras. plantas med.** v.13, n.4, 2011.
- CHIEN, S.Y.; SHEEN, S.; SOMMERS, C.; SHEEN, L.Y. Combination Effect of High-pressure processing and essential oil (*Melissa officinalis* Extracts) or Their Constituents for the Inactivation of *Escherichia coli* in Ground Beef. **Food and Bioprocess Technology**, v.12, n.3, p. 359-370, 2019.
- ESMAEILNEZHAD, E.; CHOI, H.J.; SCHAFFIE, M.; GHOLIZADEH, M.; RANJBAR, M. Characteristics and applications of magnetized water as a green technology. **Journal of Cleaner Production**, v. 161, p. 908-921, 2017.
- FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFPA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GARRONE, R. F.; CAMPOS, A. G. de; SILVEIRA, C. P.; LAVRES JÚNIOR, J. Produção de biomassa, diagnose nutricional e absorção de nitrogênio e cálcio durante crescimento inicial do pinhão-mansão. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n.1, 2016.

GENEROSO, T. N. et al. Magnetização da água e os parâmetros de transporte de fósforo no solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 9–13, 2017.

HAYBAR, H.; JAVID, A.Z.; HAGHIGHIZADEH, M.H.; VALIZADEH, E.; MOHAGHEGH, S.M.; MOHAMMADZADEH, A. The effects of *Melissa officinalis* supplementation on depression, anxiety, stress, and sleep disorder in patients with chronic stable angina. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 26, p. 47–52, 2018.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p.1332-1334, 1979.

KARKANIS, A.; BILALIS, D.; EFTHIMIADOU, A. Architectural plasticity, photosynthesis and growth responses of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medicus) plants to water stress in a semi-arid environment. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.4, p. 369-374, 2011.

KITTLER, J., KRÜGER, H., ULRICH, D.; ZEIGER, B.; SCHÜTZE, W.; BÖTTCHER, CH.; KRÄHMER, A.; GUDI, G.; KÄSTNER, U.; HEUBERGER, H., MARTHE, F. Content and composition of essential oil and content of rosmarinic acid in lemon balm and balm genotypes (*Melissa officinalis*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.65, n.5, p. 1517-1527, 2018.

KREMER, J.L.; MELO, G.P.; MARINELLO, P.C.; BORDINI, H.P.; ROSSANEIS, A.C.; SÁBIO, L.R.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L.; VERRI, W.A., LUIZ, R.C. Citral prevents UVB-induced skin carcinogenesis in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.198, n.111565, 2019.

LI, H., LI, Y., XU, Y., LU, X. Biochar phosphorus fertilizer effects on soil phosphorus availability. **Chemosphere**, v.244, n.125471, 2020.

LIU, X.; ZHU, H.; MENG, S.; BI, S.; ZHANG, Y.; WANG, H.; SONG, C.; MA, F. The effects of magnetic treatment of irrigation water on seedling growth, photosynthetic capacity and nutrient contents of *Populus × euramericana* ‘Neva’ under NaCl stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, p. 41-11, 2019.

LONG, N.; TANG, H.; SUN, F.; LIN, L.; DAI, M. Effect and mechanism of citral against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vivo. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.99, n.9, p. 4423-4429, 2019.

MACEDO, M. F. S. Técnicas de irrigação, o desenvolvimento da agricultura e do agronegócio : Uma análise á luz da proteção humana e da cidadania frente á crise hídrica nacional. **Campo Jurídico**, v. 3, n. 2, p. 39–54, 2015.

MAHBOUBI, M. *Melissa officinalis* and rosmarinic acid in management of memory functions and Alzheimer disease. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 9, n. 2, p. 47, 2019.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo, **Agronômica Ceres**, 2006. 638p.

MARTINS, M. B. G.; PASTORI, A. P. Anatomia foliar com ênfase nos tricomas secretores e análise cromatográfica do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.77-82, 2004.

MEIRA, M.R.; MARTINS, E.R.; ALVARENGA, I.C. Prolina livre e flavonoides totais de *Lippia origanoides* submetidos a níveis de saturação por base e estresse hídrico. **Rev. Bras. Cienc. Agrar.**, Recife, v.14, n.2, 2019.

MEIRA, M.R.; MELO, M.T.P.; MARTINS, E.R.; PINTO, M.J.S.; SANTANA, C.S. Crescimento vegetativo, produção de fitomassa e de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob diferentes níveis de irrigação. **Ciência Rural**, v. 43, n.5, p. 779-785, 2013.

MOURA, D. DA S. C.; SILVA, D.DE B.; BISSACO, E.L.; MIGUEL, I.F.; CUNHA, M. F.; DOS SANTOS, M.J.T.; DA SILVA, M.A.; YOSHIDA, S.Y.; CUNHA, M.F. Gloss para herpes simples *Melissa officinalis*. **Pesquisa e Ação**, v.3, n.1, 2017.

NÉMETH-ZÁMBORINÉ, É.; RADÁCSI, P., GOSZTOLA, B., RAJHÁRT, P., SZABÓ, K. Influence of water supply and fluctuations on yield and quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n.12, p. 1539-1546, 2017.

NHU-TRANG T.T; CASABIANCA H.; GRENIER-LOUSTALOT M.F. Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis. **Anal Bioanal Chem**. v. 38, n.7, p.2141-52, 2006.

PANG, X. F. The conductivity properties of protons in ice and mechanism of magnetization of liquid water. **Eur. Phys. J. B**, Roma, v. 49, p.5-23, 2006.

RADÁCSI, P.; SZABO, K. ; SZABÓ, D.; TRÓCSÁNYI, E. Effect of water deficit on yield and quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Zemdirbyste-Agriculture**, v.103, n.4, p. 385–390, 2016.

RADHAKRISHNAN, R. Magnetic field regulates plant functions, growth and enhances tolerance against environmental stresses. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.25, n.5, p. 1107-1119, 2019.

RAHMAN, M.N; HANGS, R.; SCHOENAU, J. Influence of soil temperature and moisture on micronutrient supply, plant uptake, and biomass yield of wheat, pea, and canola. **Journal of Plant Nutrition**. v.43, n.6, p. 823-833, 2020.

SELIM, D.A.-F.H., NASSAR, R.M.A., BOGHDADY, M.S., BONFILL, M. Physiological and anatomical studies of two wheat cultivars irrigated with magnetic water under drought stress conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.135, p. 480-488, 2019.

SHABANI, E.; BOLANDNAZAR, S.; TABATABAEI, S. Magnetized Phosphorus Solution and Mycorrhization with *Diversispora versiformis* Affect P Use Efficiency, Growth and Photosynthetic Parameters in Sweet Basil (*Ocimum basilicum*), **Journal of Horticultural Research**, v.27, n.2, p.103-112, 2019.

SOUZA FILHO, A.P. DA S.; VASCONCELOS, M.A.M. DE.; ZOGHBI, M.DAS B.; CUNHA, R.L. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper*

hispidinervium C. DC. E *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazonica**, v.39, n.2, p. 389-396, 2009.

SOUZA, G. S. DE.; SILVA, J. DOS S.; OLIVEIRA, U. C. DE.; LIMA, J. DO C.; SANTOS, A.R. DOS. Rendimento de biomassa de plantas de erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) cultivada sob diferentes ambientes de luz e doses de fósforo. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Goiânia, v.8, n.15; p. 1516-1526, 2012.

SURENDRAN, U.; SANDEEP, O.; JOSEPH, E.J. The impacts of magnetic treatment of irrigation water on plant, water and soil characteristics. **Agricultural Water Management**, v.178, p.21–29, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TRIPATHY, M.K., MAHAWAR, D.K., CHANDRAKUMAR, K.R.S. Effect of nano-confinement on the structure and properties of water clusters: An ab initio study. **Journal of Chemical Sciences**, v.132, n.7, 2020.

VASILAKOGLU, I., DHIMA, K., PASCHALIDIS, K., RITZOULIS, C. Herbicidal potential on *Lolium rigidum* of nineteen major essential oil components and their synergy. **Journal of Essential Oil Research**, v.25, n.1, p.1-10, 2013.

VEIGAS, I. de J. M.; Sousa, G. O. de.; SILVA, A. F. DA.; CARVALHO, J. G. DE.; LIMA, M.M. Composição mineral e sintomas visuais de deficiências de nutrientes em plantas de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.). **Acta Amaz.** [online]. v.43, n.1, p.43-50, 2013.

WANG, Q.; XIE, J.; ZHANG, J.; WEI, K.; SUN, Y.; LI, Z. Effects of Magnetic Field Strength on Magnetized Water Infiltration and Soil Water and Salt Movement. **Nongye Jixie Xuebao/Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**, v.51, n.2, p. 292-298, 2020.

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

YADEGARI, M. Effects of Zn, Fe, Mn and Cu foliar application on essential oils and morpho-physiological traits of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v.20, n. 2, p. 485-495, 2017.

ZÁMBORINÉ, N.É. et al. Influence of water supply and fluctuations on yield and quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 12, p. 1539–1546, 2017.

ZARRINABADI, I.G.; RAZMJOO, J., ABDALI MASHHADI, A., KARIM MOJENI, H., BOROOMAND, A. Physiological response and productivity of pot marigold (*Calendula officinalis*) genotypes under water deficit. **Industrial Crops and Products**, v. 139, n.111488, 2019.

CAPÍTULO 3

REGULADORES DE CRESCIMENTO VIA FOLIAR AFETAM O CRESCIMENTO E O ÓLEO ESSENCIAL DE *Melissa officinalis* L.

RESUMO

O teor mínimo de 0,6% de óleo essencial é um dos principais parâmetros exigidos na composição da droga vegetal de *M. officinalis* pela Farmacopeia Brasileira. Os métodos com diferentes reguladores de crescimento têm sido utilizados para aumentar a produção de metabolitos secundários de muitas espécies de plantas medicinais. O objetivo desse estudo foi analisar o efeito de reguladores de crescimento em diferentes concentrações sobre a produção de matéria seca, teor de fenóis totais, no teor de proteínas solúveis, e no teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis*. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial com tratamento adicional $3 \times 4 + 1$, sendo três reguladores de crescimento [ácido naftaleno acético (ANA), benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA_3)] versus as concentrações 25, 50 e 100 g L^{-1} , mais o tratamento adicional (água destilada + Tween 80), com 4 repetições. Os reguladores de crescimento nas diferentes concentrações influenciaram significativamente o crescimento de *Melissa officinalis*. Os reguladores GA_3 e ANA na concentração 100 mg L^{-1} favoreceram o comprimento da parte aérea e a área foliar total da espécie. A aplicação foliar de BAP na maior concentração causou perda de dominância apical, mas a sua menor concentração favoreceu a concentração de proteínas solúveis nas folhas. Os reguladores BAP e GA_3 na concentração de 25 mg L^{-1} foram os que tiveram maiores efeitos no acúmulo de matéria seca da parte aérea, no rendimento de óleo essencial, no teor de fenóis totais e no teor de citral de *M. officinalis*, sendo esses resultados apenas inferior ao tratamento controle. A utilização foliar de reguladores de crescimento não são efetivos na produção de matéria seca e teor de óleo essencial de *M. officinalis* comparado ao tratamento controle.

Palavras-chave: Erva cidreira. Compostos voláteis. Citral.

1 INTRODUÇÃO

A planta aromática *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) é originalmente encontrada em países da Europa e Ásia, e facilmente cultivada em regiões que possuem clima temperado, como na região sul e sudeste do Brasil, podendo ser propagada via semente, divisão de touceiras ou estacas, sendo esta última a mais utilizada (WINIARCZYK et al. 2016; BRANT et al., 2011).

A importância econômica dessa espécie está associada às atividades biológicas e farmacêuticas do óleo essencial extraído das suas folhas, o qual é composto por vários constituintes como citronelal e citral, que comumente aparecem como componentes majoritários (PIRBALOUTI et al., 2019). Esse óleo é de grande interesse para muitas indústrias para a fabricação de chás, condimentos, aromatizantes, cosméticos e produtos farmacêuticos, devido as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antibacteriana e ansiolítica (SCHNITZLER et al., 2019; CHIEN et al., 2019).

Segundo Ganjewala, Gupta e Muhury (2012), a presença do citronelal e do citral (neral + geranial) como majoritários na composição química do óleo de *M. officinalis* é o mais valorizado pelas indústrias, principalmente para as farmacêuticas para a síntese de vitamina A. O citronelal, pertencente ao grupo dos monoterpenos possui atividades contra nematoíes e fungicida (MEDEIROS et al., 2017; DE ARAÚJO-FILHO et al., 2019). E o citral é um aldeído monoterpenoide derivado da mistura de neral e geranial muito utilizado nas indústrias alimentícias e de cosméticos, o qual possui efeitos antibacteriano, antiviral e antioxidantes efetivos contra alguns agentes estressores (SCHNITZLER et al., 2019; GANJEWALA; GUPTA; MUHURY, 2012; LONG et al., 2019).

A oferta contínua de óleos essenciais de qualidade é fundamental para a demanda do mercado de produtos farmacêuticos, alimentícios e cosméticos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Dentre os vários fatores que afetam a qualidade e quantidade do óleo essencial têm-se os reguladores de crescimento vegetal que podem atuar de forma positiva ou negativa na produção de matéria seca e nas características químicas e produtivas do óleo essencial em plantas aromáticas (SUEHIRO et al., 2019; OPABODE; RAJI, 2019).

