



**HELENA BOTELHO DE ANDRADE**

**MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DE  
CONSTITUINTES VOLÁTEIS *IN VITRO* DE  
*Hyptis suaveolens* (L.) POIT**

**LAVRAS - MG**

**2013**

**HELENA BOTELHO DE ANDRADE**

**MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DE CONSTITUINTES  
VOLÁTEIS *IN VITRO* DE *Hyptis suaveolens* (L.) POIT**

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

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Orientadora

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Coorientador

**LAVRAS-MG**

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

Andrade, Helena Botelho de.

Micropropagação e análise de constituintes voláteis *in vitro* de  
*Hyptis suaveolens* (L.) Poit. / Helena Botelho de Andrade. – Lavras :  
UFLA, 2013.

145 p. : il.

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

Orientador: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Bibliografia.

1. *Hyptis suaveolens* - Fração volátil. 2. Propagação *in vitro*. 3.  
Plantas medicinais. 4. Óleos essenciais. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 633.883870416

**HELENA BOTELHO DE ANDRADE**

**MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS  
*IN VITRO* DE *Hyptis suaveolens* (L.) POIT**

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

APROVADA em 12 de setembro de 2013.

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto	UFLA
Dra. Ana Hortência Fonseca Castro	UFSJ
Dra. Elisangela Elena Nunes Carvalho	UFLA

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2013**

A minha família e amigos,  
DEDICO

## AGRADECIMENTOS

No final desta grande etapa, olho agora para trás e me sinto feliz por ter tantas pessoas maravilhosas presentes, que me ajudaram a enfrentar as dificuldades e a seguir até o fim. Sou muito grata a esses seres que preenchem a minha vida, e ao criador por ter me dado o presente mais precioso.

Obrigada! Ao meu pai, Luiz, com seu coração enorme e a minha mãe, Elza, por toda garra e exemplo que passa. Obrigada por me ajudarem a conquistar os meus sonhos; aos meus queridos irmãos Rodrigo e André por todo amor. Amo vocês! Ao meu avô, Mário, que tanto me inspira e a minha querida avó, Helena (Terezinha); a minha amada e linda madrinha, Beth, e as demais tias; e aos primos e primas que tanto amo.

A Liliana e ao Sérgio por fazerem os meus pais felizes.

As minhas queridas amigas por toda sincera amizade e o companheirismo, tanto nas horas alegres quanto nas difíceis. Izabela, Paula, Geninha, Ana Paula, Olivia, Tati, Thaiana, Lívia Lailah e Vivi. Em especial a Izabela, pela ajuda com toda a estatística do trabalho. “A amizade, tal como é no fundo e em sua singeleza, equivale ao afeto que, nascendo no coração dos seres humanos, emancipa-se de toda mesquinhez e interesse, enaltecendo e enobrecendo o pensamento e o sentimento dos homens.” Sabedoria Logosófica.

Aos amigos queridos: Xande, Kauã, Gustavo e Simony, obrigada pelo apoio.

Aos amigos da Fundação Logosófica. É muito bom estudar com vocês e aprender um novo significado de vida.

À família do NEMAC. Vocês foram ótimos de conviver, sentirei saudades! Ana Luiza, Sâmia, Andreísa Fabri, Gysele, Joyce, Ivan, Mariane, Thainá, Alexandre, Aurislaine e em especial a Andreísa Flores. Andreísa Flores,

as nossas muitas horas de trabalho agora estão concretizadas nesta linda dissertação.

Aos técnicos Luiz e Evaldo.

À Carol, pelos ensinamentos com cultura de tecidos.

Aos orientadores Suzan e José Eduardo, por todos os ensinamentos e paciência.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Agora é uma nova etapa e um novo ciclo se desenrola. O que está por vir?

## RESUMO GERAL

*Hyptis suaveolens* é uma planta medicinal, cujo óleo essencial possui atividades antimicrobiana e tóxica para insetos. Objetivou-se avaliar condições para o cultivo e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *H. suaveolens*. Na primeira etapa avaliou-se: 1) MS; MS/2 e MS/4 em fatorial com quatro concentrações de sacarose: 7,5; 15; 30 e 40 g.L<sup>-1</sup> na germinação de sementes *in vitro*; 2) MS/2 e MS/4 em combinação com 20; 25; 30; 35; 40 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose no estabelecimento de segmentos apicais e nodais; 3) a orientação do explante (horizontal ou vertical); 4) 2MS, MS, MS/2 e MS/4 no crescimento *in vitro*; 5) porcentagem de pegamento na aclimatização das mudas em casa de vegetação. A germinação de sementes em MS e MS/2, com 15 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente, apresentaram melhor desenvolvimento de plântulas. No entanto, as concentrações de 7,5 e 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose tiveram o mais rápido tempo médio de germinação (6 e 7 a 8 dias respectivamente). Os meios MS/2 e MS/4, ambos com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, foram os melhores meios para o estabelecimento de segmentos apicais e nodais, respectivamente. Para crescimento *in vitro*, o MS/2 proporcionou conjuntamente maior biomassa seca de folhas e de raízes de plântulas, e as análises por HS-CG-EM detectaram mais compostos voláteis para MS/4 e MS/2. A orientação horizontal do explante proporcionou melhores resultados. Houve 90% da porcentagem de pegamento na aclimatização de plântulas com Tropstrato HA<sup>®</sup>. Na segunda etapa avaliou-se: 1) TDZ e BAP, com 0; 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup> em interação com 0; 0,5 e 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA; e 0; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP em interação com 0 e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de AIA; 2) densidades de fluxo de fótons (13; 28; 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ); 3) qualidades espectrais de luz [LED: azul, vermelha, amarela, branca, verde, azul:vermelha (4:10), azul:vermelha (10:4) e azul:vermelha (7:7); e luz fluorescente com intensidade de 47  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ]; 4) a influência de diferentes ambientes na produção de constituintes voláteis (plântulas originadas de sementes cultivadas *in vitro* por 70 dias em MS com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, plântulas originadas de segmentos vindos da casa de vegetação cultivadas *in vitro* em MS/4 com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose por 60 dias, plantas com 90 dias cultivadas em areia com fertirrigação em casa de vegetação e plantas cultivadas em canteiros com terra). Observou-se um efeito negativo das citocininas e auxinas na formação de novos brotos. Plântulas cultivadas em 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  tiveram maior crescimento *in vitro*, mas a maior intensidade de luz inibiu a síntese de alguns compostos voláteis. A luz fluorescente causou maior inibição na produção de constituintes voláteis e no crescimento vegetativo. LEDs azul, vermelha, branca ou combinações de vermelha com azul incrementaram variáveis de crescimento. A produção de constituintes voláteis é altamente influenciada pelo tipo de ambiente de cultivo e de material propagativo.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*. Fração volátil. Planta medicinal.



## ABSTRACT

The *Hyptis suaveolens* is a medicinal plant, its essential oil has anti-microbial activities and toxic to insects. This study aimed to assess conditions for the cultivation and production of volatile constituents *in vitro* *H. suaveolens*. In the first step were evaluated: 1) MS, MS/2 and MS/4 in factorial with four sucrose concentrations: 7.5; 15; 30 and 40 g.L<sup>-1</sup> of seed germination *in vitro*; 2) MS/2 and MS/4 in combination with 20; 25; 30; 35; 40 and 45 g.L<sup>-1</sup> of sucrose in the establishment of the apical and nodal segments; 3) the explant orientation (horizontal or vertical); 4) 2MS, MS, MS/2 and MS/4 in the growth *in vitro*; 5) percentage of fixation in the acclimatization of seedlings in the greenhouse. Seed germination in MS and MS/2, with 15 and 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose respectively showed better seedling development. However, the concentrations of 7.5 and 15 g.L<sup>-1</sup> of sucrose had fast average time of germination (6 and 7 to 8 days respectively). The means MS/2 and MS/4, both with 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose were the best means for establishing the apical and nodal segments, respectively. For the growth *in vitro*, the MS/2 provided jointly higher dry biomass of the leaves and roots seedlings and analysis by HS-GC-MS detected more volatile compounds for MS/4 and MS/2. The explant horizontal orientation provided better results. There was 90% percentage of fixation on acclimatization of seedlings with Tropstrato HA<sup>®</sup>. In the second stage were evaluated: 1) TDZ and BAP, with 0; 1 and 2 mg.L<sup>-1</sup> in interaction with 0; 0.5 and 1 mg.L<sup>-1</sup> of NAA and 0; 0.05; 0.1; 0.2 and 0.4 mg.L<sup>-1</sup> of BAP in interaction with 0 and 0.25 mg.L<sup>-1</sup> of IAA; 2) photon flux densities (13; 28; 47 and 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ); 3) spectral qualities of light [LED: blue, red, yellow, white, green, blue:red (4:10), blue:red(10:4) and blue:red(7:7); and fluorescent light with intensity of 47  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ]; 4) the influence of different environments on the production of volatile constituents (seedlings originated from seeds grown *in vitro* for 70 days in MS with 15 g.L<sup>-1</sup> of sucrose, seedlings originated from segments coming from greenhouse grown *in vitro* in MS/4 with 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose for 60 days, with 90 days grown in sand with fertigation in greenhouse and plants grown in raised beds with soil). There was a negative effect of cytokinin and auxin in the formation of new shoots. Seedlings grown at 47 and 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  had a higher growth *in vitro*, but the higher intensity of light inhibited the synthesis of some volatile compounds. The fluorescent light caused greater inhibition in the production of volatile constituents and vegetative growth. LEDs blue, red, white or combinations of red with blue increment growth variables. The production of volatile constituents is highly influenced by the type of growing environment and propagation material.

Keywords: Propagation *in vitro*. Volatile fraction. Medicinal plant.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Plantas de *H. suaveolens* cultivadas em casa de vegetação empregando sistema de fertirrigação: **a)** visão geral do canteiro de fertirrigação; **b)** planta *H. suaveolens* fertirrigada; **c)** detalhe do habito da planta. UFLA, Lavras, 2013.....20
- Figura 2 Estruturas químicas dos principais constituintes químicos do óleo essencial de *H. suaveolens*, conforme descrito na Tabela 1. ....26
- Figura 3 Plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro* originadas de segmentos apicais de casa de vegetação, aos 30 dias. **a)** MS/2 com 20, 25 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; **b)** MS/2 com 35, 40 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; **c)** MS/4 com 20, 25 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; **d)** MS/4 com 35, 40 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. UFLA, Lavras, 2013.....58
- Figura 4 Plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro* originadas de segmentos nodais de casa de vegetação, aos 30 dias. **a)** MS/2 com 20, 25 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; **b)** MS/2 com 35, 40 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; **c)** MS/4 com 20, 25 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; **d)** MS/4 com 35, 40 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. UFLA, Lavras, 2013..... 60
- Figura 5 Influência da orientação vertical e horizontal dos explantes no crescimento de plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro*. UFLA, Lavras, 2013.....62
- Figura 6 Influência de sais do meio MS no crescimento de plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro*. **a)** Dobro de sais (2 MS); **b):** MS; **c):** 50 % do MS (MS/2) e **d)** 25 % do MS (MS/4). UFLA, Lavras, 2013.....66
- Figura 7 Aclimatização de plântulas originadas de cultura de tecidos de *Hyptis suaveolens*. **a)** Plântulas com 45 dias *in vitro*; **b)** Plantas com 30 dias de aclimatização em casa de vegetação; **c)** Plantas após 90 dias de aclimatização em casa de vegetação. UFLA, Lavras, 2013.....73

Figura 8 Espectro da luz fluorescente utilizada nas condições de qualidade de luz na regeneração de segmentos nodais de <i>H. suaveolens</i> . UFLA, Lavras, 2013.....	89
Figura 9 Espectros das diferentes LEDs ( <i>Light Emitting Diode</i> ) utilizadas nas condições de qualidade de luz na regeneração de segmentos nodais de <i>H. suaveolens</i> . UFLA, Lavras, 2013 .....	90
Figura 10 Influência da interação dos reguladores de crescimento (BAP, TDZ e ANA) nos segmentos de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> . <b>a)</b> Interação de BAP e ANA em segmentos nodais; <b>b)</b> Interação de TDZ e ANA em segmentos nodais; <b>c)</b> Interação de BAP e ANA em segmentos apicais e <b>d)</b> Interação de TDZ e ANA em segmentos apicais. UFLA, Lavras, 2013.....	102
Figura 11 Efeito da interação de reguladores de crescimento (BAPxANA) no crescimento de segmento nodal de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> . UFLA, Lavras, 2013 .....	103
Figura 12 Influência da densidade de fluxo de fótons ( $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) em plântulas de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> oriundas de segmentos apicais e nodais. UFLA, Lavras, 2013 .....	106
Figura 13 Influência do espectro de luz no crescimento de segmento nodal de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> (V/A = proporção vermelho/azul). UFLA, Lavras, 2013 .....	119

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variação na composição química do óleo essencial de <i>H. suaveolens</i> determinado por literaturas anteriores.....	25
Tabela 2	Porcentagem de sobrevivência de plântulas (%S), porcentagem de germinação (%G) e tempo médio de germinação (Tm-dias) de sementes de <i>Hyptis suaveolens</i> com 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> , oriundas de sementes, em função de diferentes concentrações de sacarose e sais do meio MS. UFLA, Lavras, 2013 .....	52
Tabela 3	Biomassa seca de brotações (BSB–mg), biomassa seca de raízes (BSR–mg), biomassa seca total (BST–mg) de plântulas de <i>Hyptis suaveolens</i> com 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> , oriundas de sementes, em função de diferentes concentrações de sacarose (S) e sais do meio MS. UFLA, Lavras, 2013 .....	54
Tabela 4	Biomassa seca de brotos (BSB mg) e biomassa seca total (BST-mg) de plântulas de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> com 30 dias de cultivo oriundas de segmentos apicais, em função de concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras, 2013.....	56
Tabela 5	Biomassa seca de brotos (BSB mg), biomassa seca de raízes (BSR-mg) e biomassa seca total (BST-mg) de plântulas de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> com 30 dias de cultivo oriundas de segmentos nodais, em função de concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras, 2013 .....	59
Tabela 6	Número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB-cm), biomassa seca de brotos (BSB-mg), biomassa seca de raiz (BSR-mg) e biomassa seca total (BST-mg) em brotações de <i>Hyptis suaveolens</i> com 30 dias de cultivo, em função de diferentes orientações. UFLA, Lavras, 2013.....	62

Tabela 7 Número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB-cm), número de folhas (NF), biomassa seca de folhas (BSF-mg), biomassa seca de caules (BSC-mg), biomassa seca de raiz (BSR-mg) e biomassa seca total (BST-mg) em brotações de <i>Hyptis suaveolens</i> com 30 dias de cultivo, em função de diferentes meios. UFLA, Lavras, 2013 .....	64
Tabela 8 Constituição química volátil de plântulas de <i>H. suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes sais do meio MS. UFLA, Lavras, 2013.....	67
Tabela 9 Porcentagem de calos (%C), porcentagem de brotos (%B), número de brotos (NB), biomassa seca de brotos (BSB-mg), biomassa seca de calos (BSC-mg) de plântulas de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> com 30 dias de cultivo, em função de concentrações de BAP e ANA. UFLA, Lavras, 2013 .....	95
Tabela 10 Porcentagem de calos (%C), porcentagem de brotos (%B), número de brotos (NB), biomassa seca de brotos (BSB-mg), biomassa seca de calos (BSC-mg) de plântulas de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> com 30 dias de cultivo, em função de concentrações de TDZ e ANA. UFLA, Lavras, 2013 .....	98
Tabela 11 Porcentagem de calos (%C), porcentagem de brotos (%B), número de brotos (NB), biomassa seca de brotos (BSB-mg), biomassa seca de calos (BSC-mg) de plântulas de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> com 30 dias de cultivo, em função de concentrações de BAP e AIA. UFLA, Lavras, 2013 .....	100
Tabela 12 Número de brotos (NB), comprimento do broto principal (CBP-cm), biomassa seca do caule (BSC-mg), biomassa seca de folhas (BSF-mg), biomassa seca de raízes (BSR-mg), biomassa seca total (BST-mg), e porcentagem de sobrevivência (%S) de plântulas de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> , com 30 dias de cultivo, em função da densidade do fluxo de fótons (D). UFLA, Lavras, 2013 .....	105

Tabela 13	Constituição química da fração volátil de plântulas de <i>H. suaveolens</i> (C) originadas de segmentos apicais cultivados <i>in vitro</i> em diferentes densidades de fluxo de fótons (D). UFLA, Lavras, 2013.....	110
Tabela 14	Constituição química da fração volátil de plântulas de <i>H. suaveolens</i> (C) originadas de segmentos nodais cultivados <i>in vitro</i> em diferentes densidades de fluxo de fótons (D). UFLA, Lavras, 2013.....	112
Tabela 15	Número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB-cm), número de folhas (NF), biomassa seca de folhas (BSF-mg), biomassa seca de calos (BSC-mg), biomassa seca de raízes (BSR-mg) e biomassa seca total (mg) de plântulas de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> com 35 dias de cultivo, em função de qualidades de luz (A: azul, B: vermelha, C: amarela, D: branca, E: verde, F: fluorescente, G: vermelha: azul 7:7, H: vermelha:azul4:10 e I: vermelha:azul 10:4). UFLA, Lavras, 2013.....	120
Tabela 16	Constituição química da fração volátil analisada por HS-CG/MS de folhas de plântulas de <i>H. suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes qualidades de luz. A: azul, B: vermelha, C: amarela, D: branca, E: verde, F: fluorescente, G: vermelha: azul 7:7, H: vermelha:azul4:10 e I: vermelha:azul 10:4. UFLA, Lavras, 2013.....	123
Tabela 17	Constituição química da fração volátil de <i>Hyptis suaveolens</i> em diferentes ambientes ( <b>Fertirrigação</b> : plantas cultivadas em casa de vegetação sob o sistema de fertirrigação; <b>Horto</b> : canteiro a pleno sol no Horto de plantas medicinais da UFLA; <b>G in vitro</b> : plântulas oriundas de segmentos nodais de casa de vegetação inoculadas <i>in vitro</i> em meio MS/4 e 30 g/L de sacarose; e, <b>S in vitro</b> : plântulas oriundas de sementes inoculadas <i>in vitro</i> em meio MS e 15 g/L de sacarose). UFLA, Lavras, 2013.....	130