Alguns estudos demonstraram que reguladores vegetais como as auxinas, citocininas e giberelinas, têm sido utilizados comercialmente em função do objetivo econômico do produtor, seja na produção de matéria seca ou na qualidade e rendimento dos metabolitos secundários (AKBARI et al., 2018; YUAN et al., 2019, OPABODE; RAJI, 2019). Povh e Ono (2006) verificaram em seu estudo que o regulador vegetal ácido giberélico (GA₃)

promoveu aumento no rendimento de óleo essencial de plantas de *Salvia officinalis* L., em contrapartida a aplicação do benzilaminopurina (BAP) que diminuiram essa variável. Em relação ao regulador ácido a-naftaleno acético (ANA) estudos demonstram que essa substância quando aplicada externamente na planta afeta positivamente no crescimento da parte aérea, assim como no sistema radicular e no rendimento do vegetal, melhorando a absorção de alguns nutrientes como o cálcio (ABBASI et al., 2013; ROSTAMI; MOVAHEDI, 2016). Dessa maneira, considerando o baixo rendimento de óleo essencial e a importância da aplicabilidade do óleo essencial, realizou-se esse estudo com o objetivo de analisar o efeito da aplicação de diferentes concentrações de reguladores vegetais sobre o crescimento, produção de matéria seca e no teor e qualidade da composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e produção de mudas

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Laboratório de culturas de tecido do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras, MG, situada nas coordenadas geográficas 21° 14'S e 45° 00W, a 918 m de altitude, no período de setembro a dezembro 2018.

As mudas de *Melissa officinalis* L. foram obtidas a partir da retirada de estacas apicais de 8 cm de plantas selecionadas e cultivadas *in vitro* durante 30 dias no Laboratório de Cultura de Tecido do DAG da Universidade Federal de Lavras, sendo transplantadas para bandejas de isopor de 128 células, preenchidas com substrato tropstrato HA sob irrigação em casa de vegetação aclimatizada por 15 dias. Um material testemunho da espécie está depositado no Herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA e correspondem ao nº 22155.

Cada parcela foi constituída com 4 vasos plásticos com capacidade de 10 L contendo uma mistura de Latossolo vermelho distrófico e areia na proporção 2:1 mais 450 g de esterco de curral por vaso, onde as mudas com 3 a 4 pares de folhas e aproximadamente 10 cm foram transplantadas. O substrato apresentou as seguintes características: 191,84 K⁺ (mg dm³); 27,05 P (mg dm³); 2,11 Ca⁺² (cmol_c dm³); 0,77 Mg⁺²; 0,05Al⁺³ (cmol_c dm³); 0,81 H+Al⁺³; 7,6 pH; 3,37 SB (cmol_c dm³); 3,42t (cmol_c dm³); 4,18T (cmol_c dm³); 80,67 V (%); 1,46 m (%); 2,67MO (dag Kg⁻¹); 30,76 P-Rem (mg L⁻¹).

2.2 Delineamento e condução experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial com um tratamento adicional ($3 \times 3 + 1$) e quatro repetições, cada uma constituída por quatro plantas. Os fatores estudados foram: tipos de reguladores de crescimento [GA_3 (ácido giberélico), BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético)] e níveis de concentrações (25, 50 e 100 mg L^{-1}) e um controle como tratamento adicional (água destilada mais Tween 80).

Foram realizadas 3 aplicações com intervalo de 15 dias durante o ciclo de 90 dias do cultivo da espécie, sendo a primeira aplicação realizada com 45 dias após o transplântio das mudas. Foram preparadas 200 mg L^{-1} de solução estoque no dia das aplicações, sendo acrescentado 0,05 de regulador de crescimento. Para a diluição de GA e ANA foi utilizado a base NaOH 0,5N e para a diluição do BAP foi utilizado o ácido HCl 0,5N, sendo adicionado $20 \mu\text{L}$ de Tween 80 em cada solução como agente espalhante em cada tratamento. A partir da solução estoque foram preparadas 100, 50 e 25 mg L^{-1} para cada regulador, adicionando água destilada para completar um volume de 200 mL. Os tratamentos foram pulverizados via foliar com o auxílio de um borrifador manual até o ponto de gotejamento da suspensão.

2.3 Análise do crescimento, pigmentos fotossintéticos, proteínas e compostos fenólicos

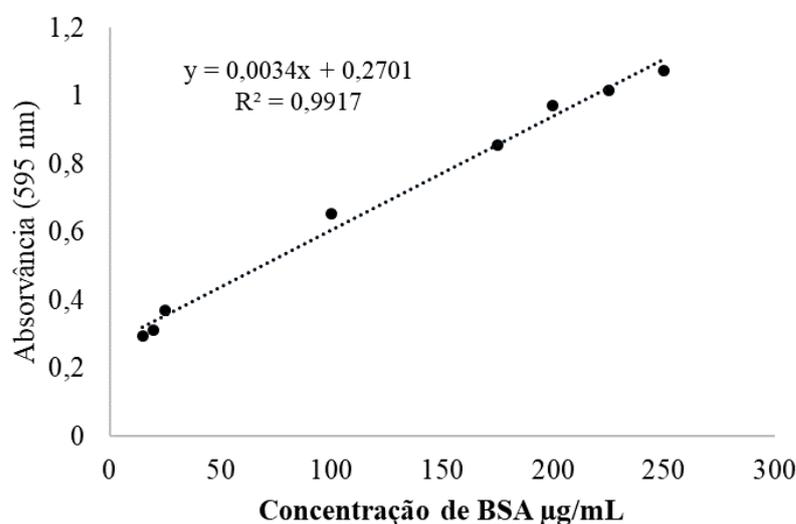
Crescimento vegetativo: Aos 90 dias após o transplântio foi avaliado o comprimento da parte aérea das plantas (CPA-cm), medida com o auxílio de fita métrica. Para obtenção de matéria seca de folhas, caules e raízes foram acondicionados em papel craft mantidos em estufa de secagem a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 h, pesando-se em seguida em balança analítica, sendo o resultado expresso em gramas. A área foliar total foi realizada com todas as folhas de três plantas de cada tratamento. Utilizou-se o integrador modelo 3100 LI, e expresso em centímetros quadrados. A razão de área foliar (RAF) expressa como a área foliar útil (AF) por matéria seca total (MST). A área foliar específica (AFE) expressa como área foliar útil (AF) por matéria seca da folha (MSF). E o peso específico de folha (PEF) expresso como matéria seca da folha (MSF) por área foliar útil (AF). A razão de peso de folha (RPF) é expressa como matéria seca de folha (MSF) por matéria seca da parte aérea (MSPA).

Pigmentos fotossintéticos: para a determinação de clorofila *a*, *b*, total ($a+b$) e carotenoides foram retiradas três folhas completamente expandidas da parte superior da planta que foram envoltas com papel alumínio e armazenadas em caixa de isopor com gelo. A

quantificação desses pigmentos foi realizada segundo o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979) com adaptações propostas por Barnes et al. (1992). Para isso, foram utilizadas 50 mg de folhas frescas rasuradas, adicionadas em tubos de Falcon cobertos com papel alumínio e incubadas com 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção de 5 g L⁻¹ saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃), em estufa a 65 °C por 48 h, conforme o protocolo de Santos et al. (2008). Após agitadas por quatro horas, filtradas e centrifugadas, três alíquotas de 3 mL de cada amostra foram transferidas para uma cubeta de quartzo, sendo os valores determinados com base nas leituras das absorvância em 480, 649 e 665 nm lidos em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control® (versão 3.37), versus o DMSO saturado em branco. A partir dessa leitura, quantificou-se o teor dos pigmentos (mg g⁻¹ Matéria Fresca) utilizando-se as equações baseados na metodologia de Wellburn (1994), sendo: Clorofila *a*₆₄₉ = (12,47 x A₆₆₅) - (3,62 x A₆₄₉); Clorofila *b*₆₆₅ = (25,06 x A₆₄₉) - (6,5 x A₆₆₅); Carotenoides₄₈₀ = (1000 x A₄₈₀ - 1,29 x clorofila *a* - 53,78 x clorofila *b*)/220. Clorofila total = Clorofila *a* + Clorofila *b*, onde A = absorvância das amostras lidas no comprimento de onda correspondente.

Proteínas solúveis: foram amostradas 15 mg de folhas de cada tratamento em triplicata, sendo o teor determinado conforme metodologia descrita por Bradford (1976). As leituras foram efetuadas no espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO na absorvância a 595 nm e comparadas com a curva-padrão de soro albumina bovina (BSA) com a concentração final de 5 µg µL⁻¹. Essa foi ajustada por regressão linear resultando na equação: $y = 0,0034x + 0,2701$ ($R^2 = 0,9917$) (Figura 1). A partir dessa, foi determinada a concentração de proteína foliar, expressa em mg mL⁻¹ extrato proteico.

Figura 1 – Curva-padrão de soro albumina bovina (BSA), com coeficiente linear (R^2)



Fenóis Totais: 50 mg de folhas secas pulverizadas foram adicionadas em microtubo de 2 mL extraídas com 1 mL de Etanol 92,8° GL, sendo a solução agitada em vortex e posteriormente levadas para sonicar por 10 minutos. Após isso, o extrato etanólico foi centrifugado por 15 minutos a 12000 rpm, sendo retirado o sobrenadante e adicionado em frasco âmbar identificado pela amostra correspondente do tratamento. No precipitado resultante do extrato etanólico foram adicionados mais 1 mL, e submetidos em mais um ciclo de sonicação e centrifugação. A solução resultante foi diluída em 16 vezes em etanol. Em microplacas foram adicionadas 50 µL da solução etanólica vegetal, acrescido de 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu 10% e carbonato de sódio a 7 %, sendo esse adicionado após 2 minutos. Os fenóis foram quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, 1999) utilizando ácido gálico como padrão. A análise foi realizada em quintuplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de matéria seca de folha.

2.4 Extração, teor e rendimento do óleo essencial

Para obtenção do óleo essencial, 50 g de folhas secas em triplicata para cada tratamento foram adicionadas em balão de destilação de 2L, sendo posteriormente acrescentados 1000 mL de água destilada e posto para hidrodestilar por 1h em aparelho de Clevenger modificado. O hidrolato obtido foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação, realizando-se três lavagens com diclorometano (3 x 5 mL). A fase orgânica foi reunida e tratada com o sal sulfato de magnésio anidro por cerca de 5 min para a absorção de resíduos de umidade, filtrando-o posteriormente. Após a evaporação do solvente diclorometano em temperatura ambiente sob capela de exaustão de gases, o óleo essencial obtido foi recolhido em frascos âmbar hermeticamente fechados, identificados e previamente pesados em balança digital, com sensibilidade 0,0001g, e por diferença de massa do frasco, antes e após a adição do óleo, foi obtida a sua massa em mg.

Determinou-se o teor de óleo essencial ($\text{mL}100 \text{ g de biomassa seca}^{-1}$), utilizando-se a formula: $\text{TOE\%} = (\text{massa do óleo (g)}/50\text{g}) \times 100$, e o rendimento do óleo (g planta^{-1}) do óleo essencial: $\text{RE} = (\text{massa do óleo (g)}/50\text{g}) \times \text{massa seca das folhas/planta (g)}$. Os frascos contendo os óleos essenciais foram armazenados em freezer a 4 °C, até o momento da análise química dos constituintes químicos.

2.4.1 Análise quantitativa e qualitativa dos constituintes químicos

As análises quantitativas dos constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas em triplicatas no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da UFLA. Utilizou-se a técnica de separação por Cromatografia Gasosa (CG) com um detector de Ionização em Chama (CG-DIC), no equipamento Agilent® 7890A, operado com sistema de processamento de dados MSD CHEM Station Ver. E.02.02.1431, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland). Para o preparo das amostras, utilizou-se 10 µL de solução estoque de Carvacrol como padrão interno, adicionado às massas conhecidas do óleo essencial, diluindo-se com 1 mL de acetato de etila. O volume de injeção foi de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 50:1.

Os óleos essenciais foram analisados empregando coluna HP-5MS (30m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme - Califórnia, EUA), utilizando-se gás hélio para o arraste dos constituintes, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram na faixa de 240° e 300 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, com uma rampa de temperatura de 3 °C min⁻¹ até 240°C, seguido de uma rampa de 10°C min⁻¹ até 280°C.

As análises qualitativas foram realizadas pela técnica de separação por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), utilizando-se um cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z.

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

2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro por meio do programa estatístico SISVAR® 5.0 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento vegetativo

Houve interação significativa dos fatores reguladores de crescimento e concentração para a produção de matéria seca (Tabela 1). A menor produção de matéria seca de plantas de *M. officinalis* foi observada com aplicação de ANA. Em relação ao BAP todas as matérias secas decresceram nas maiores dosagens aplicadas, no entanto as matérias secas desse regulador foram maiores em relação à aplicação de ANA. Aplicação de GA₃ nas concentrações mais altas induziu um aumento da matéria seca do caule de 11,67 para 14,84 g planta⁻¹ e conseqüentemente da matéria seca da parte aérea. Na Figura 2 observa-se maior crescimento da parte aérea e ramos mais jovens com aplicação da GA₃.