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Porcentagem relativa (%) dos constituintes com maior teor na fração volátil de *Hyptis suaveolens* cultivada sob diferentes concentrações de sais do meio MS. UFLA, Lavras, 2013 ..... 71
- Gráfico 2 Porcentagem relativa (%) dos constituintes com maior teor na fração volátil de *Hyptis suaveolens*, originadas de segmentos apicais cultivados *in vitro*, sob diferentes densidades de fluxo de fótons (13; 28; 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). UFLA, Lavras, 2013 ..... 115
- Gráfico 3 Porcentagem relativa (%) dos constituintes com maior teor na fração volátil de *Hyptis suaveolens*, originadas de segmentos nodais cultivados *in vitro*, sob diferentes densidades de fluxo de fótons (13; 28; 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). UFLA, Lavras, 2013 ..... 116
- Gráfico 4 Porcentagem relativa (%) dos constituintes da classe de monoterpenos com maior teor na fração volátil de *Hyptis suaveolens*, sob diferentes qualidades de luz. UFLA, Lavras, 2013..... 127
- Gráfico 5 Porcentagem relativa (%) dos constituintes da classe de sesquiterpenos com maior teor na fração volátil de *Hyptis suaveolens*, sob diferentes qualidades de luz. UFLA, Lavras, 2013..... 128
- Gráfico 6 Porcentagem relativa (%) dos constituintes com maior teor na fração volátil de *Hyptis suaveolens*, sob diferentes condições de cultivo (Fertirrigação, Horto, G *in vitro*: plântulas oriundas de segmentos nodais de casa de vegetação inoculadas *in vitro* em meio MS/4 e 30 g/L de sacarose; e, S *in vitro*: plântulas oriundas de sementes inoculadas *in vitro* em meio MS e 15 g/L de sacarose). UFLA, Lavras, 2013 ..... 134

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
2.1	Aspectos botânicos de <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit .....	20
2.2	Características Agronômicas .....	22
2.3	Composição química volátil de <i>Hyptis suaveolens</i> .....	23
2.4	Propriedades biológicas de <i>Hyptis suaveolens</i> .....	28
2.5	Cultura de tecidos vegetais.....	31
	REFERÊNCIAS.....	35
	ARTIGO 1.....	40
	ESTABELECIMENTO DE PROPÁGULOS E ANÁLISE DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) POIT IN VITRO.....	40
1	INTRODUÇÃO.....	42
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	45
2.1	Efeito das concentrações de sais e sacarose em meio de cultura MS na germinação de sementes de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i> .....	46
2.2	Efeito das concentrações de sais e sacarose em meio de cultura MS para o estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais e apicais de <i>Hyptis suaveolens</i> .....	47
2.3	Orientação de inoculação do segmento nodal no crescimento <i>in vitro</i> de <i>H. suaveolens</i> .....	48
2.4	Efeitos das concentrações de sais no meio de cultura MS no crescimento <i>in vitro</i> de <i>H. suaveolens</i> .....	48
2.5	Aclimatização .....	49
2.6	Análise estatística.....	49
2.7	Análise química da fração volátil por HS-CG/EM.....	49



<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>3.1</b>	<b>Efeito das concentrações de sais e sacarose em meio de cultura MS na germinação de sementes de <i>Hyptis suaveolens in vitro</i></b> .....	52
<b>3.2</b>	<b>Efeito das concentrações de sais e sacarose em meio de cultura MS para o estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais e apicais de <i>Hyptis suaveolens</i></b> .....	55
<b>3.3</b>	<b>Orientação de inoculação do segmento nodal no crescimento <i>in vitro</i> de <i>H. suaveolens</i></b> .....	61
<b>3.4</b>	<b>Efeitos das concentrações de sais no meio de cultura MS no crescimento e análise da fração volátil <i>in vitro</i> de <i>H. suaveolens</i></b> .....	63
<b>3.4.1</b>	<b>Crescimento <i>in vitro</i></b> .....	63
<b>3.4.2</b>	<b>Análise da fração volátil</b> .....	66
<b>3.5</b>	<b>Aclimatização</b> .....	73
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	74
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75
	<b>ARTIGO 2</b> .....	81
	<b>CRESCIMENTO VEGETATIVO E ANÁLISE DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS <i>IN VITRO</i> DE <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) POIT. : INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO, LUZ E DE DIFERENTES AMBIENTES</b> .....	81
	<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	84
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	86
<b>2.1</b>	<b>Efeito de citocinina e auxina no cultivo <i>in vitro</i> de <i>H. suaveolens</i></b> .....	87
<b>2.2</b>	<b>Avaliação das densidades de fluxo de fótons na regeneração de segmentos de <i>H. suaveolens</i></b> .....	88
<b>2.3</b>	<b>Avaliação das condições de qualidade de luz na regeneração de segmentos nodais de <i>H. suaveolens</i></b> .....	89

2.4	<b>Análise de constituintes voláteis de <i>H. suaveolens</i> em diferentes condições de cultivo</b> .....	91
2.5	<b>Análises estatísticas</b> .....	91
2.6	<b>Análise da fração volátil por HS-CG/EM</b> .....	92
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	94
3.1	<b>Efeito de citocinina e auxina no cultivo <i>in vitro</i> de <i>H. suaveolens</i></b> ...	94
3.2	<b>Avaliação das densidades de fluxo de fótons na regeneração de segmentos de <i>H. suaveolens</i></b> .....	104
3.2.1	<b>Regeneração <i>in vitro</i></b> .....	104
3.2.2	<b>Análise da fração volátil</b> .....	109
3.3	<b>Avaliação das condições de qualidade de luz na regeneração de segmentos nodais de <i>H. suaveolens</i></b> .....	118
3.3.1	<b>Regeneração de segmentos nodais <i>in vitro</i></b> .....	118
3.2.2	<b>Análise da fração volátil</b> .....	122
3.3	<b>Análise de constituintes voláteis de <i>H. suaveolens</i> em diferentes condições de cultivo</b> .....	129
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	136
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	137
	<b>ANEXOS</b> .....	144

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde os primórdios da humanidade as plantas medicinais são utilizadas por seres humanos para tratar doenças. Plantas superiores são as principais fontes de metabólitos secundários que são usados em produtos farmacêuticos, agroquímicos, alimentícios e perfumes. A busca por novos produtos químicos derivados de plantas com aplicações úteis é importante, desde que seja pautada no uso racional e sustentável da biodiversidade (KARUPPUSAMY, 2009).

Técnicas de cultura de tecidos de plantas têm sido cada vez mais aplicadas às plantas medicinais, em particular para a propagação em massa, conservação de germoplasma, estudos de metabólitos secundários e para o melhoramento genético (NALAWADE; TSAY, 2005). Especialmente, a micropropagação de plantas medicinais tem sido difundida devido à possibilidade de produzir um grande número de plantas homogêneas e com elevada qualidade sanitária, além da possibilidade de conservação das espécies em bancos de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade (NICOLOSO; MALDANER; FLORES, 2006).

*Hyptis suaveolens* (L) Poit (*Lamiaceae*) é um arbusto utilizado, popularmente no Brasil, para o tratamento de dores, infecções e gripes (SANTOS et al., 2007). Além disso, diversos trabalhos têm evidenciado o potencial fungitóxico do óleo essencial dessa espécie (GHAFARI; GHASSAM; PRAKASH, 2012; SHARMA; VERMA, 2004; TRIPATI, SHARMA; SHARMA, 2009).

A propagação de *H. suaveolens* é realizada principalmente por sementes, o que ocasiona alta variabilidade genética, afetando a composição química do óleo essencial e, possivelmente sua atividade biológica (AZEVEDO et al., 2001; MARTINS; SANTOS; POLO, 2006). Estudos realizados por Oliveira et al.

(2005) demonstraram um elevado grau de variabilidade no teor e composição química de óleos essenciais de *H. suaveolens* conforme a origem geográfica.

A propagação *in vitro* é uma abordagem alternativa para os métodos tradicionais de propagação, pois permite a produção de plantas homogêneas com menor variação quantitativa e qualitativa de substâncias ativas, o que possibilita um aumento na qualidade das drogas vegetais obtidas a partir delas (NALAWADE; TSAY, 2005).