Tabela 1- Efeito da aplicação foliar do tipo de reguladores (ANA, BAP e GA₃) e concentrações no crescimento vegetativo de *M. officinalis* L. Lavras, MG, 2020.

Regulador de Crescimento	Concentração (mg L ⁻¹)		
	25	50	100
Matéria seca da folha (g planta⁻¹)			
ANA	9,13 cB	9,53 bB	14,61 aA
BAP	18,46 aA	14,29 aB	13,36 aB
GA	14,14 bB	13,97 aB	12,63 aB
Controle	19,48		
C.V (%)	12,24		
Matéria seca do caule (g planta⁻¹)			
ANA	7,99 bA	7,94 cA	7,70 cA
BAP	9,91 aA	10,06 bA	9,99 bA
GA	11,42 aB	13,64 aA	14,46 aA
Controle	9,66		
C.V (%)	12,29		
Matéria seca da raiz (g planta⁻¹)			
ANA	8,57 bA	9,80 aA	10,67 aA
BAP	10,46 aA	10,14 aA	9,31 aA

GA	12,20 aA	9,52 aB	7,91 bB
Controle		11,31 aB	
C.V (%)		14,45	
Matéria seca da parte aérea (g planta⁻¹)			
ANA	17,12 bC	17,48 bC	22,32 bB
BAP	28,37 aA	24,36 aB	23,35 bB
GA	25,56 aA	27,61 aA	27,10 aA
Controle		29,14	
C.V (%)		9,44	
Matéria seca total (g planta⁻¹)			
ANA	25,69 bC	27,28 bC	33,01 aB
BAP	38,84 aA	34,51 aB	32,67 aB
GA	37,76 aA	37,13 aA	35,00 aA
Controle		40,45	
C.V (%)		8,7	
R:PA			
ANA	0,50 aA	0,56 aA	0,49 aA
BAP	0,37 bA	0,42 bA	0,40 bA
GA	0,48 aA	0,35 bB	0,29 cB
Controle		0,39	
C.V (%)		13,66	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Conforme Akbari et al. (2018), a citocinina quando aplicada em doses adequadas promove o estímulo de brotações laterais. Isto estimula maior produção de folhas, pois em muitas espécies esse hormônio quebra a dominância apical, e promove o crescimento das gemas axilares. Este fenômeno também pode ser promovido pela giberelina. Em *M. officinalis* o estímulo de brotações laterais foi mais observado com aplicação da giberelina (GA_3) do que com a citocininas (BAP). Além disso, a citocinina também é responsável pela regulação do crescimento radicular sendo seu efeito dependente da concentração, pois em algumas espécies as doses elevadas desse hormônio inibiram o crescimento radicular por meio do estímulo da biossíntese do etileno que reduz o tamanho do meristema radicular e o comprimento da célula (ZOU et al., 2018). Em *M. officinalis* a menor matéria seca de raiz ($7,91 \text{ g planta}^{-1}$) foi observada com aplicação de giberelina na maior dosagem e, conseqüentemente, a menor relação raiz e parte aérea (R:PA 0,28).

Figura 2- Aspecto geral de planta de *M. officinalis* cultivada sobre o efeito de diferentes concentrações e tipo de reguladores de crescimento.



Foto: José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Houve efeito interativo entre regulador de crescimento e concentração sobre o comprimento da parte aérea, área foliar total e razão de área foliar (RAF) de *M. officinalis*. A aplicação de 100 mg L⁻¹ de GA₃ foi o mais efetivo no crescimento da parte aérea da espécie, a qual atingiu em média 52,06 cm quando comparada as concentrações de BAP e ANA que variaram de 37,50 a 44,56 cm, bem como as plantas controle (37,06 cm) (Tabela 2).

Tabela 2- Efeito da aplicação foliar dos reguladores de crescimento (ANA, BAP e GA₃) com diferentes concentrações, na altura, área foliar e razão área foliar de *M. officinalis* L. Lavras, MG, 2020.

Regulador de Crescimento	Concentração (mg L ⁻¹)		
	25	50	100
Comprimento da parte aérea (cm)			
ANA	43,00 aA	43,56 bA	44,56 bA
BAP	37,50 b B	41,56 bA	28,44 bC
GA ₃	44,43 aC	47,87 aB	52,06 aA
Controle	37,06		
C.V (%)	3,44		
Área foliar total (cm²)			
ANA	866,57 bB	1994,74 aA	1652,10 bA
BAP	1736,44 aA	1253,43 bB	1123,50 cB
GA ₃	1977,03 aA	1920,64 aA	2343,68 aA
Controle	1692,97		
C.V (%)	16,07		
RAF (cm² g⁻¹)			
ANA	34,59 aB	74,05 aA	48,26 bB
BAP	42,76 aA	35,88 bA	33,66 bA
GA ₃	53,82 aB	51, 12 bB	68,27 aA
Controle	42,23		
C.V (%)	18,82		
AFE (cm² g⁻¹)			
ANA	97,00 bB	212,93 aA	106,47 bB
BAP	87,25 bA	85,69 bA	82,63 bA
GA ₃	141,29 aA	135,66 bA	176, 62 aA
Controle	88,24		
C.V (%)	25,75		
PEF (cm² g⁻¹)			
ANA	0,006 aA	0,003 bB	0,005 aA
BAP	0,006 aA	0,007 aA	0,007 aA
GA ₃	0,004 bB	0,004 bB	0,003 bB
Controle	0,006		
C.V (%)	19,58		
RPF			
ANA	0,53 bB	0,54 bB	0,65 aA
BAP	0,65 aA	0,58 aB	0,57 bB
GA	0,55 bB	0,50 bC	0,46 cC
	0,67		

C.V (%)

5,73

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Com aplicação do GA₃ foi observado maior número de folhas de tamanho menor que os outros tratamentos (Figura 2). Consequentemente obteve-se um maior valor de área foliar total de 2.343,68 cm² em plantas submetidas a 100 mg L⁻¹ GA₃. A maior concentração de BAP provocou a perda de dominância apical na espécie diminuindo o comprimento da parte aérea da planta, induzindo brotações axilares com maior número de folhas e menor área foliar.

A variação da razão de área foliar (RAF) de *M. officinalis* L., submetida aos diferentes tratamentos com reguladores de crescimento vegetal, pode ser observada na Tabela 2. A RAF expressa à área foliar útil para a fotossíntese e matéria seca total. Esta, indica a área foliar que está sendo usada pela planta para produzir um grama de matéria seca (BENINCASA, 2003).

De maneira geral, os tratamentos com aplicação de GA₃ e ANA, promoveram aumento da RAF. Este comportamento representa evidência de que essas plantas apresentaram crescimento com aplicação desses reguladores. Normalmente a RAF é mais alta no início do ciclo vegetativo, decrescendo, posteriormente, com a maturação da planta. Aplicação do BAP induziu uma queda na RAF significando que quantidade de assimilados destinados às folhas diminuiu. As plantas não tratadas (controle) apresentaram valores da RAF próximo ao tratamento com BAP.

A área foliar específica (AFE) é um componente morfológico e anatômico da RAF, porque relaciona a superfície com o peso de matéria seca da folha (BENINCASA, 2003). No geral foi observado maior AFE na aplicação de ANA e GA₃, onde também foi encontrado para estes reguladores maior área foliar e menor matéria seca de folha (Tabela 2). Infere-se que as plantas investiram, relativamente, maior proporção de fotoassimilados no aumento da área foliar, neste caso devido maior número de folhas, para maximizar a captação da luz disponível. Geralmente o inverso AFE indica a espessura da folha que é o peso específico da folha (PEF). Neste caso, os menores valores para PEF foram encontrados com aplicação de ANA e GA₃ inferindo que estas são mais delgadas em relação ao tratamento com BAP, onde foram encontrados maiores valores para PEF.

As plantas de *M. officinalis* com aplicação de reguladores de crescimento comportaram como plantas cultivadas na sombra. Lambers et al. (1998) relataram que no cultivo com sombreamento, as folhas são mais delgadas, maior área foliar específica (AFE) e folhas com menor matéria seca. Berlyn e Cho (2000) reportaram que plantas sombreadas aumentam o AFE onde está diretamente relacionado com as alterações anatômicas como

cutícula e epiderme mais delgadas, menor espessura de mesofilo e de parênquima paliçádico. Em relação à razão de peso de folha (RPF) observou-se que aplicação de BAP no geral resultou em maiores valores. Este resultado demonstra que as plantas submetidas a aplicação de BAP acumularam maior matéria seca na folha.

As giberelinas, principalmente a GA₃ tem sido um dos principais hormônios vegetais pulverizados de forma exógena para estimular o maior crescimento, floração, produção e retardo da senescência em muitas culturas agrícolas, uma vez que ela está associada ao crescimento e melhor absorção de minerais, como fósforo, cálcio, potássio e magnésio (ZULFIQAR et al., 2019; RAMESH et al., 2019; OPABODE; RAJI, 2019). Todavia, segundo Suehiro et al. (2019) a amplitude do efeito de GA₃ assim como do BAP, dependem das condições experimentais, incluindo ano e planta, pois quando em alta concentração esses hormônios estimulam a biossíntese de etileno, o qual é responsável pela maturação dos órgãos vegetais e, conseqüentemente, o amadurecimento dos órgãos.

3.2 Pigmentos fotossintéticos

Aplicação de diferentes reguladores de crescimento afetaram significativamente os teores de pigmentos fotossintéticos e as dosagens não tiveram efeito significativo (Tabela 3). Verificou-se que a aplicação de ANA nas plantas induziu maior teor de clorofila *a* (1,13 mg g⁻¹ MF), clorofila *b* (0,53 mg g⁻¹ MF), total (1,65 mg g⁻¹ MF) e carotenoides (0,35 mg g⁻¹ MF), não diferindo apenas do tratamento controle (Tabela 3).

Tabela 3- Teor de pigmentos fotossintéticos de folhas de *M. officinalis* sob diferentes concentrações e tipos de reguladores crescimento vegetal.

Fatores	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenoide
	mg g ⁻¹ MF			
Regulador				
ANA	1,13 a	0,53 a	1,65 a	0,35 a
BAP	1,02 b	0,44 b	1,46 b	0,30 b
GA	0,96 b	0,41 b	1,37 b	0,30 b
Controle	1,15 a	0,46 b	1,59 a	0,34 a
Concentração (mg L⁻¹)				
25	1,02 ns	0,48 ns	1,50 ns	0,32 ns
50	1,00 ns	0,46 ns	1,47 ns	0,31 ns
100	1,07 ns	0,44 ns	1,51 ns	0,31 ns
C.V.%	12,13	18,55	11,12	9,76

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05). ns- não significativo.

O aumento dos pigmentos fotossintéticos pode estar associado a uma dependência direta desses hormônios nos processos biológicos relacionado ao teor de clorofila e crescimento vegetal (OPABODE; RAJI, 2019). Conforme Yuan et al. (2019) o aumento da auxina ativa os mecanismos genéticos envolvidos na síntese de clorofila e carboidratos, o que facilita o crescimento vegetal. No entanto, no caso com a *M. officinalis* a auxina aplicada (ANA) induziu menor acúmulo de matéria seca.

3.2 Teor de proteína e fenóis totais

As proteínas foliares de *M. officinalis* foram afetadas significativamente pela interação entre as concentrações e os tipos de reguladores de crescimento (Tabela 4). A pulverização de BAP a 25 mg L⁻¹ favoreceu a concentração de proteína foliar (0,53 mg mL⁻¹), assim como o ANA em concentrações crescentes. A aplicação de GA₃ por sua vez reduziu essa variável.

Tabela 4- Efeito de diferentes concentrações e tipos de reguladores de crescimento na concentração de proteínas solúveis totais de folhas secas de *M. officinalis* cultivada no período de 90 dias. Lavras, MG, 2020.

Regulador	Concentração (mg L ⁻¹)		
	25	50	100
	Proteínas solúveis totais (mg mL ⁻¹)		
ANA	0,24 bB	0,27 bB	0,31 aA
BAP	0,53 aA	0,34 aB	0,33 aB
GA	0,14 cA	0,14 cA	0,16 bA
Controle	0,25		
CV %	0,71		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). \pm DP.

Conforme o estudo de WILSON-GARCIA et al. (2008), a aplicação de BAP em concentrações reduzidas (0,1 mM) é capaz de atrasar a senescência foliar de algumas espécies, os quais relacionaram tal ação ao aumento do teor de proteínas brutas nas folhas. Assim, concentrações elevadas desse regulador de crescimento quando pulverizados via foliar pode ter ocasionado um efeito oxidativo em *M. officinalis* reduzindo o seu teor proteico.

Os maiores teores de fenóis totais de *M. officinalis* foram obtidos em plantas pulverizadas com GA₃ e BAP em doses crescentes, não diferindo apenas do tratamento controle. Por outro lado, o regulador ANA afetou de maneira decrescente o conteúdo fenólico das folhas da espécie (Tabela 5).

Tabela 5- Efeito de diferentes concentrações e tipos de reguladores de crescimento vegetal no conteúdo de fenóis totais de *M. officinalis* cultivada no período de 90 dias. Lavras, MG, 2020.