Como a resposta morfogenética é fortemente influenciada pelo genótipo, é fundamental que seja realizado o estabelecimento de um protocolo adequado a cada espécie.

Portanto, objetivou-se avaliar diversas condições para a propagação e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *H. suaveolens*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos botânicos de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit

O gênero *Hyptis*, pertencente à família *Lamiaceae*, possui cerca de 400 espécies de plantas (MISHRA et al., 2011). É bastante distribuída no Cerrado brasileiro e apresenta grande diversidade morfológica (AZEVEDO et al., 2002; SOUZA et al., 2002).

A espécie *Hyptis suaveolens* (Figura 1) tem como centro de origem a Índia, mas é também distribuída nas regiões tropicais, não sendo comumente encontrada nas regiões subtropicais e nem acima de 500 m de altitude (MISHRA et al., 2011).



Figura 1 Plantas de *H. suaveolens* cultivadas em casa de vegetação empregando sistema de fertirrigação: **a)** visão geral do canteiro de fertirrigação; **b)** planta *H. suaveolens* fertirrigada; **c)** detalhe do habito da planta. UFLA, Lavras, 2013

Conhecida no sul e no sudeste do Brasil como erva-canudo, no nordeste, como bamburral. No México é cohecida como *chía* de colima, *chía* gorda, *chía* grande, conibare e *goyohuali* (MARTINS; SANTOS; POLO, 2006).

Caracterizada como uma erva ereta anual, geralmente 1 m de altura, mas dependendo do ambiente pode chegar até 3 m (LORENZI; MATOS, 2002; SHARMA; RAGHUBANSHI, 2009). Seus caules são ramificados, semilenhosos, sendo tetragonal e pubescente, com tricomas glandulares entremeados. As suas folhas são simples, opostas, penínérveas, em ambas as faces pubescentes, entremeadas com tricomas glandulares. Suas nervuras são proeminentes na face abaxial, a margem foliar é serreada, possui ápice agudo, base cordiforme, lâmina ovada e são muito aromáticas; exala um cheiro mentolado característico quando esmagadas. As suas flores são bem pequenas, sésseis, e são protegidas por brácteas filiformes, de cor azulada, que se reúnem em pequenos grupos nas axilas foliares do ápice dos ramos. O seu florescimento se dá normalmente nos meses de dezembro a abril (CHUKWUJEKWU et al., 2005; LORENZI; MATOS, 2002). É uma espécie, preferencialmente alógama, porém apresenta autopolinização como estratégia de adaptação às condições inóspitas à troca de material genético (MARTINS; SANTOS; POLO, 2006).

Suas sementes são polimórficas, caracterizando-se em sementes leves ou pesadas. As sementes leves dispersam melhor ao vento e, por isso, a propagação e a colonização de novos ambientes é facilitada. No entanto, aquelas sementes maiores apesar de serem menos dispersíveis, provavelmente formam um banco de sementes persistente, devido à maior disponibilidade de reservas, com isso podem ter um importante impacto no estabelecimento da plântula, melhorar a competitividade da muda e, normalmente, têm uma menor probabilidade de mortalidade. Com isso, as mudas se tornam mais saudáveis, tolerantes a seca, a baixa disponibilidade de nutrientes e ao desfolhamento (SHARMA; RAGHUBANSHI, 2009).

Estudos filogenéticos realizados por Pastore et al. (2011), reclassificaram *Hyptis suaveolens* que foi transferida para o gênero *Mesosphaerum*. Portanto, atualmente o nome correto da referida espécie é *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze. O nome antigo foi mantido no título da presente dissertação, pois as informações da reclassificação dessa espécie foram recebidas após as assinaturas das atas de defesa do presente trabalho.

## 2.2 Características Agronômicas

*Hyptis suaveolens* é considerada como erva daninha em todo mundo, sendo invasora, principalmente, de lavouras de milho e de pastagens, é também uma das mais sérias invasoras das florestas secas caducifólias da Índia (CHUKWUJEKWU et al., 2005; SHARMA; RAIZADA; RAGHUBANSHI, 2009).

Ela é encontrada em uma variedade de *habitats*, como trilhos, estradas, montes de florestas abertas e clareiras florestais e pode infestar fortemente terras, particularmente, em substratos áridos e rochosos (CHUKWUJEKWU et al., 2005). Segundo Sharma, Raizada e Raghubanshi (2009), *H. suaveoles* tem preferência por solos alcalinos, arenosos e áreas rochosas.

Segundo Sharma e Raghubanshi (2009), a plasticidade de crescimento e as características reprodutivas em diferentes *habitats*, são algumas estratégias que poderiam fazer *H. suaveolens* como uma espécie invasora bem-sucedida.

A presença de outras espécies nos *habitats* e as características do solo também pode trazer uma resposta plástica, influenciando o desempenho de crescimento de *H. suaveolens*, através da competição e outros efeitos indiretos, além de habitats variáveis. De acordo com Sharma e Raghubanshi (2009) é necessária uma investigação mais aprofundada através da experimentação *in situ* para que se saiba características importantes para um bom manejo da espécie.

### 2.3 Composição química volátil de *Hyptis suaveolens*

Os óleos essenciais são metabólitos secundários com composição volátil, produzidos por plantas. Acredita-se que o metabolismo secundário é gerado por rotas ativadas em alguma situação específica de crescimento ou desenvolvimento, ou em alguma situação de *stress* como o ataque de herbívoros e limitações nutricionais, por exemplo, (SIMÕES; SPTIZER, 1999); atuando como um sistema de defesa da planta. Já o metabolismo primário está envolvido com as rotas essenciais da vida do vegetal.

A constituição dessas substâncias químicas voláteis, presentes nos óleos essenciais é complexa; sendo formada de classes de ésteres de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, fenilpropanonas, alcoóis, aldeídos e, em alguns casos, por hidrocarbonetos alifáticos, entre outros (SILVA et al., 2003).

Um óleo essencial é definido, internacionalmente, como o produto obtido por hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação seca, ou por um processo mecânico adequado sem aquecimento (ex. Cítricos) de uma planta ou de algumas de suas partes (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008). O óleo essencial, portanto, está no âmbito mais geral da fração volátil de uma matriz vegetal, sendo que essa envolve uma série de outras abordagens de amostragens e técnicas, como *headspace*, aromas, fragrâncias, e extratos obtidos por meio de técnicas específicas (RUBIOLO et al., 2010).

O conceito 'fração volátil' portanto, define uma mistura de compostos voláteis de uma matriz de origem vegetal que pode ser amostrado por causa da sua capacidade de vaporização espontânea ou sob condições adequadas; e frequentemente em artigos esses conceitos (óleo essencial e composições por *headspace*) não são distinguidos ou são comparados diretamente, de forma errônea (RUBIOLO et al., 2010).



O óleo essencial das folhas de *H. suaveolens*, objeto de diversos estudos, é constituído, principalmente, por mono-, sesqui- e diterpenos e apresenta uma grande diversidade química (SYAMASUNDAR et al., 2012). Sendo sintetizado e armazenado em tricomas glandulares (SILVA et al., 2003).

Diversos estudos têm mostrado que o óleo essencial de *H. suaveolens* apresenta uma grande diversidade química (AZEVEDO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2001; CONTI et al., 2011; MOREIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2005; SYAMASUNDAR et al., 2012; ZOGHBI et al., 2008). Os principais constituintes químicos, relatados em algumas literaturas, e seus respectivos teores estão sumarizados na Tabela 1, e suas estruturas químicas na Figura 2.

Tabela 1 Variação na composição química do óleo essencial de *H. suaveolens* determinado por literaturas anteriores

n <sup>o*</sup>	Compostos	Area (%)								
		A <sup>**</sup>	B	C	D	E	F	G	H	I
(1)	sabineno	4,9	3-31	1-16	10-19	1-16	0,5-1	2	27	1-21
(2)	limoneno	0,7	4-18	0-8	4-36	0-13	3-4	-	6	-
(3)	$\beta$ -felandreno	-	1-18	0-6	-	-	-	-	-	-
(4)	1,8-cineol	7,9	0-15	1-28	3-15	1-28	16-28	48	0,5	1-38
(5)	$\gamma$ -terpineno	1,2	0,5-17	0-1	3-17	0-2	0,6-1,0	-	3	0-2
(6)	<i>p</i> -mentha-2,4-(8)-dieno	-	0-20	0-2	0-9	0-0,5	-	-	-	-
(7)	terpinen-4-ol	-	-	1-4	1-7	1-3	0,3	1	5	1-3
(8)	fenchona	tr	-	-	-	-	0-10	-	-	0-3
(9)	<i>endo</i> -fenchol	0,8	-	-	-	-	9-30	0,3	-	-
(10)	terpinoleno	0,2	-	-	-	-	-	-	12	0-16
(11)	$\beta$ -cariofileno	41,1	-	1-15	4-9	1-19	2-3	5	17	7-37
(12)	germacreno D	-	-	1-9	2-10	1-9	7-9	5	-	0-1
(13)	biciclo-germacreno	-	2-13	1-12	5-13	1-12	11-12	2	3	0-5
(14)	espatulenol	-	-	9-22	2-5	9-22	1,6-1,9	1	1	0-1

\*N: número correspondente às estruturas químicas abaixo da Figura 2. \*\* **Referência Bibliográfica** - óleo essencial proveniente de: **a**) partes aéreas, Malásia (DIN et al., 1988); **b**) partes aéreas em estágio vegetativo, 11 acessos Cerrado brasileiro; **c**) partes aéreas em estágio de frutificação, 9 acessos Cerrado brasileiro (AZEVEDO et al., 2002); **d**) partes aérea em estágio vegetativo, 7 acessos Cerrado brasileiro (OLIVEIRA et al., 2005); **e**) partes aéreas em estágio de frutificação, 7 acessos Cerrado brasileiro (AZEVEDO et al., 2002); **f**) partes aéreas estágio de florescimento, 2 acessos nordeste do Pará-Brasil (ZOGHBI et al., 2008); **g**) folhas, Paraíba- Brasil (MOREIRA et al., 2010); **h**) folhas, Itália (CONTI et al., 2011); **i**) partes aéreas, Índia (SYAMANSUDAR et al., 2012). tr: traço. – não relatado.

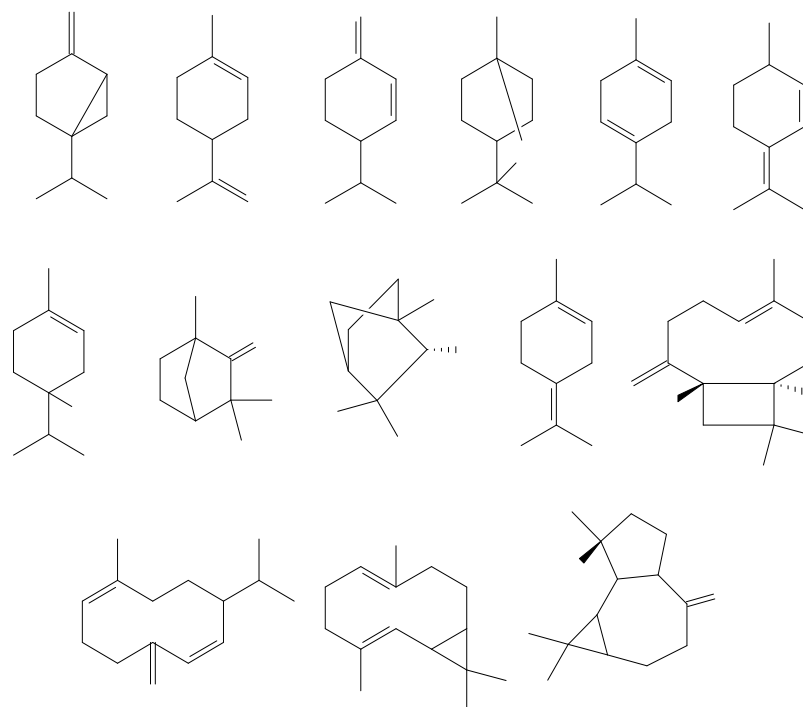


Figura 2 Estruturas químicas dos principais constituintes químicos do óleo essencial de *H. suaveolens*, conforme descrito na Tabela 1

Os teores de óleo essencial também variam conforme o local de colheita da planta, como 0,035% (Viçosa, Brasil); 0,09% a 0,41% (diversas localidades da Índia) e 1,5% (Nigéria) (MARTINS; SANTOS; POLO, 2006; SYAMASUNDAR et al., 2012). Tais variações podem ocorrer como respostas à variabilidade genética intraespecífica, condições ambientais, épocas de colheita, condições de cultivo, tipo de solo e parte da planta utilizada (HAY; SVOBODA, 1993).

Segundo Azevedo et al. (2002), a latitude é um dos principais fatores ambientais que influenciam a composição química do óleo essencial de *H. suaveolens*. Os sesquiterpenos são produzidos, principalmente, em latitudes mais baixas, enquanto que em monoterpenos mais altas.

Estudos de Martins, Santos e Polo (2006) reafirmaram a relação entre componentes do óleo essencial de *H. suaveolens* e fatores edáficos. A disponibilidade nutricional e a idade da planta foram fatores importantes para a variação da composição e do teor de óleo essencial em plantas cultivadas no sul de Minas Gerais, Brasil. Esses autores observaram maiores teores de óleo (0,4%) em plantas deficientes em NPK (2,2 g/m<sup>3</sup> de fósforo; 26 g/m<sup>3</sup> de potássio e 0 g/m<sup>3</sup> de nitrogênio) e colhidas com 135 dias, quando compararam com plantas adubadas (28,3 g de cloreto de potássio; 497,8 g de fosfato de cálcio; 235 g de sulfato de amônio; 100 g/m<sup>3</sup> de potássio; 500 g/m<sup>3</sup> de fósforo e 250 g/m<sup>3</sup> de nitrogênio), colhidas aos 60 dias (0,16 a 0,30 %). Dentre os constituintes identificados cita-se β-felandreno (2,29-3,96%), α-T-bergamoteno (0,43-5,98%), γ-cadineno (0,99 - 8,41%), espatulenol (3,48 – 19,60%), globulol (4,14-14,85%), α-cadinol (2,81 – 7,13%) e, os diterpenos abietatrieno (1,47 – 4,95%), desidroabietol (2,23 – 16,8%) e abietol (0,61 – 8,82%).

Análises quimiométricas do óleo essencial das partes aéreas de *H. suaveolens* em estágio vegetativo, proveniente de 11 acessos do Cerrado brasileiro, permitiram distinguir 3 quimiotipos *p*-menta-2, 4 (8)-diene; limoneno/β-felandreno/γ-terpineno e germacreno D/biciclogermacreno (AZEVEDO et al., 2001). Já a avaliação quimiométrica do óleo essencial de sete acessos de *H. suaveolens* em estádios vegetativo, florescimento e frutificação, também provenientes do Cerrado brasileiro permitiu identificar cinco grupos de populações distinguidas pela fase de crescimento e elevados teores de biciclogermacreno e terpinen-4-ol (grupo 1); sabineno (grupo 2); 1,8-cineol espatulenol (grupo 3); limoneno, γ-terpineno e *o*-ocimeno (grupo 4) e *E*-cariofileno (grupo 5) (AZEVEDO et al., 2002).

Outro aspecto a se considerar na composição química volátil de *H. suaveolens* é a complexidade química de seu óleo essencial. Conti et al. (2011) identificaram a presença de 56 constituintes químicos, sendo constituído de

64,1% de monoterpenos, 24,0% de sesquiterpenos, 8,1% de monoterpenos oxigenados, 2,4% de sesquiterpenos oxigenados e, escasso teor de diterpenos e derivados não terpênicos, 0,3 e 0,2%, respectivamente. Zohgbi et al. (2008) identificaram 47 constituintes químicos, dentre mono-, sesqui- e diterpenos, em 16 amostras de óleos essenciais de *H. suaveolens* coletados no nordeste do estado do Pará, Brasil. Martins, Santos e Polo (2006) identificaram 65 constituintes químicos, sendo os sesquiterpenos oxigenados a classe de terpenos mais representativa dessa composição química. Por outro lado, Syamasundar et al. (2012) identificaram 48 constituintes químicos com predominância de monoterpenos.

#### **2.4 Propriedades biológicas de *Hyptis suaveolens***

*H. suaveolens* é tradicionalmente usada para o tratamento de infecções do trato respiratório, gripes, resfriados, dores, febre, cólicas e doenças da pele (CHUKWUJEKWU et al., 2005).

Alguns usos tradicionais têm sido confirmados por estudos científicos, tais como atividades antimalária (CHUKWUJEKWU et al., 2005); anti-inflamatória (GRASSI et al., 2005); antinociceptiva (SANTOS et al., 2007); anti-hiperglicêmica (MISHRA et al., 2011); gastroprotetora (VERA-ARZAVE et al., 2012); hepatoprotetora e citoprotetora (GHAFARI; GHASSAM; PRAKASH, 2012). Para a comprovação dessas atividades, diferentes extratos ou substâncias isoladas foram avaliados, no entanto, o maior enfoque em estudos de atividade microbiológica, empregaram os óleos essenciais obtidos das folhas de *Hyptis suaveolens* por hidrodestilação (ASEKUN; EKUNDAYO; ADENIYI, 1999; MALELE et al., 2003; MOREIRA et al., 2010; SHARMA; TRIPATHI, 2008; TRIPATHI et al., 2009).