Regulador	Concentração (mg L ⁻¹)		
	25	50	100
	Fenóis totais (mg EAG/g)		
ANA	42,88 bB	40,71 bB	40,62 bB
BAP	45,08 bB	47,07 bB	52,54 bA
GA ₃	52,63 aB	54,17 aB	57,68 aA
Controle	63,13		
CV %	7,38		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Conforme Hu et al. (2018) e Almughraby, Kalimullin e Timofeeva (2019), a aplicação exógena de ácido giberélico GA₃ aumenta a capacidade antioxidante do vegetal, por meio da manutenção e síntese dos compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos. A espécie *M. officinalis* é uma das plantas medicinais que apresenta altos teores de compostos fenólicos, sendo o ácido rosmarínico e os flavonoides um dos principais responsáveis por sua capacidade antioxidante (PISTELLI et al., 2019; SAFARI; AKRAMIAN; SALEHI-ARJMAND, 2020). O ácido rosmarínico é encontrado em grande quantidade na espécie *M. officinalis*, o qual possui atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica, sendo relatado como requisito na atuação farmacológica da espécie (CALEJA et al., 2018; ERTAS; YENER, 2020).

3.3 Teor, rendimento e composição química do óleo essencial

Aplicação de diferentes tipos e dosagens de reguladores de crescimento não afetou o teor de óleo essencial em *M. officinalis* variando de 0,44 a 0,47% (Tabela 6). Houve efeito isolado do fator concentração sobre o rendimento de óleo essencial da espécie. As concentrações 25 e 100 mg L⁻¹ foram as mais efetivas, variando de 0,061 a 0,064 g planta⁻¹, respectivamente, já em relação aos reguladores o efeito da aplicação controle foi superior aos demais.

Em alguns estudos com espécies da família Lamiaceae, a aplicação de reguladores de crescimento promoveu maior teor de óleo essencial. Povh e Ono (2006), por exemplo, ao aplicarem GA₃ em *Salvia officinallis* L. obtiveram um aumento no teor de óleo essencial da

espécie, sendo o BAP ineficaz para a variável resposta. Por sua vez Rabiei, Bahador e Kordrostami (2018) obtiveram aumentos significativos no teor de óleo essencial e na concentração de alguns monoterpenos de *Thymus vulgaris* L. Além do tipo de regulador de crescimento utilizado e sua concentração, o teor de óleo de *M. officinalis* é dependente também do seu genótipo e idade da planta, sendo um teor relativamente baixo (0,01 a 0,35%).

Tabela 6- Efeito de diferentes concentrações e tipos de reguladores de crescimento vegetal no teor e rendimento de óleo essencial de *M. officinalis* cultivada no período de 90 dias. Lavras, MG, 2020.

Fatores	Teor de óleo (%)	Rendimento g planta⁻¹
Regulador		
ANA	0,47 ns	0,053 b
BAP	0,44 ns	0,065 b
GA	0,44 ns	0,060 b
Controle	0,44 ns	0,082 a
Concentração (mg L⁻¹)		
25	0,45 ns	0,061 a
50	0,43 ns	0,055 b
100	0,48 ns	0,064 a
CV%	18,36	19,54

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). ns-não significativo.

Observa-se que a concentração de 100 mg L⁻¹ de BAP não promoveu a síntese do constituinte citronelal (Tabela 7). Fatores externos como a aplicação de reguladores de crescimento, a exemplo a citocinina e auxina afetam a biogênese de terpenóides, elevando ou inibindo o seu conteúdo em algumas espécies (KRUMOVA et al., 2013; DANOVA et al., 2018). No estudo de Hazzoumi; Moustakime e Amrani Joutei (2014) com *O. gratissimum* L, a aplicação dos reguladores ácido giberélico (GA), ácido indole 3-acético (ANA) e benzilaminopurina (BAP) promoveram um aumento na composição química de alguns componentes do seu óleo essencial.

Tabela 7- Composição química do óleo essencial de *M. officinalis* submetida a diferentes concentrações dos reguladores de crescimento ANA, BAP e GA.

Pico	Constituintes	Concentração do analito (mg. mL ⁻¹) ± DP									
		Controle	25 mg L ⁻¹			50 mg L ⁻¹			100 mg L ⁻¹		
			ANA	BAP	GA	ANA	BAP	GA	ANA	BAP	GA
1	1-Octen-3-ol	0,02±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,03±0,00
2	6-Metil-5-hepten-2-ona	0,02±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00
3	Óxido de limoneno	0,02±0,00	0,05±0,00	0,01±0,01	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,01	0,04±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
4	Citronelal	0,85±0,00	0,94±0,03	0,92±0,01	0,93±0,00	0,83±0,00	0,72±0,01	0,41±0,06	0,93±0,00	-	0,81±0,00
5	Isogeranial	0,04±0,00	0,03±0,00	0,03±0,01	0,04±0,00	0,03±0,00	0,03±0,01	0,05±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
6	Nerol (cis-Geraniol)	-	0,02±0,00	-	0,05±0,00	-	-	0,03±0,00	-	-	0,02±0,00
7	Neral (β-citral)	2,38±0,02	2,33±0,09	2,66±0,07	2,90±0,20	2,94±0,21	2,66±0,07	2,68±0,18	2,31±0,25	2,53±0,20	2,65±0,03
8	Geraniol	-	0,05±0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Citronelato de metila	-	-	-	-	-	-	0,05±0,01	-	-	-
10	Geranial (α-citral)	3,77±0,03	3,17±0,13	4,09±0,11	4,34±0,31	4,28±0,29	4,09±0,11	3,84±0,27	3,37±0,35	3,86±0,30	3,68±0,04
11	Geraniato de metila	0,12±0,01	0,12±0,00	0,17±0,03	0,15±0,01	0,16±0,01	0,17±0,03	0,10±0,01	0,13±0,01	0,11±0,01	0,11±0,00
12	Acetato de geranila	0,50±0,01	0,02±0,00	0,47±0,03	0,43±0,04	0,41±0,03	0,47±0,03	0,35±0,02	0,37±0,05	0,47±0,04	0,43±0,01
13	Óxido de cariofileno	-	-	0,26±0,03	0,52±0,04	0,30±0,02	0,26±0,03	-	0,18±0,01	0,05±0,01	-
	Citral (neral + geranial)	6,15	5,5	6,75	7,24	7,22	6,75	6,52	5,68	6,39	6,33
	Geranial/neral	1,58	1,36	1,54	1,50	1,45	1,54	1,43	1,46	1,52	1,39

DP: desvio padrão (n=3).

4 CONCLUSÃO

O BAP e GA₃ quando pulverizados nas menores concentrações favorece o acúmulo de matéria seca da parte aérea de *M. officinalis*, o rendimento de óleo essencial, o teor de fenóis totais e o teor de citral na espécie, sendo esses resultados apenas inferior ao tratamento controle.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, N.A., ZAFAR, L., KHAN, H.A., AHAD QURESHI, A. Effects of naphthalene acetic acid and calcium chloride application on nutrient uptake, growth, yield and post harvest performance of tomato fruit. **Pakistan Journal of Botany**. v.45, n.5. p.1581-1587, 2013.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.1 ed (online). Illinois: Allured Publishing, p. 804, 2017.
- AKBARI, M., GHOBADI, M.E., GHOBADI, M., JALALI-HONARMAND, S., SAEIDI, M. Effect of decapitation and exogenous application of gibberellic acid (GA3) and cytokinin (CK) on some physiological characteristics of stevia. **Cellular and Molecular Biology**. v.64, n.2, p. 50-56, 2018.
- BARNES, J. D., BALAGUER, L., MANRIQUE, E., ELVIRA, S., & DAVISON, A. W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.32, n.2, p.85–100, 1992.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.
- BERLYN, G.P.; CHO, J. **Light, moisture, and nutrient use by plants**. In: ASHTON, M.S., MONTAGNINI, F. (Eds.) The silvicultural basis for agroforestry systems. Boca Raton: CRC Press, p.9-39, 2000.
- BIZZO, H.R.; HOVELL, A.C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v.32, n.3, p.588-594, 2009 .
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976.
- BRANT, RS; PINTO, JEBP; ROSAL, LF; ALVES, C., OLIVEIRA, C. ALBUQUERQUE, CJB. Adaptações fisiológicas e anatômicas de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) cultivadas sob malhas termorreletores em diferentes intensidades luminosas. **Rev. bras. plantas med.** v.13, n.4, 2011.
- CALEJA, C.; BARROS, L.; BARREIRA, J.C.M.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M.; CALHELHA, R.C.; BEATRIZ, M.; OLIVEIRA, P.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Suitability of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract rich in rosmarinic acid as a potential enhancer of functional properties in cupcakes. **Food Chemistry**, v.250, p. 67-74, 2018.
- CHIEN, S.Y.; SHEEN, S.; SOMMERS, C.; SHEEN, L.Y. Combination Effect of High-pressure processing and essential oil (*Melissa officinalis* Extracts) or their constituents for the inactivation of *Escherichia coli* in Ground Beef. **Food and Bioprocess Technology**, v.12, n.3, p.359-370, 2019.

DE ARAÚJO-FILHO, J.V. et al. Atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* e seu componente majoritário, citronelal, sobre nematoides gastrintestinais de ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.28, n.4, p. 644-651, 2019.

ERTAS, A.; YENER, I. A comprehensive study on chemical and biological profiles of three herbal teas in Anatolia; rosmarinic and chlorogenic acids. **South African Journal of Botany**, 130, p. 274-281, 2020.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GANJEWALA, D., GUPTA, A.K., MUHURY, R. An Update on Bioactive Potential of a Monoterpene Aldehyde Citral. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v.2, n.4, p.186-199, 2012.

HAZZOUMI Z.; MOUSTAKIME Y.; AMRANI JOUTEI K. Effect of gibberellic acid (GA), indole acetic acid (IAA) and benzylaminopurine (BAP) on the synthesis of essential oils and the isomerization of methyl chavicol and trans-anethole in *Ocimum gratissimum* L. **Springer Plus**, v.3, p. 321, 2014.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v.57, p.1332-1334, 1979.

KITTLER, J.; KRÜGER, H.; ULRICH, D.; ZEIGER, B.; SCHÜTZE, W.; BÖTTCHER, C.; KRÄHMER, A.; GUDI, G.; KÄSTNER, U.; HEUBERGER, H., MARTHE, F. Content and composition of essential oil and content of rosmarinic acid in lemon balm and balm genotypes (*Melissa officinalis*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.65, n.5, p.1517-1527, 2018.

LAMBERS, H.; CHAPIM III, F.S.; PONS, T.L. **Plant physiological ecology**. New York: Springer, 1998. 540p.

LONG, N., TANG, H., SUN, F., LIN, L., DAI, M. Effect and mechanism of citral against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vivo. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.99, n.9, p.4423-4429, 2019.

MEDEIROS, C.I.S.; SILVA, D.D.F.; DE LIMA PÉREZ, A.L.A.; De ALMEIDA FILHO, G.G.; DE OLIVEIRA FILHO, A.A.; DE OLIVEIRA LIMA, E. Study of the antifungal potential of (R)-(+)-citronellal and its association with therapeutic agents used in the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Bioscience Journal**, v.33, n.2, p.494-506, 2017.

OPABODE, J.T; RAJI, I.B. Exogenously applied gibberellic acid affects shoot regeneration, growth, physiological parameters, and proximate and mineral contents of pot-grown *Solanecio bialfrae*. **International Journal of Vegetable Science**. v.25, n.2, p. 73-86, 2019.

PIRBALOUTI, A.G.; NEKOEI,M.; RAHIMMALEK, M.; MALEKPOOR, F. Chemical composition and yield of essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under foliar applications of jasmonic and salicylic acids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, 2019.

- POVH, J. A.; ONO, E. O. Essential oil yield in *Salvia officinallis* L. under the action of plant growth regulators. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**. v.28, n.3, p.189-193, 2006.
- RABIEI, B.; BAHADOR, S.; KORDROSTAMI, M. The expression of monoterpene synthase genes and their respective end products are affected by gibberellic acid in *Thymus vulgaris*. **Journal of Plant Physiology**, v.230, p.101-108, 2018.
- ROSTAMI, M., MOVAHEDI, Z. Evaluating the effects of Naphthalene acetic acid (NAA) on morpho-physiological traits of valerian (*Valeriana officinalis* L.) in aeroponic system. **Iranian Journal of Plant Physiology**. v.6, n.3, p.1751-1759, 2016.
- SANTOS, R. P., DA CRUZ, A. C. F., IAREMA, L., KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Ceres**, v.55, n.4, 2008.
- SCHNITZLER, P. Essential Oils for the Treatment of Herpes Simplex Virus Infections. **Chemotherapy**. v. 64, n.1, p.1-7, 2019.
- SINGLETON, V.L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**. v.299, p.152 -178, 1999.
- SUEHIRO, Y.; MOCHIDA, K.; TSUMA, M.; YASUDA, Y.; ITAMURA, H.; TOMOYA, E. Effects of Gibberellic Acid/Cytokinin Treatments on Berry Development and Maturation in the Yellow-green Skinned 'Shine Muscat' Grape. **The Horticulture Journal**, v. 88, n.2, 2019.
- WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.
- WILSON-GARCIA, C.Y.; ZAVALETA-MANCERA, H. A.; LOPEZ-DELGADO, H.; HERNANDEZ-GARAY, A. The cytokinin BAP delays senescence and increases antioxidants, protein and growth in orchard grass (*Dactylis glomerata* L.). **Agrociencia**, vol.42, n.7, p.799-806, 2008.
- WINIARCZYK, K.; SEIDLER-ŁOZYKOWSKA, K.; GĘBURA, J., BOCIANOWSKI, J. Vitality and germination of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) seeds. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.89, p.156-162, 2016.
- YUAN, Y., XU, X., GONG, Z. et al. Auxin response factor 6A regulates photosynthesis, sugar accumulation, and fruit development in tomato. **Horticulture Research**, v.6, n.85, 2019.
- ZOU, X.; SHAO, J.; WANG, Q.; CHEN, P.; ZHU, Y., YIN, C. Supra optimal cytokinin content inhibits rice seminal root growth by reducing root meristem size and cell length via increased ethylene content. **International Journal of Molecular Sciences**. v.19, n.12, p.4051, 2018.

CAPÍTULO 4

ELICITORES AFETAM O CRESCIMENTO E OS TEORES DE ÓLEO ESSENCIAL EM *Melissa officinalis* L.

RESUMO

Os elicitores desempenham papéis fundamentais na defesa do vegetal e no seu desenvolvimento, promovendo o aumento de metabolitos secundários em muitas espécies em resposta a agentes estressores. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da aplicação foliar de diferentes tipos e concentrações de elicitores na produção de matéria seca, de pigmentos fotossintéticos, de proteínas solúveis totais, de fenóis, assim como no teor, rendimento e composição química do óleo essencial em *Melissa officinalis*. Foram conduzidos três experimentos em ambiente protegido no período de 90 dias. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo os tratamentos constituídos da aplicação foliar de metil jasmonato (0, 0,5, 2 e 8mM), ácido salicílico (0, 0,25, 0,5 e 1,0 mM) e quitosana (0, 2, 4 e 6g L⁻¹). A aplicação foliar de metil jasmonato em concentrações elevadas promoveu maior crescimento da parte área da planta, assim como no conteúdo proteico, dos fenóis totais e no teor e rendimento de óleo essencial. Além desses parâmetros, as maiores concentrações de ácido salicílico favorecem o acúmulo de matéria seca foliar e a concentração de citral (neral + geranial) e citronelal no óleo essencial da espécie. A maior concentração de quitosana por sua vez afetou somente a concentração de geranial e os fenóis totais. Pode-se dizer que a aplicação exógena de ácido salicílico em plantas de *M. officinalis* pode favorecer significativamente a produção de matéria seca foliar e a composição química dos constituintes majoritários do seu óleo essencial.

Palavras-chave: Erva-cidreira. Matéria seca. Metabólito secundário.

1 INTRODUÇÃO

Cidreira verdadeira como é conhecida popularmente a *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) é uma planta perene herbácea originária da Europa e da Ásia que produz óleo essencial com suave aroma de limão, presente principalmente nas folhas (LORENZI; MATOS; FRANCISCO, 2008). O seu valor terapêutico tem sido evidenciado e comprovado pelos avanços científicos, em virtude principalmente de sua atividade antioxidante e ansiolítica (ŚWIDER; STARTEK; WIJAYA, 2019).

Com os avanços nas pesquisas, o interesse comercial pelos óleos essenciais principalmente os com propriedades terapêuticas tem crescido expressivamente em todo o mundo. Dentre os maiores países consumidores tem-se os EUA, a França e outros da União Europeia que os utilizam em composições farmacêuticas, na perfumaria, como aromatizadores de alimentos e em produtos cosméticos, além de comercializarem várias substâncias dos óleos em forma purificada, como limoneno, citral, citronelal, eugenol e mentol (VASISHT; SHARMA; KARAN, 2016).

A espécie *M. officinalis* é muito utilizada pelo ramo farmacêutico, e dentre as várias substâncias que compõem o seu óleo essencial tem-se o citronelal e o citral (neral + geranial) que comumente aparecem como constituintes majoritários. Todavia, apesar do seu significativo valor terapêutico, os teores do óleo essencial dessa espécie ainda são muito baixos (0,01- 0,35%), sendo necessário investir em técnicas que visam uma boa produtividade de biomassa associada com a qualidade e teor de óleo essencial (MIRAJ; AZIZI; KIANI, 2016; KITTLER et al., 2018).

A utilização de substâncias elicitoras tem sido alvo de pesquisa como uma possível técnica que possa promover maior rendimento e qualidade das culturas agrícolas. Estudos recentes indicam que a aplicação exógena de substâncias como o Ácido Salicílico (AS), Metil Jasmonato (MJ) e Quitosana QT podem afetar de maneira positiva o crescimento e rendimento das plantas, uma vez que esses fitohormônios são produzidos naturalmente como mecanismo de defesa (DOUSSEAU et al., 2016; GORNI et al, 2017;TAHERI, 2019).

A elicitação dessas substâncias tem sido utilizada principalmente para melhorar a quantidade e qualidade de compostos bioativos nos vegetais, todavia o efeito desses elicitores nas concentrações propostas não foram estudados em *M. officinalis*. Portanto, objetiva-se verificar o efeito da aplicação foliar de metil jasmonato (MJ), ácido salicílico (AS) e quitosana (QT) em diferentes concentrações na produção de matéria seca, pigmentos

fotossintéticos, proteínas solúveis totais, fenóis, assim como teor, rendimento e composição química do óleo essencial em *Melissa officinalis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e produção de mudas

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Laboratório de culturas de tecido do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras, MG, situada nas coordenadas geográficas 21° 14'S e 45° 00W, a 918m de altitude, no período de maio a agosto de 2019.

As mudas de *Melissa officinalis* L. foram obtidas pela técnica de estaquia, a partir da retirada de estacas apicais de 8 cm de plantas selecionadas e cultivadas *in vitro* durante 30 dias no Laboratório de Cultura de Tecido do DAG da Universidade Federal de Lavras. Após 30 dias de cultivo, as mudas foram transplantadas para bandejas de isopor de 128 células, preenchidas com substrato comercial e mantidas sob irrigação em casa de vegetação aclimatizada por 15 dias. Um material testemunho da espécie está depositado no Herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA e correspondem ao nº 22155.

2.2 Condições experimentais da elicitação

As mudas foram transplantadas com 3 a 4 pares de folhas e aproximadamente 10cm de altura para vasos plásticos de 10 L, os quais foram preenchidos com uma mistura de latossolo vermelho distrófico e areia na proporção 2:1 mais 450 g de esterco de curral por vaso. Essa mistura apresentou as seguintes características químicas: 191,84 K⁺ (mg dm⁻³); 27,05 P (mg dm⁻³); 2,11 Ca⁺²(cmol_c dm⁻³); 0,77 Mg⁺²; 0,05Al⁺³ (cmol_c dm⁻³); 0,81 H+Al⁺³; 7,6pH; 3,37 SB (cmol_c dm⁻³); 3,42t (cmol_c dm⁻³); 4,18T(cmol_c dm⁻³); 80,67 V (%), 1,46 m (%); 2,67MO (dag Kg⁻¹); 30,76 P-Rem (mg L⁻¹).

Após 45, 60 e 75 dias do transplântio foi realizada 3 aplicações via foliar com 150 mL mais 2 mL de Tween 80 (0,05%) de solução de Elicitores em cada tratamento. A pulverização foi realizada com o auxílio de um pulverizador manual para cada tratamento, o qual foi mantido a uma distância de aproximadamente 15 cm da planta, borrifando até o ponto de gotejamento da suspensão.

Os tratamentos consistiram na aplicação foliar dos elicitores nas concentrações de Metil jasmonato (MJ) 0, 0,5, 2 e 8mM, Ácido salicílico (AS) 0, 0,25,0,5, 1,0 mM e Quitosana

(QT) e 0, 2, 4 e 6 g L⁻¹. Foram preparadas 150 mg L⁻¹ de solução estoque para cada elicitor, considerando a maior concentração.

Para o preparo da solução de 8mM de MJ, 896 mg foram diluídos em 500mL de água destilada, sendo adicionado 1 mL de álcool etílico anidro 99,8% P.A (ETOH) e 1 mL de Tween 80, a partir dessa solução foram feitas a de 2 e 0,5 mM. O tratamento controle foi constituído por 150 mL de água destilada, mais 0,3 mL de ETOH e 2 mL de Tween 80. A solução estoque na concentração 1,0 mM de AS foi preparada pela dissolução de 69,06 mg de soluto em 500 mL de água destilada, mais 0,3 mL de ETOH e 2 mL de Tween 80. A partir dessa foi realizado o preparo de 0,5 e 0,25mM. O controle foi preparado com 150 mL de água destilada, mais 0,3 mL de ETOH e 2 mL de Tween 80. O preparo da solução estoque na concentração 6 g L⁻¹ de QT foi obtido pela dissolução de 3 g de soluto em 495 mL de água destilada mais 5mL de ácido acético e 2 mL de Tween 80. A partir dessa foi preparada a concentração 4 e 2 g L⁻¹. O controle foi preparado com 1,5 mL de ácido acético, mais 148,5 de água destilada e 2 mL de Tween 80. Todo procedimento foi realizado as 16h30 quando a abertura estomática estava mais favorável.

2.3 Determinação do crescimento vegetal

Aos 90 dias após o transplântio, foram avaliadas as seguintes características: comprimento da parte aérea da planta (CPA-cm), medida com o auxílio de fita métrica; Matéria seca de folhas (MSF-g planta⁻¹); do caule (MSC- g planta⁻¹); do sistema radicular (MSR- g planta⁻¹); e da parte aérea (MSPA- g planta⁻¹), que é dada pela soma da MSF e MSC. O material coletado foi armazenado em sacos de papel Kraft identificado individualmente e colocado para secar em estufas de circulação de ar forçado, reguladas para a temperatura de 40 °C, correspondente, a um período de 72 h. Após a secagem, o material foi pesado em balança analítica, determinando sua matéria seca.

2.4 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes

Para a quantificação do teor de clorofilas e carotenoides, no horário da manhã foram coletadas folhas frescas completamente expandidas da parte apical de três plantas selecionadas ao acaso dentro de cada repetição dos tratamentos. As folhas foram condicionadas em papel alumínio e depositadas em recipiente refrigerado até serem transferidas para o Laboratório de Fitoquímica do Horto de Plantas Medicinais da UFLA.

A extração dos pigmentos foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979) com adaptações propostas por Barnes et al. (1992). Folhas frescas (50 mg) foram pesadas diretamente em tubos de Falcon cobertos com papel alumínio e incubadas com 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃), em estufa a 65 °C por 48 h. As amostras foram preparadas em quadruplicata. A saturação do DMSO seguiu o protocolo de Santos et al. (2008) com modificações, sendo utilizado para a saturação carbonato de cálcio (CaCO₃) na proporção de 5 g L⁻¹ de DMSO, sob agitação constante por quatro horas, e então filtrado duas vezes à vácuo em papel de filtro duplo.

Posteriormente, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min. Em seguida, três alíquotas de 3 mL de cada réplica foram transferidas para uma cubeta de quartzo, e os valores de densidade óptica em 480, 649 e 665 nm foram lidos em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control® (versão 3.37), versus o DMSO saturado em branco. A partir dessa leitura, determinou-se o teor dos pigmentos (mg g Matéria Fresca) utilizando-se as equações baseados na metodologia de Wellburn (1994), sendo:

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

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

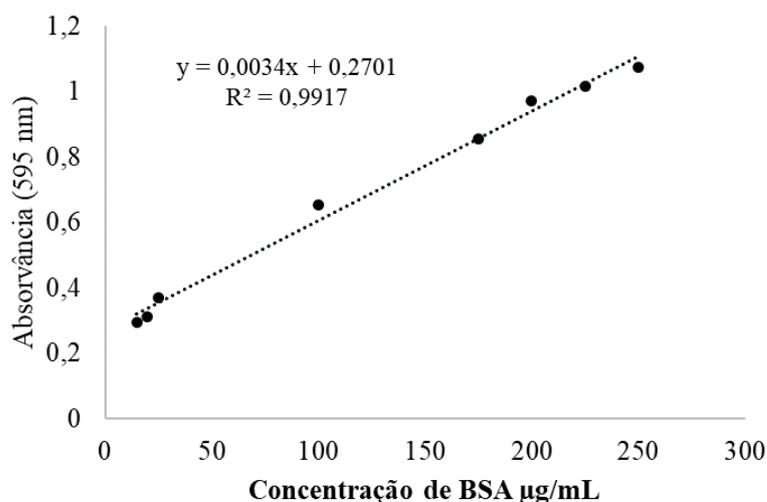
$$\text{Carotenoides}_{480} = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times Ca - 53,78 \times Cb) / 220.$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

2.5 Proteínas solúveis e fenóis totais

Proteínas solúveis: foram amostradas 15 mg de folhas de cada tratamento em triplicata, sendo o teor determinado conforme metodologia descrita por Bradford (1976). As leituras foram efetuadas no espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO a 595 nm e comparadas com a curva-padrão de soro albumina bovina (BSA) 1 g L⁻¹. Essa foi ajustada por regressão linear resultando na equação: $y = 0,0034x + 0,2701$ ($R^2 = 0,9917$) (Figura 1). A partir dessa, foi determinada a concentração de proteína foliar, expressa em mg mL⁻¹ extrato proteico.