O óleo essencial das folhas de *H. suaveolens* mostrou atividade antibacteriana a 5 mg/mL contra *Staphylococcus aureus* (UCH511), *Bacillus cereus*, *Echerichia coli* (NCTC 7001), *Pseudomonas aeruginosa* (UCH655) e *Candida albicans* (ASEKUN; EKUNDAYO; ADENIYI, 1999). Significativa atividade antimicrobiana contra *Mucor* sp foi observada para o óleo essencial de *H. suaveolens*, rico em  $\beta$ -cariofileno (26,0%),  $\beta$ -elemeno (10,4%), *trans*- $\alpha$ -bergamoteno (7,7%), espatulenol (7,0%) e biciclogermacreno (6,5%), quando comparado ao cetoconazol (MALELE et al., 2003).

Inoculação artificial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* em bulbos de *Gladiolus* spp. (Tourn.) L. (gladiólo) foram tratados com o óleo essencial de *H. suaveolens* e armazenados entre 4 a 12 semanas. As doses de 0,6  $\mu\text{L}/\text{cm}^3$  e 0,4  $\mu\text{L}/\text{cm}^3$  foram suficientes para inibir completamente o crescimento *in vitro* do fungo e inibir completamente a germinação do conídio, respectivamente. Na avaliação da eficácia *in vivo*, todos os tratamentos com o óleo (0,6, 0,8, 1,0 e 1,2  $\mu\text{L}/\text{cm}^3$ ) apresentaram forte redução das UFC (unidades formadoras de colônias). Com 1,2  $\mu\text{L}/\text{cm}^3$ , tanto para 1 e 2 semanas, nenhuma UFC foi observada após armazenagem de 4 semanas. O tratamento com 1,0  $\mu\text{L}/\text{cm}^3$  resultou em baixíssima UFC, após períodos de armazenamento de 4 e 12 semanas (SHARMA; TRIPATHI, 2008).

Em outro trabalho Tripathi, Sharma e Sharma (2009) avaliaram o crescimento e a morfogênese *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladiolos*, agente causador da podridão dos bulbos cultivares suscetíveis de gladiólo, frente a aplicações de diferentes doses do óleo essencial de *H. suaveolens*. A fungitoxicidade foi avaliada por meio da porcentagem de inibição do crescimento radial utilizando fonte de alimentação, contendo o óleo e ensaio da atividade volátil. O crescimento micelial foi completamente inibido a 0,998 e 0,748  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de óleo, respectivamente, na fonte de alimentação contendo o óleo

e no ensaio da atividade volátil. O óleo essencial foi considerado fungicida na concentração de 1,247 e 0,998  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

A atividade anti-*Aspergillus* do óleo essencial das folhas de *H. suaveolens* foi estudada por Moreira et al. (2010). Os autores confirmaram a eficácia do óleo essencial na inibição do crescimento de *Aspergillus parasiticus* e *A. fumigatus* com base na concentração inibitória mínima, concentração fungicida mínima, crescimento micelial e alterações morfológicas. O óleo essencial mostrou forte atividade antifúngica, apoiando a sua possível utilização como uma alternativa para o tratamento terapêutico de infecções causadas por espécies de *Aspergillus*.

Jaya e Dubey (2011) demonstraram que *H. suaveolens* apresentou atividade antifúngica *in vitro* pronunciada (acima de 90 %) contra o toxigênico *Aspergillus flavus* 3NSt em 1  $\mu\text{L/mL}$ . A concentração mínima inibitória (MIC) foi de 1,2  $\mu\text{L/mL}$  e a concentração fungicida mínima (MFC) foi de 1,5  $\mu\text{L/mL}$ . A fumigação de amostras de trigo armazenado com o óleo também mostrou notável proteção (90,91 %).

*Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae) é umas das pestes mais danosas que atacam grãos armazenados no mundo. Conti et al. (2011) demonstraram que a dose de 0,4  $\mu\text{L}$  do óleo essencial de *H. suaveolens* por inseto matou em 24 horas *S. granarius*. As pesquisas desses autores indicaram que esse óleo apresentou toxicidade por contato e atividade repelente em baixas doses.

O óleo essencial de *H. suaveolens* também tem sido estudado quanto à sua potencial atividade repelente e inseticida contra larvas de *Aedes albopictus* Skuse, um mosquito que causa uma severa doença na Europa, conhecida como 'chikungunya'. Nas maiores dosagens (450 e 400 ppm), a mortalidade larval foi de 98,33% e 93,33%, respectivamente. Terpinoleno foi encontrado como sendo o composto puro mais eficaz.

## 2.5 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grande aplicação na agricultura. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecidos vivos (explantes) são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura adequado (ANDRADE, 2002).

Segundo Kerbauy (1997), a regeneração dos explantes *in vitro* é fundamentada na capacidade da proliferação das células vegetais organizarem-se em tecidos e, eventualmente, em plantas completas.

Entretanto, dentre as células vegetais somente algumas delas respondem à indução *in vitro*. Essa habilidade de resposta a um estímulo indutivo visando a um processo de desenvolvimento é nomeada como competência (TORRES et al., 2000).

De acordo com Andrade (2002), existem fatores que afetam a regeneração *in vitro*, entre eles estão: o genótipo da planta, a fonte de explantes, e a condição da cultura, como meio de cultura, luz, vasilhame, reguladores de crescimento e etc.

Dentre as aplicações da cultura de tecidos, a propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação é a aplicação mais prática e aquela de maior impacto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). É uma técnica rápida, que permite uma produção de mudas uniformes e sanitizadas em espaço reduzido, além de uma grande escala desses clones da planta matriz.

Outra técnica de grande importância na cultura de tecidos é a extração dos metabólitos secundários de plantas *in vitro*. Pois, são várias as funções e a importância dos metabólitos secundários para os seres vivos, porém existem alguns entraves, pois apesar dos grandes avanços na química sintética, comumente a extração dos metabólitos secundários de plantas ainda é feito pelo



cultivo convencional das plantas. As plantas originárias de biótipos específicos podem ter muitas dificuldades para crescer fora de seus ecossistemas locais, e também há uma grande dificuldade de algumas plantas no cultivo em grande escala devido à sua suscetibilidade a patógenos (ex. antracnose para *Hypericum* ou *Arnica montana*) (FUMAGALI, 2008). Outro fator é a baixa produtividade de alguns metabólitos secundários extraídos da planta pelo cultivo convencional.

Devido a problemas relacionados ao cultivo de plantas medicinais pelo método convencional, como a desuniformidade da planta, existe a necessidade de desenvolver sistemas alternativos de produção, e o cultivo de células e tecidos vegetais tem sido considerado como um sistema de alto potencial desses problemas (MARASCHIN; VERPOORT, 1999). A cultura de células, tecidos e órgãos é vista por cientistas e biotecnologistas como uma maneira alternativa para produzir os correspondentes metabólitos secundários (FUMAGALI, 2008).

Além disso, para cada espécie é necessário se estabelecer um protocolo específico e mais adequado, e isso envolve vários fatores. Fatores intrínsecos ao material propagativo e ao processo, como genótipo, estado fisiológico e manejo da planta matriz, idade e posição dos explantes, esterilização de subculturas, microambiente dentro dos frascos de cultura e balanço quantitativo dos reguladores vegetais são alguns fatores que devem ser levados em consideração (COSTA et al., 2006); além disso é necessário alguns controles ambientais específicos como o da irradiação, a qualidade da luz (cores de luz, por exemplo) e também a temperatura.

A luz é um fator de fundamental importância para as plantas na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetativo. As respostas morfofisiológicas das plantas não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas também da variação em qualidade luminosa (LARCHER, 2004) e da duração desta (fotoperíodo).

Os reguladores de crescimento também influenciam sobremaneira o crescimento e desenvolvimento *in vitro*. O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984), além da influência endógena.

Botrel (2012) demonstrou que a cultura nodal de *Hyptis marruboides* é um método eficiente para a propagação clonal, pois não interfere na composição química da fração volátil quando comparada com plantas obtidas de cultivos convencionais. Em inoculação em meio MS semissólido na ausência de regulador de crescimento, os melhores resultados foram obtidos: com volumes maiores de meio (40 mL) do que em relação aos menores volumes (10; 20 ou 30 mL), pois proporcionaram aumento do número de nós, tamanho e biomassa seca de parte aérea e raiz. A orientação do segmento nodal de forma horizontal em relação ao vertical produziu maior crescimento, acúmulo de biomassa seca e número de brotações axilares. No entanto, as plântulas oriundas de segmentos apicais apresentaram maior taxa de multiplicação *in vitro* no 3º subcultivo, em relação aos segmentos nodais e ao 1º e 2º subcultivos. As análises químicas de óleo essencial dessa espécie no cultivo em campo, casa de vegetação e *in vitro* não indicaram alterações significativas na composição e teores de constituintes.