Figura 1 – Curva-padrão de soro albumina bovina (BSA), com coeficiente linear (R^2)



Fenóis Totais: 50 mg de folhas secas pulverizadas foram adicionadas em mirotubo de 2 mL extraídas com 1 mL de Etanol 92,8° GL, sendo a solução agitada em vortex e posteriormente levadas para sonicar por 10 minutos. Após isso, o extrato etanólico foi centrifugado por 15 minutos a 12000 rpm, sendo retirado o sobrenadante e adicionado em frasco âmbar identificado pela amostra correspondente do tratamento. No precipitado resultante do extrato etanólico foram adicionados mais 1 mL, e submetidos em mais um ciclo de sonicação e centrifugação.

A solução resultante foi diluída em 16 vezes em etanol. Em microplacas foram adicionadas 50 µL da solução etanólica vegetal, acrescido de 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu 10% e carbonato de sódio a 7 %, sendo esse adicionado após 2 minutos. Os fenóis foram quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, 1999) utilizando ácido gálico como padrão. A análise foi realizada em quintuplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de matéria seca de folha.

2.6 Destilação e análise dos óleos essenciais

A destilação do óleo essencial de *M. officinalis* foi realizado em aparelho de Clevenger modificado pelo método de hidrodestilação, empregando-se 50 g de folhas secas rasuradas para cada repetição (3) por tratamento (4) de cada elicitor. Foi adicionado 1000 mL de água destilada em balões de destilação com capacidade de 2 litros durante de 60 min.

A purificação do óleo essencial destilado foi realizada através de partição líquido-líquido com diclorometano (3 x 5 mL). A fase orgânica resultante foi tratada com sulfato de

magnésio anidro, sendo filtrada em papel. Essa fração foi evaporada a temperatura ambiente sob capela de exaustão de gases. As massas dos óleos foram mensuradas em balança digital, com sensibilidade 0,0001g. A partir dessa foi determinado o teor conforme a fórmula: $TOE\% = (\text{massa do óleo (g)}/50 \text{ g}) \times 100$, e o rendimento do óleo (g planta^{-1}) do óleo essencial: $RE = TOE\% \times \text{massa seca das folhas/planta (g)}$. Após a determinação desses parâmetros os frascos contendo os óleos essenciais foram armazenados em freezer a 4 °C, até as análises cromatográficas.

As amostras dos óleos foram analisadas no Laboratório de Fitoquímica do Horto de Plantas Medicinais da UFLA, sendo quantificadas por Cromatografia Gasosa (CG) acoplado a um detector de Ionização em Chama (CG-DIC) Agilent® 7890A, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland). E operado com sistema de processamento de dados MSD CHEM Station Ver. E.02.02.1431.

As amostras foram preparadas acrescentando-se 10 µL de solução estoque do padrão interno à massas conhecidas do óleo essencial e diluindo-se com 1 mL de diclorometano. O volume de injeção foi de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 50:1. Empregou-se coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250°C e 300 °C, respectivamente. A condição de análise foi de rampa de aquecimento de 60 a 240°C, com taxa de aquecimento de 3°C min⁻¹, seguido de uma rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹ até 280 °C. As concentrações dos analitos foram expressas em mg/mL, calculados pelo método do padrão interno, usando fator de resposta relativo de acordo com IOFI Working Group on Methods of Analysis (IOFI, 2011), assim como pela porcentagem do analito na amostra.

As análises qualitativas dos óleos foram obtidas em triplicata por comparação dos seus espectros de massas, com o banco de dados do Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC. Por meio dos índices de retenção relativos dos constituintes químicos à co-injeção de uma solução padrão de n-alcanos (C8-C20) e/ou por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca

NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literaturas (ADAMS, 2017). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção descritos em literatura (ADAMS, 2017).

2.7 Análise estatística

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 tratamentos para cada elicitor (MJ-0, 0,5, 2 e 8mM), (AS-0, 0,25, 0,5 e 1 mM), (QT-0,2,4 e 6 g L⁻¹) e cinco repetições, sendo cada parcela constituída por três plantas. Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), com auxílio do programa estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2011). Análise componente principal (PCA) foi usado para estudar os compostos majoritários do óleo essencial em relação aos diferentes elicitores e concentrações. Statistica[®] software, versão 13.5 (StatSoft - Tulsa, USA) foi usado para esta análise estatística.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento Vegetal

As aplicações das diferentes concentrações e tipos de elicitores afetaram significativamente ($p > 0,05$) o crescimento de *M. officinalis*. A maior concentração (8 mM) de metil jasmonato (MJ) promoveu um aumento significativo no comprimento da parte aérea das plantas (CPA). A quitosana (QT) e o ácido salicílico (AS) não afetaram essa variável resposta, mas (Tabela 1).

No geral, MJ e AS não afetaram a matéria seca das plantas, mas incrementaram matéria seca de raiz nas dosagens mais baixas (Tabela 1). Já as concentrações de QT inibiram o acúmulo de matéria seca principalmente da folha (MSF) e total (MST). Apesar de não ocorrer diferença significativa na matéria seca de caule (MSC) houve uma queda, e esta também foi observada na matéria seca de raiz (MSR) (Tabela 1).

O MJ, assim como outros derivados jasmônicos é um hormônio vegetal produzido naturalmente pelas plantas frente a vários estímulos externos, e quando aplicado de maneira exógena no vegetal contribui para o aumento de resistência ao ataque de herbívoros (DEUNER et al., 2015). Além disso, estudos demonstram que esse elicitor está envolvido na indução da atividade enzimática do etileno, hormônio esse responsável pelo amadurecimento e abscisão de folhas, frutos e flores, promovida a partir da ativação de enzimas degradadoras de paredes celulares específicas que aumenta a taxa de atividade celular, que teoricamente

inibiria o crescimento e ganho de massa do vegetal (SILVA et al., 2017; OKAMOTO; TAKAHASHI 2019), para esses resultados a concentração utilizada desse elicitor pode não ter favorecido a produção ideal do etileno e nem afetado a atividade de auxina, a qual é responsável pelas atividades de crescimento do vegetal (CADORIN et al., 2015).

Tabela 1- Efeito do tipo e concentrações de elicitores metil jasmonato; ácido salicílico e quitosana no crescimento e acúmulo de matéria seca em plantas de *M. officinalis* elicidadas. Lavras, MG, 2020.

Elicitores	CP	MSF	MSC	MSR	MST	MSPA	R:PA
	cm	g planta ⁻¹					
Metil Jasmonato (mM)							
Sem elicitor	37,78 c	20,63 ns	9,54 ns	7,93 c	38,11 ns	30,18 ns	0,28 b
0,5	41,02 b	21,09 ns	9,77 ns	12,09 a	42,96 ns	30,88 ns	0,39 a
2	41,18 b	21,51 ns	10,09 ns	9,72 b	41,32 ns	31,60 ns	0,30 b
8	45,61 a	23,45 ns	10,61 ns	8,54 c	42,60 ns	34,06 ns	0,26 b
CV (%)	5,12	17,99	23,46	7,89	14,83	18,26	16,79
Ácido Salicílico (mM)							
Sem elicitor	44,26 ns	16,28 ns	9,78 ns	15,26 b	41,33 ns	26,07 ns	0,63 a
0,25	41,34 ns	17,38 ns	11,35 ns	21,42 a	50,15 ns	28,73 ns	0,76 a
0,5	41,91 ns	20,97 ns	11,47 ns	9,67 c	42,11 ns	32,44 ns	0,33 b
1	43,51 ns	21,48 ns	10,98 ns	8,31 c	40,78 ns	32,47 ns	0,27 b
CV (%)	6,19	30,76	32,87	18,00	20,96	29,90	26,70
Quitosana (g L⁻¹)							
Sem elicitor	47,15 ns	23,94 a	12,61 ns	12,87 a	49,42 a	36,55 a	0,35 ns
2	44,51 ns	15,80 b	11,58 ns	10,31 a	37,70 b	27,39 b	0,37 ns
4	45,35 ns	16,78 b	9,58 ns	8,35 b	34,72 b	26,37 b	0,32 ns
6	42,45 ns	18,69 b	9,32 ns	7,53 b	35,54 b	28,01 b	0,28 ns
CV (%)	6,83	18,63	23,58	18,06	14,42	17,65	25,08

CP= comprimento da planta; MSF=matéria seca foliar; MSC= matéria seca do caule; MSR= matéria seca da raiz; MST= matéria seca total; MSPA=matéria seca da parte aérea; R:PA= razão raiz: parte aérea. ns - não significativo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Quanto a relação R:PA, o AS na concentração 0,25 mM foi o que favoreceu a distribuição de matéria seca da parte aérea da planta para a raiz, não diferindo apenas do seu controle. O AS é um composto fenólico sintetizado naturalmente pelo vegetal por meio do metabolismo secundário para desempenhar várias ações, desde ao estímulo no crescimento e desenvolvimento vegetal como na indução de resistência vegetal sob condições de estresses bióticos e abióticos (MAIVAN et al., 2017; SAFARI et al., 2019).

Essa relação R:PA foi causada pelo maior desenvolvimento radicular da espécie que pode ser explicada pela atuação do AS nos processos de acumulação de carboidratos frente a

estresses que afetam a sua abertura estomática, assim como inibição do etileno e a aceleração da divisão celular no sistema apical radicular, garantindo o enraizamento mais profundo no solo e as tornando menos vulneráveis a estresses hídricos, por exemplo (OKAMOTO; TAKAHASHI, 2019; CHAVOUSHI et al., 2020).

3.2 Quantificação de Pigmentos Fotossintetizantes

As menores concentrações de QT foram as que favoreceram a maior produção de clorofila *a*, *b*, total, e carotenoides, sendo as clorofilas *b* e total também favorecidos pelas concentrações de AS (Tabela 2). Conforme Mukhtar Ahmed et al. (2020), a aplicação de quitosana em plantas pode aumentar sua capacidade fotossintética, por meio da ampliação das atividades enzimáticas do metabolismo do carbono e do nitrogênio, bem como a reação clara e escura da fotossíntese. Ahmad et al. (2019) obtiveram um aumento significativo no teor de clorofila em plantas de *Mentha piperita* L. ao serem tratadas com QT.

Tabela 2- Efeito do tipo e concentrações de elicitores metil jasmonato; ácido salicílico e quitosana no teor de pigmentos fotossintéticos de folhas frescas de *M. officinalis*. Lavras, MG, 2020.

Elicitores	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenóides
	(mg g ⁻¹ de massa fresca)			
Metil jasmonato (mM)				
0 (controle)	1,98 ns	1,62 ns	3,61 ns	0,41 ns
0,5	1,81 ns	1,62 ns	3,43 ns	0,41 ns
2	1,54 ns	1,70 ns	3,24 ns	0,36 ns
8	1,57 ns	1,46 ns	3,02 ns	0,38 ns
CV(%)	18,11	32,11	24,15	10,47
Ácido salicílico (mM)				
0 (controle)	1,53 ns	1,59 a	3,12 b	0,33 ns
0,25	1,66 ns	1,75 a	3,41 a	0,37 ns
0,5	1,56 ns	1,37 b	2,94 a	0,38 ns
1	1,67 ns	1,54 a	3,22 a	0,36 ns
CV(%)	13,48	28,59	18,47	18,57
Quitosana (g L⁻¹)				
0 (controle)	1,85 a	1,86 a	3,72 a	0,33 b
2	2,01 a	2,16 a	4,18 a	0,45 a
4	1,64 b	1,35 b	2,99 b	0,36 b
6	1,88 a	1,51 b	3,40 b	0,40 a
CV (%)	11,55	15,77	13,05	10,70

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ($P < 0,05$). ns - não significativo

Por sua vez, Vanda, Shabani e Razavizadeh (2019) trabalhando com a espécie *M. officinalis* *in vitro*, verificaram que a aplicação de QT na cultura induziu a produção endógena de MJ por aumentar espécies reativas de oxigênio como o H_2O_2 . A produção de MJ pela planta desempenha papel antioxidante no vegetal. Demonstrando assim, o efeito da QT nos pigmentos fotossintéticos.

O AS e a QT são, respectivamente, compostos fenólicos e biopolímero hidrofílico, utilizados como sinalizadores nas respostas sistêmicas de defesa vegetal. Essa é realizada por meio do estímulo de substâncias como os carotenoides, metabolitos secundários e enzimas específicas (RABÊLO et al., 2019; DOUSSEAU et al., 2016; SAFARI et al., 2019).

3.3 Proteínas Solúveis e Fenóis totais

Ácido Salicílico (AS)

As diferentes concentrações de AS não afetaram de maneira significativa o conteúdo de proteína foliar de *M. officinalis*. Por outro lado, as maiores concentrações desse elicitor promoveram as maiores concentrações de fenóis totais na espécie (Tabela 3). Safari et al. (2019), submetem a espécie *M. officinalis* a substâncias protetoras de forma exógenas e concluíram que essas substâncias estão fortemente relacionadas ao aumento dos níveis de expressão dos genes da fenilalanina amônia-liase e da chalcona sintase, como componentes-chave da via dos fenilpropanóides e o conteúdo de fenólicos e flavonóides totais.

Tabela 3- Efeito de diferentes concentrações de ácido salicílico (AS) na concentração de proteínas solúveis ($mg mL^{-1}$) e fenóis totais ($mgEAG/g$ planta) de folhas secas de *M. officinalis*.

AS (mM)	Proteínas solúveis	Fenóis totais
	mg/ mL	mgEAG/g planta
0 (controle)	0,51 ns	49,70 c
0,25	0,52 ns	54,28 b
0,5	0,48 ns	59,85 a
1,0	0,46 ns	59,79 a
CV%	0,56	3,73

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ($p < 0,05$). ns - não significativo.

Conforme Wassie et al. (2020), o ácido salicílico também atua como protetor térmico protegendo os danos à membrana induzidos pelo calor, reduzindo o conteúdo de vazamento de eletrólitos e malondialdeído e regula as atividades de enzimas antioxidantes, incluindo catalase, superóxido dismutase e peroxidase. Aplicação exógeno de AS em *Mentha piperita*

produziu um aumento no conteúdo de fenóis totais, este aumento foi correlacionado com um aumento na atividade da enzima fenilalanina amônia liase (CAPPELLARI et al., 2020).

Metil Jasmonato (MJ)

A aplicação exógena de MJ afetou de maneira inversa as concentrações de proteína e fenóis totais na espécie. O maior valor obtido de proteínas solúveis ($0,65 \text{ mg mL}^{-1}$) foi de plantas elicitadas com a maior concentração. De forma contrária, os maiores valores de fenóis totais foram observados nas menores concentrações do elicitor (Tabela 4).

Tabela 4- Efeito de diferentes concentrações de metil jasmonato (MJ) na concentração de proteínas solúveis (mg mL^{-1}) e fenóis totais (mgEAG/g planta) de folhas secas de *M. officinalis*.

MJ (mM)	Proteínas solúveis	Fenóis totais
	mg/ mL	mgEAG/g planta
0 (controle)	0,45 c	59,32 a
0,5	0,51 b	59,11 a
2	0,55 b	54,13 b
8	0,65 a	50,93 b
CV%	0,22	6,37

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

Os compostos fenólicos são substâncias que atuam no estresse oxidativo celular, eliminando ou inibindo radicais livres do processo oxidativo (SOARES, 2002). Taheri, Vatankhah e Jafarian (2020) ao aplicarem doses crescente de MJ em plantas de *Anchusa italica* verificaram que a sinalização desse elicitor é direcionada para a promoção de proteínas, prolina e pigmentos fotossintéticos como mecanismo de defesa vegetal. Assim, plantas em estresse oxidativo tendem a degradar suas proteínas solúveis em aminoácidos, afim de reduzir os danos causados pelos radicais livres, o que pode induzir a síntese de substâncias como os fenóis (BARBOSA et al., 2010).

Quitosana (QT)

O conteúdo de proteínas solúveis e fenóis totais tiveram comportamento inverso quando elicitados com concentrações crescentes de QT em plantas de *M. officinalis*. De forma que as proteínas solúveis foram favorecidas pela não elicitação e os fenóis pela maior concentração de quitosana (6 g L^{-1}) (Tabela 5). De acordo com Hidangmayum et al. (2019), plantas tratadas com QT estimula a taxa fotossintética, fechamento estomático, através da síntese do ácido abscísico; melhora as enzimas antioxidantes por meio das vias de sinalização de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio e induz a produção de ácidos orgânicos, açúcares,

aminoácidos e outros metabólitos necessários para o ajuste osmótico, sinalização de estresse e metabolismo energético sob estresse. Conforme, Vanda, Shabani e Razavizadeh (2019), a elicitação de QT promove um aumento significativo de ácido rosmarínico e fenólicos totais em *M. officinalis* por meio da estimulação endógena de MJ. Dessa forma, a atuação de QT nesses parâmetros foi potencializada pela ação conjunta dos dois Elicitores na proteção oxidativa do vegetal.

Tabela 5- Efeito de diferentes concentrações de quitosana (QT) na concentração de proteínas solúveis (mg mL⁻¹) e fenóis totais (mgEAG/ g planta) de folhas secas de *M. officinalis*.

QT (g L ⁻¹)	Proteínas solúveis	Fenóis totais
	mg/ mL	mgEAG/ g planta
0 (controle)	0,79 a	45,35 b
2	0,58 b	47,23 b
4	0,56 b	46,97 b
6	0,61 b	50,09 a
CV%	0,48	5,79

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

3.4 Teor, Rendimento e Composição química do Óleo Essencial

As maiores concentrações de MJ (8 mM) e AS (1,0 mM) promoveram maior teor e rendimento de óleo essencial nas folhas de *M. officinalis*. Este aumento foi de 83% na aplicação de MJ e três vezes mais para o AS. Todavia, a concentração 2g L⁻¹ de QT foi a que aumentou o teor de óleo essencial em *M. officinalis*, não sendo significativo quando aplicado em maiores concentrações (Tabela 6). Segundo Taheri, Vatankhah e Jafarian (2020), o MJ influencia a síntese dos terpenóides e formação dos tricomas foliares, resultando assim no aumento do rendimento e qualidade do óleo essencial.

O AS e o MJ são substâncias conhecidas e utilizadas na indução de síntese de substâncias do metabolismo secundário, como óleos essenciais, compostos fenólicos, proteínas e outros, sendo as respostas dependentes do agente externo, da concentração utilizada e da espécie vegetal (DOUSSEAU et al., 2016; CHAVOUSHI et al., 2020; TALEBI; MOGHADDAM; PIRBALOUTI, 2019).

Tabela 6- Efeito de diferentes tipos e concentrações de elicitores metil jasmonato; ácido salicílico e quitosana no teor e rendimento de óleo essencial *M. officinalis* cultivada por um período de 90 dias. Lavras, MG, 2020.

Elicitores	Teor (%)	Rendimento (mg planta ⁻¹)
Metil jasmonato (mM)		
0 (controle)	0,12 b	22 b
0,5	0,15 b	32 b
2	0,10 b	16 b
8	0,22 a	49 a
CV(%)	32,95	35,02
Ácido salicílico (mM)		
0 (controle)	0,16 b	28 b
0,25	0,19 b	38 b
0,5	0,41 a	81 a
1,0	0,49 a	105 a
CV(%)	23,19	22,31
Quitosana (g L⁻¹)		
0 (controle)	0,18 b	40 ns
2	0,29 a	50 ns
4	0,17 b	30 ns
6	0,12 b	20 ns
CV (%)	30,38	32,89

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ($p < 0,05$). ns - não significativo.

A Tabela 7 apresenta a composição química do óleo essencial de plantas de *M. officinalis* elicitadas com diferentes doses de AS, MJ e QT. Foram identificados 16 constituintes químicos, os quais representaram mais de 85% da composição química total do óleo de *M. officinalis*. A elicitação induziram alterações nas concentrações e razões de geranial e neral, e de citral e citronelal.

Na elicitação com AS nos tratamentos controle e 0,25mM houve maiores valores da razão da concentração geranial/neral indicando menor taxa de conversão de geranial a neral. Além disso, o tratamento com a menor dose de AS inibiu a conversão de citral para citronelal. Este fenômeno foi demonstrado pelo maior valor da razão de concentração entre citral e citronelal (4,62). Do ponto de vista biológico, o citral é mais potente do que o citronelal Nhu-Trang et al. (2006).

Pesquisas como a de Ahmed et al. (2020) indicam que a aplicação de QT em plantas aromáticas como o *Cymbopogon winterianus* promove o aumento do citronelal e geranial no óleo essencial. Em *Mentha piperita* L. esse elicitor promoveu teores significativos de mentol e

mentonas (AHMAD et al. 2019). Cappellari et al. (2020) reportaram que as concentrações dos principais monoterpênicos presentes no óleo essencial de hortelã-pimenta (OE) aumentou com aplicação AS ou MJ. O biopolímero natural, quitosana aumenta as respostas fisiológicas do vegetal por meio das vias de sinalização de transdução do estresse, estimulando a biossíntese de AS e derivados jasmônicos (VANDA; SHABANI; RAZAVIZADEH, 2019). Pirbalouti et al. (2019), verificaram que a aplicação foliar de AS melhorou significativamente os hidrocarbonetos de sesquiterpenos e os sesquiterpenos oxigenados, como β -cariofileno e óxido de cariofileno, todavia não influenciam nas concentrações de geranial e neral no óleo essencial da espécie. Aumentos significativos na biossíntese total de óleo essencial e metilchavicol foram observados após a elicitação com quitosana, metil jasmonato e salicilato de metila (DESCHAMPS et al., 2008).

Comparação dos constituintes do óleo essencial com PCA

A análise de PCA (Figura 2) confirma os resultados da Tabela 7. Nas concentrações de 0,5 e 1mM de AS houve maior taxa de conversão de geranial a neral representada pela correlação positiva destas variáveis. Os dados obtidos dos scores e loadings das PCAs fornecem uma visão conceitual dos tratamentos, explicando um total de 97,37% da variação com MJ (Figura 2a), 95,16% para AS (Figura 2b) e 78,52% para QT (Figura 2c). Com aplicação do MJ foram observados que a concentração de MJ a 2 mM influenciou positivamente o conteúdo de citronelal, MJ 0 e 5 mM foi associado aos fenóis totais e o MJ 8mM ao teor e rendimento do óleo essencial.

A aplicação do AS na concentração de 1 mM influenciou positivamente na concentração de citronelal, no rendimento e teor de óleo essencial e na matéria seca da folha. Por sua vez, as menores concentrações de AS 0,25 e 0,5 mM se correlacionaram as proteínas solúveis, aos componentes geranial, neral e fenóis totais.

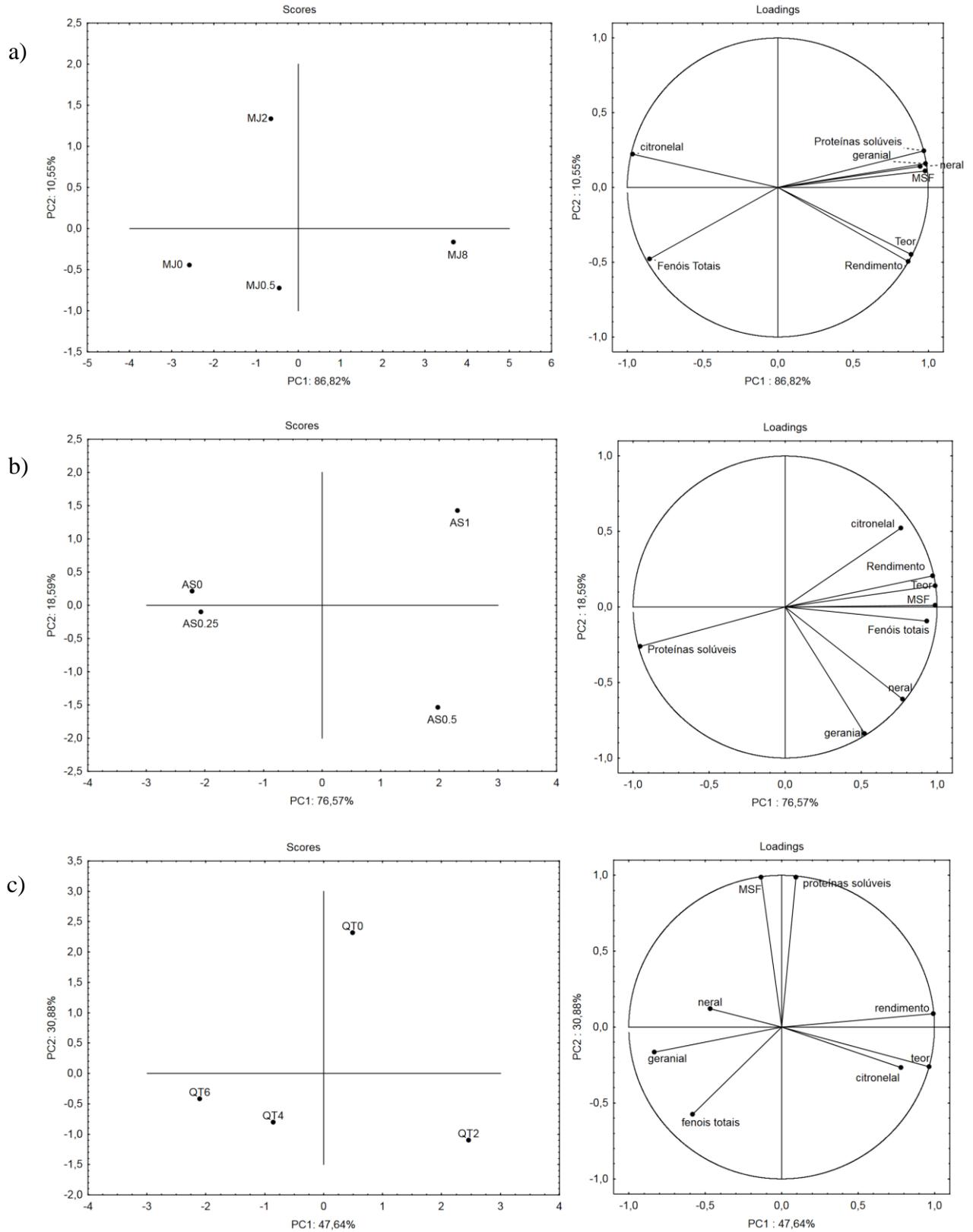
Na aplicação com a QT, as maiores concentrações (4 e 6 g L⁻¹) foram correlacionadas aos teores de fenóis totais e ao componente geranial. Por outro lado, a concentração 2 g L⁻¹ afetou positivamente na concentração de citronelal e teor de óleo essencial. Sendo o tratamento controle (QT0) o qual favoreceu o teor de proteínas solúveis e o rendimento de óleo essencial da espécie. Estes resultados sugerem que os elicitores influenciam a via da síntese de monoterpênicos no cultivo de *M. officinalis*. Este estudo mostrou que o conteúdo dos compostos pode ser alterado significativamente no de cultivo de *M. officinalis* aplicando diferentes tipos e concentrações de elicitores.