Coldea et al. (2011) investigaram os efeitos: dos reguladores de crescimento [6-benziladenina (BA), cinetina, 2iP, TDZ e ANA], os efeitos do meio MS modificado (contendo 10 mM de  $\text{NH}_4^+$ , 5 mM de  $\text{NO}_3^-$ , e suplementado com 2iP, BA, cinetina e ANA), e de dois indutores [ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (AS)], no crescimento das plantas e acúmulo de hipericinas (hipericina e pseudohypericina) e hiperforina em culturas de brotos de *Hypericum hirsutum* e *Hypericum maculatum*. Ocorreu aumento da produção de hipericinas em *H. maculatum* e hiperforina em *H. hirsutum* em meios suplementados com BA ( $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou cinetina ( $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ), enquanto

houve a diminuição de ambos metabólitos secundários e em ambas espécies em presença de TDZ ( $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ). Além disso, TDZ induziu malformações hiperídrica e necrose de brotações. O cultivo de *H. maculatum* em meio MS modificado resultou em cerca de duas vezes maior produção de hipericinas, e um aumento de 6,16 vezes na produção de hiperforina em *H. hirsutum*. Dos dois elicitores, AS, foi mais eficaz em estimular a acumulação de hipericinas. Em  $50 \mu\text{m}$ , AS estimulou a produção de hipericina (7,98 vezes) e pseudo-hipericina (13,58 vezes) de *H. hirsutum*, e, a  $200 \mu\text{m}$ , aumentou a produção de hipericina (2,2 vezes) e pseudo-hipericina (3,94 vezes) em *H. maculatum*.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. R. M. **Principios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa cerrados, 2002. (Documentos, 58).
- ASEKUN, O. T.; EKUNDAYO, O.; ADENIYI, B. A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. **Fitoterapia**, Milano, v. 70, p. 440–442, 1999.
- AZEVEDO, N. R. et al. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Phytochemistry**, New York, v. 57, p. 733–736, 2001.
- AZEVEDO, N. R. et al. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, p. 205–216, 2002.
- BOTREL, P. P. **Micropropagação, teor e composição química volátil de Hyptis marruboides Epl. e atividade inseticida**. 2012. 118 p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- COLDEA, G. et al. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, p. 279–288, 2011.
- CONTI, B. et al. *Hyptis suaveolens* and *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) essential oils: qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae). **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 84, p. 219–228, 2011.
- CHUKWUJEKWU, J. C. et al. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 102, p. 295–297, 2005.
- COSTA, M. A. P. C. et al. Morfogênese in vitro. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p.115-130.
- DIN, L. B. et al. Composition of the steam volatile oil from , *Hyptis suaveolens*, **Pertanika**, Selangor, v. 11, p. 239 - 247, 1988.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 6th ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe, 2008.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18. n. 4, p. 1-11, 2008.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GHAFFARI, H.; GHASSAM, B. J.; PRAKASH, H. S. Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by  $\text{CCl}_4$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Haikou, v. 5, n. 11, p. 868-874, 2012.

GRASSI, P. et al. Chemical polymorphism of essential oils of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 20, p. 131-135, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p. 183.

HAY, R. K. M.; SVOBODA, K. P. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Essex: Longman group, 1993. p. 5.

JAYA, B. P.; DUBEY, N. K. Evaluation of chemically characterised essential oils of *Coleus aromaticus*, *Hyptis suaveolens* and *Ageratum conyzoides* against storage fungi and aflatoxin contamination of food commodities. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 46, p. 754-760, 2011.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, Umuahia, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, Dec. 2009.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n.1, p. 30-33, maio 1997.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004. 531 p.

LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MALELE, R. S. et al. Óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. da Tanzania: composição e atividade fungicida. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, p. 438–440, 2003.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário: Otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 10, p. 24-28, 1999.

MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1203-1209, 2006.

MISHRA, S. B. et al. Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Haikou, v. 4, n. 9, p. 689-693, 2011.

MOREIRA, A. C. P. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, p. 28-33, 2010.

NALAWADE, S. M.; TSAY, H. S. *In vitro* propagation of some important chinese medicinal plants and their sustainable usage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, p. 143–154, 2005.

NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; FLORES, R. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 845-851, maio/jun. 2006.

OLIVEIRA, M. J. et al. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 33, p. 275–285, 2005.

PASTORE, J. F. B. et al. Phylogeny of the subtribe Hyptidinae (Lamiaceae tribe Ocimeae) as inferred from nuclear and plastid DNA. **Taxon**, Utrecht, v. 60, n. 5, p. 1317-1329, 2011.

RUBIOLO, P. et al. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, p. 282–290, 2010.

SANTOS, T. C. et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. **Fitoterapia**, Milano, v. 78, p. 333–336, 2007.

SHARMA, G. P.; RAGHUBANSHI, A. S. Plastic responses to different habitat type contribute to *Hyptis suaveolens* Poit. invasiveness in the dry deciduous forest of India. **Ambio**, Stockholm, v. 38, n. 6, Sept. 2009.

SHARMA, G. P.; RAIZADA, P.; RAGHUBANSHI, A. S. *Hyptis suaveolens*: An emerging invader of Vindhyan plateau, India. **Weed Biology and Management**, Okayama, v. 9, p. 185–191, 2009.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Integrated management of post harvest Fusarium rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, p. 246–254, 2008.

SHARMA, N.; VERMA, U. K. Bioactivity of *Hyptis suaveolens* on storage mycoflora. In: INTERNACIONAL CONFERENCE CONTROLLED ATMOSPHERE AND FUMIGATION IN STORED PRODUCT, 8., 2004, Gold Coast. **Proceedings...** Israel: FTIC, 2004. p. 99-116.

SILVA, A. F. et al. Chemical composition of the essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 6, p. 1-7, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER V. **Farmagnosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, 1999. Cap. 18, p. 387-416.

SOUZA, L. K. H. et al. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 247-249, 2002.

SYAMASUNDAR, K. V. et al. Variations in volatile oil compositions of different wild collections of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit from western ghats of India. **Journal of Pharmacognosy**, Lisse, v. 3, n. 2, p. 131-135, 2012.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TRIPATHI, A.; SHARMA, N.; SHARMA, V. In vitro efficacy of *Hyptis suaveolens* L. (Poit.) essential oil on growth and morphogenesis of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Massey) Snyder & Hansen. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 503–512, 2009.

VERA-ARZAVE, C. et al. Gastroprotection of suaveolol, isolated from *Hyptis suaveolens*, against Ethanol-Induced gastric lesions in wistar rats: role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls. **Molecules**, Basel, v. 17, p. 8917-8927, 2012.

ZOGHBI, M. G. B. et al. Composição química dos óleos essenciais de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.: uma espécie de ocorrência natural no nordeste paraense. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 1, p. 6-9, 2008.



**ARTIGO 1**

**ESTABELECIMENTO DE PROPÁGULOS E ANÁLISE DE  
CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE *Hyptis suaveolens* (L.) POIT *IN VITRO***

**Helena Botelho de Andrade<sup>1</sup> Andreísa Flores Braga<sup>1</sup> Suzan Kelly Vilela  
Bertolucci<sup>1</sup> José Eduardo Brasil Pereira Pinto<sup>1</sup>**

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

Email: heleninhaba@yahoo.com.br

## RESUMO

*Hyptis suaveolens* é uma planta medicinal popularmente usada no tratamento de afecções do trato respiratório, gripes, dores, febre e doenças da pele. Seu óleo essencial tem sido muito estudado na atividade antifúngica, antimicrobiana e tóxica ou repelente de insetos. Objetivou-se avaliar condições para o cultivo *in vitro* e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *H. suaveolens*. Foram avaliados diferentes fatores de cultivo *in vitro* em experimentos independentes: 1) os meios MS; MS/2 e MS/4 em fatorial com quatro concentrações de sacarose: 7,5; 15; 30 e 40 g.L<sup>-1</sup> na germinação de sementes; 2) os meios MS/2 e MS/4 em combinação com 20; 25; 30; 35; 40 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose no estabelecimento de segmentos apicais e nodais; 3) a orientação do explante (horizontal ou vertical) no meio MS/4 com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 4) os meios 2MS, MS, MS/2 e MS/4 com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose no crescimento das plântulas; 5) a porcentagem de pegamento na aclimatização das mudas em casa de vegetação. A germinação de sementes em meio MS com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, e em MS/2 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram melhor desenvolvimento de plântulas. No entanto, as concentrações de 7,5 e 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose tiveram o mais rápido tempo médio de germinação (6 e 7 a 8 dias respectivamente). A concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose no meio MS/2 para o segmento apical e, no MS/4 para o nodal, favoreceram o crescimento das plântulas durante a fase de estabelecimento. Entretanto, devido a menor fragilidade recomenda-se o segmento nodal no estabelecimento *in vitro*. No meio de crescimento, o MS/2 proporcionou conjuntamente maior biomassa seca de folhas (13,92 mg) e de raízes (4,91 mg) de plântulas. Análises por HS-CG-EM detectaram maior quantidade de compostos voláteis para os meios MS/4 e MS/2, sendo sabineno, *E*-cariofileno, germacreno D e biciclogermacreno os constituintes com maior teor na fração volátil. A orientação horizontal do explante proporcionou melhores resultados. Houve 90% de sobrevivência na aclimatização de plântulas com o substrato comercial Tropstrato HA<sup>®</sup> em casa de vegetação.