Tabela 7- Constituintes químicos do óleo essencial de *M. officinalis* submetidas a diferentes concentrações de ácido salicílico (mM), metil jasmonato (mM) e quitosana (g L⁻¹).

Pico	Constituintes	Concentração do analito (mg mL ⁻¹) ± DP											
		Ácido salicílico (mM)				Metil jasmonato (mM)				Quitosana (g L ⁻¹)			
		0	0,25	0,5	1	0	0,5	2	8	0	2	4	6
1	1-Octen-3-ol	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,0	0,04±0,00	0,04±0,00	0,03±0,01	0,03±0,00	0,04±0,00	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,00	0,03±0,00
2	6-Metil-5-hepten-2-ona	0,01±0,00	0,01±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,03±0,01	0,03±0,02	0,03±0,00	0,03±0,00
3	(E)-B-Ocimene	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,01±0,00
4	Óxido de limoneno	0,03±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00
5	Citronelal	1,52±0,06	1,23±0,06	1,56±0,06	1,92±0,04	1,62±0,05	1,34±0,01	1,51±0,10	1,06±0,05	1,54±0,10	1,85±0,12	1,74±0,16	1,20±0,11
6	Isogeranial	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,03±0,00
7	Nerol (cis-Geraniol)	0,04±0,00	0,06±0,00	0,02±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,07±0,06	0,04±0,00
8	Neral (β-citral)	2,29±0,09	2,24±0,11	2,71±0,00	2,41±0,03	2,01±0,09	2,33±0,06	2,32±0,18	2,57±0,00	2,38±0,03	2,23±0,05	2,53±0,20	2,31±0,10
9	Geraniol	0,04±0,00	0,05±0,00	0,03±0,08	0,03±0,00	0,03±0,00	0,06±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,01±0,00	0,08±0,01	0,10±0,01	0,07±0,00
10	Citronelato de metila	0,05±0,00	0,09±0,00	-	0,03±0,00	0,06±0,00	0,02±0,00	0,13±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,10±0,00	0,16±0,01	0,03±0,00
11	Geranial (α-citral)	3,48±0,14	3,45±0,16	3,97±0,11	3,46±0,03	3,07±0,15	3,42±0,10	3,48±0,26	3,92±0,04	3,46±0,06	3,26±0,06	3,88±0,29	3,68±0,00
12	Geraniato de metila	0,07±0,00	0,08±0,02	0,06±0,00	0,04±0,00	0,07±0,00	0,05±0,00	0,06±0,05	0,09±0,00	0,05±0,00	0,07±0,00	0,15±0,00	0,07±0,00
13	Acetato de nerila	0,01±0,00	0,03±0,01	0,06±0,00	-	0,10±0,00	0,02±0,00	0,05±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,04±0,00	0,02±0,00
14	Acetato de geranila	0,20±0,01	0,34±0,02	0,02±0,00	0,07±0,00	0,16±0,00	0,06±0,00	0,42±0,00	0,11±0,00	0,08±0,00	0,26±0,03	0,53±0,00	0,17±0,00
15	Óxido de cariofileno	0,22±0,00	0,27±0,01	0,01±0,01	0,20±0,01	0,23±0,01	0,08±0,00	0,26±0,02	0,01±0,00	0,25±0,01	0,20±0,00	0,59±0,02	0,07±0,00
	Citral (neral + geranial)	5,77	5,69	6,68	5,87	5,08	5,75	5,80	6,49	5,84	5,49	6,41	5,99
	Geranial/ neral	1,52	1,54	1,46	1,43	1,52	1,47	1,50	1,52	1,45	1,46	1,53	1,59
	Citral/ citronelal	3,80	4,62	4,28	3,06	3,13	4,29	3,84	6,12	3,79	2,97	3,68	4,99

DP: desvio padrão (n=3).

Figura 2 - Análise do componente principal (PCA) na correlação matricial construída usando dados de quatro compostos majoritários de *M. officinalis* em diferentes fontes e concentrações de elicitores. a) metil jasmonato; b) ácido salicílico, c) quitosana.



4 CONCLUSÃO

A aplicação foliar de MJ nas maiores concentrações favorece o teor e rendimento de óleo essencial e o teor de fenóis totais de *M. officinalis*. A concentração 2 mM de MJ é a que mais influencia na concentração de citronelal.

As maiores concentrações de AS afetam positivamente na matéria seca foliar, no teor e rendimento de óleo essencial, no teor de fenóis totais e na concentração dos constituintes geranial, neral e citronelal.

A QT nas maiores concentrações favorece o teor de fenóis totais e a concentração de geranial. A aplicação de 0 e 2 g L⁻¹ aumentam o teor de proteínas solúveis, o rendimento e teor de óleo essencial e o citronelal.

Assim, a aplicação de elicitores via foliar em *M. officinalis* favorecem a produção de metabolitos secundários e de matéria seca.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.1 ed (online). Illinois: Allured Publishing, p. 804, 2017.
- AHMAD, B., JALEEL, H., SHABBIR, A., KHAN, M.M.A., SADIQ, Y. Concomitant application of depolymerized chitosan and GA3 modulates photosynthesis, essential oil and menthol production in peppermint (*Mentha piperita* L.). **Scientia Horticulturae**, v.246, pp. 371-379, 2019.
- AHMED, K.B.M., KHAN, M.M.A., JAHAN, A., SIDDIQUI, H., UDDIN, M. Gamma rays induced acquisition of structural modification in chitosan boosts photosynthetic machinery, enzymatic activities and essential oil production in citronella grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **International Journal of Biological Macromolecules**, v.145, p.372-389, 2020.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARNES, J. D., BALAGUER, L., MANRIQUE, E., ELVIRA, S., & DAVISON, A. W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.32, n.2, p.85–100, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976.
- CADORIN, D. A. et al. Metil jasmonato e flexões caulinares na rustificação e crescimento inicial de mudas de *Cordia trichotoma*. **CERNE**, Lavras, v. 21, n. 4, p. 657-664, 2015.
- CAPPELLARI, L.R; SANTORO, M.V.; SCHMIDT, A.; GERSHENZON, J. and BANCHIO, E. Improving Phenolic Total Content and Monoterpene in *Mentha x piperita* by Using Salicylic Acid or Methyl Jasmonate Combined with Rhizobacteria Inoculation. **Int. J. Mol. Sci.** v.21, n.1, 2020.
- CHAVOUSHI, M.; NAJAFI, F.; SALIMI, A.; ANGAJI, S.A. Effect of salicylic acid and sodium nitroprusside on growth parameters, photosynthetic pigments and secondary metabolites of safflower under drought stress. **Scientia Horticulturae**, v.259, 2020.
- DESCHAMPS, C.; RASKIN, I. AND SIMON, J.E. Regulation of essential oil accumulation in basil (*Ocimum basilicum* L.) in response to elicitation. **Int. J. Plant Sci.**, v.169, n.8, p.981–986, 2008.
- DEUNER, Cristiane et al. Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. **Rev. de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 38, n. 3, p. 275-281, 2015.
- DOUSSEAU, Sara et al. Aplicação exógena de quitosana no sistema antioxidante de jaborandi. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.46, n.1, p. 191-197, 2016.

- FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039 - 1042. 2011.
- GORNI, P.H.; BROZULATO, M. DE O.; LOURENÇÃO, R. DA S.L.; KONRAD, E.C.G. Increased biomass and salicylic acid elicitor activity in fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 20, 2017.
- HIDANGMAYUM, A., DWIVEDI, P., KATIYAR, D., HEMANTARANJAN, A. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.25, n.2, p.313-326. 2019.
- HISCOX, J.D., AND ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Can. J. Bot.**, v.57, n.12, p.1332–1334, 1979.
- KITTLER, J.; KRÜGER, H.; ULRICH, D.; ZEIGER, B.; SCHÜTZE, W.; BÖTTCHER, C.; KRÄHMER, A.; GUDI, G.; KÄSTNER, U.; HEUBERGER, H., MARTHE, F. Content and composition of essential oil and content of rosmarinic acid in lemon balm and balm genotypes (*Melissa officinalis*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.65, n.5, p.1517-1527, 2018.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J.; FRANCISCO, J. M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 2008.
- MAIVAN, E. S.; RADJABIAN, T.; ABRISHAMCHI, P.; TALEI, D. Physiological and biochemical responses of *Melissa officinalis* L. to nickel stress and the protective role of Salicylic Acid. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.63, n.3, p.330-343, 2017.
- MIRAJ, S.; AZIZI, N.; KIANI, S. A review of chemical components and pharmacological effects of *Melissa officinalis* L. **Scholars Research Library. der Pharmacia Lettre**, v.8, n.6, p.229-237, 2016.
- MUKHTAR AHMED, K.B., KHAN, M.M.A., SIDDIQUI, H., JAHAN, A. Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production- a review. **Carbohydrate Polymers**, 227, n.115331, 2020.
- NHU-TRANG TT1, CASABIANCA H, GRENIER-LOUSTALOT MF. Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis. **Anal Bioanal Chem**. v. 38, n.7, p.2141-52, 2006.
- OKAMOTO, T.; TAKAHASHI, T. Ethylene signaling plays a pivotal role in mechanical-stress-induced root-growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling and Behavior**, v.14, n.11, 2019.
- PIRBALOUTI, A.G.; NEKOEI, M.; RAHIMMALEK, M.; MALEKPOOR, F. Chemical composition and yield of essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under foliar applications of jasmonic and salicylic acids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.19, 2019.
- RABÊLO, V.M.; MAGALHÃES, P.C.; BRESSANIN, L.A.; CARVALHO, D. T.; REIS, C. O. DOS; KARAM, D.; DORIGUETO, A.C.; SANTOS, M. H.; SANTOS FILHO, P.R.S.; SOUZA, T.C. The foliar application of a mixture of semisynthetic chitosan derivatives

induces tolerance to water deficit in maize, improving the antioxidant system and increasing photosynthesis and grain yield. **Scientific Reports**, v.9, n.1, 2019.

SAFARI, F.; AKRAMIAN, M.; SALEHI-ARJMAND, H.; KHADIVI, A. Physiological and molecular mechanisms underlying salicylic acid-mitigated mercury toxicity in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.183, 2019.

SANTOS, R. P., DA CRUZ, A. C. F., IAREMA, L., KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Ceres**, v. 55, n. 4, 2008.

SILVA, B.M.P.DA.; BINOTI, R.M.; CIA, P.; VALENTINI, S.R. DE T.; BRON, I.U. Efeito do metil jasmonato no amadurecimento e no controle da antracnose em goiaba 'Kumagai'. **Bragantia**, Campinas, v. 76, n. 1, p.167-176, 2017.

SINGLETON, V.L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**. v.299, p.152 -178, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.** [online], v.15, n.1, p.71-81, 2002.

ŚWIDER, K., STARTEK, K., WIJAYA, C.H. The therapeutic properties of Lemon balm (*Melissa officinalis* L.): Reviewing novel findings and medical indications. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.92, p.327-335, 2019.

TAHERI, Z., VATANKHAH, E., JAFARIAN, V. Methyl jasmonate improves physiological and biochemical responses of *Anchusa italica* under salinity stress. **South African Journal of Botany**. v.130, p. 375-382, 2020.

TALEBI, M.; MOGHADDAM, M.; PIRBALOUTI, A. G. Methyl jasmonate effects on volatile oil compounds and antioxidant activity of leaf extract of two basil cultivars under salinity stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.40, n.34, 2018.

VANDA, G.F.; SHABANI, L.; RAZAVIZADEH, R. Chitosan enhances rosmarinic acid production in shoot cultures of *Melissa officinalis* L. through the induction of Methyl Jasmonate. **Bot Stud**. v.60, n.26, 2019.

VASISHT, K.; SHARMA, N.; KARAN, M. Current Perspective in the International Trade of Medicinal Plants Material: An Update. **Current Pharmaceutical Design**, v.22, n.27, p. 4288-4336, 2016.

WASSIE, M., ZHANG, W., ZHANG, Q., JI, K. CAO, L., CHEN, L. Exogenous salicylic acid ameliorates heat stress-induced damages and improves growth and photosynthetic efficiency in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.191, n.110206, 2020.

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