Palavras-chave: Sais do MS. Sacarose. Fração volátil. Propagação *in vitro*.

## ABSTRACT

*H. suaveolens* is a medicinal plant popularly used in treating respiratory illnesses, colds, aches, fever and skin diseases. Its essential oil has been extensively studied in the activity antifungal, antimicrobial and repellent or toxic of insect. This study aimed to assess conditions for cultivation *in vitro* and production of volatile constituents *in vitro* *H. suaveolens*. Different factors were evaluated *in vitro* in independent trials: 1) the means MS; MS/2 and MS/4 in factorial with four sucrose concentrations: 7.5; 15; 30 and 40 g.L<sup>-1</sup> seed germination; 2) means MS/2 and MS/4 in combination with 20; 25; 30; 35; 40 and 45 g.L<sup>-1</sup> sucrose in the establishment of the apical and nodal segments; 3) the explant orientation (horizontal or vertical) in means MS/4 with 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose; 4) the means 2MS, MS, MS/2 and MS/4 with 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose in the seedling growth; 5) the percentage of fruit set in the acclimatization of seedlings in greenhouse. Seed germination in means MS with 15 g.L<sup>-1</sup> sucrose, and in MS/2 supplemented with 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose showed better seedling development. However, concentrations of 7.5 and 15 g.L<sup>-1</sup> sucrose had the fastest mean germination time (6 and 7 to 8 days respectively). The concentration of 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose in mean MS/2 for the apical segment and in the MS/4 for nodal collaborated for seedling growth during the establishment phase. However, due to lower fragility is recommended nodal segment *in vitro* establishment. In growth medium, MS/2 provided jointly higher dry biomass of leaves (13.92 mg) and roots (4.91 mg) of seedlings. Analysis by HS-GC-MS detected a higher amount of volatile compounds in means MS/4 and MS/2, being sabinene, *E*-caryophyllene, germacrene D and bicyclogermacrene the constituents with higher content in the volatile fraction. Horizontal orientation of explant provided better results. There was 90% of survival on acclimatization of seedlings with commercial substrate Tropstrato HA<sup>®</sup> in the greenhouse.

Keywords: MS salts. Sucrose. Volatile fraction. *In vitro* propagation.

## 1 INTRODUÇÃO

*Hyptis suaveolens* é uma planta medicinal popularmente usada no tratamento de infecções gastrointestinais, cólicas e dor, e também no tratamento de infecções da pele (CORRÊA, 1931). O seu óleo essencial é muito estudado devido às amplas atividades biológicas encontradas. Diversos estudos relatam atividades antimicrobiana e tóxica ou repelente de insetos (ASEKUN; EKUNDAYO; ADENIYI, 1999; CONTI et al., 2011; MALELE et al., 2003; MOREIRA et al., 2010; SHARMA; TRIPATHI, 2008; TRIPATHI; SHARMA; SHARMA, 2009).

A propagação dessa espécie é realizada, principalmente, por sementes, o que ocasiona alta variabilidade genética, afetando a composição química do óleo essencial e, possivelmente sua atividade biológica (AZEVEDO et al., 2001; MARTINS; SANTOS; POLO, 2006).

Como solução a esse problema ocasionado pela variabilidade da propagação sexual, a micropropagação permite a produção de plantas uniformes e, em grande escala. Essa técnica tem demonstrado grande importância prática e potencial nas áreas agrícola e florestal, bem como, na pesquisa básica (LOPES, 2011). Além disso, atualmente há exigências pelo mercado de materiais botânicos com alta qualidade fitossanitária, a disponibilidade de matéria-prima uniforme e de forma contínua (KARUPPUSAMY, 2009; MANSUR, 2012), sendo isso obtido com a cultura de tecidos vegetais.

É importante estabelecer condições ótimas para cada espécie, a fim de se ter sucesso no cultivo *in vitro*. Isso depende de vários fatores intrínsecos ao material propagativo e ao processo como, o genótipo, o estágio fisiológico, o manejo da planta matriz, a idade e posição dos explantes, o microambiente dentro dos frascos de cultura e a interação dos reguladores de crescimento

vegetal, ficando sob a responsabilidade do pesquisador controlá-los adequadamente durante toda a manipulação (COSTA et al., 2006).

Além disso, estudos sobre a expressão de metabólitos secundários *in vitro* têm explorado as respostas fisiológicas, morfológicas e bioquímicas frente aos fatores biológicos, químicos e físicos que afetam as culturas *in vitro* (COLDEA et al., 2011; CONSTABEL, 1990; MANSUR 2012; ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000; VIJAYA et al., 2010).

Embora existam diversos trabalhos relacionados à constituição química volátil de *H. suaveolens* (AZEVEDO et al., 2002; MARTINS; SANTOS; POLO, 2006; MISRA et al., 1981; MOREIRA, 2010; MUKHERJEE; MUKHERJEE; GOSH, 1984; OLIVEIRA et al., 2005; PEERZADA, 1997; RANA et al., 2004) e, alguns sobre o seu cultivo em diferentes ambientes (MARTINS; SANTOS; POLO, 2006; SILVA et al., 2012), pouco há na literatura sobre a micropropagação e análise de constituintes voláteis dessa espécie *in vitro*.

Portanto, objetivou-se avaliar diferentes condições de cultivo *in vitro*, aclimatização e análise de constituintes voláteis de *Hyptis suaveolens in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, Brasil. Exsiccatas foram depositadas no Herbário ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil) sob o registro 20475, e também no Herbário SPF (Herbário da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil), sob o nome de coleta H. B. Andrade 1 (SPF), (Anexo A), onde o nome da planta está atualizado de acordo com o estudo de Pastore et al. (2011).

As plantas matrizes originadas de mudas a partir de sementes foram cultivadas em canteiro na casa de vegetação do Departamento de Agricultura da UFLA localizado a 918 m de altitude, esses com areia lavada, empregando um sistema de fertirrigação uma vez ao dia. A solução nutritiva empregada continha as seguintes fontes e concentrações dos sais puros ( $\text{mg.L}^{-1}$ ):  $\text{CaNO}_3$ : 760;  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ : 225;  $\text{KCl}$ : 400;  $\text{MgSO}_4$ : 375; Tenso Ferro<sup>®</sup>: 44;  $\text{Mn SO}_4$ : 6,72;  $\text{HBO}_3$ : 3,28;  $\text{ZnSO}_3$ : 0,56;  $\text{CuSO}_4$ : 0,36;  $\text{NaMo}_4$ : 0,05 e Mono amônio fosfato (MAP): 110. A casa de vegetação, situada nas coordenadas geográficas 21° 14' S e 45° 00' W.

A coleta dos explantes foi feita durante o outono. As condições de cultivo para todos os experimentos foram em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e intensidade luminosa de  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

As determinações da biomassa seca da parte aérea (BSPA) e da raiz (BSR) nos experimentos foram realizadas por secagem em estufa de circulação forçada de ar a  $40^\circ\text{C}$ , até peso constante, as quais foram expressas em miligramas (mg).

## 2.1 Efeito das concentrações de sais e sacarose em meio de cultura MS na germinação de sementes de *Hyptis suaveolens in vitro*

As sementes da espécie foram obtidas de plantas matrizes cultivadas no Horto Medicinal da Universidade Federal de Lavras.

Antes da desinfestação, as sementes de *H. suaveolens* foram tratadas com cal para retirar o excesso de mucilagem. Em seguida, as sementes foram desinfestadas com álcool 70 % por 30 segundos, seguido de enxague em água destilada e, posteriormente, mergulhadas em uma solução aquosa de água sanitária comercial a 50 %, sob agitação por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas cinco vezes em água destilada e autoclavada.

A germinação de sementes *in vitro* de *H. suaveolens* foi avaliada em três concentrações de sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962): MS completo; MS/2; e MS/4, e quatro concentrações de sacarose: 7,5; 15; 30 e 40 g.L<sup>-1</sup>.

A seguir, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura. Em todos os meios acrescentaram-se 0,6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3, sendo quatro concentrações de sacarose (7,5; 15; 30 e 40 g.L<sup>-1</sup>) e três concentrações de sais (MS, MS/2 e MS/4). Cada tratamento foi constituído de 32 tubos, com uma semente em cada. Diariamente avaliou-se a porcentagem de germinação, que foi considerada após a emergência da plântula e abertura dos folíolos e da radícula desta, para o cálculo do tempo médio de germinação (Tm), utilizando-se a fórmula de Edmond e Drapala (EDMOND; DRAPALA, 1958).

Aos 38 dias, foram avaliados: as porcentagens de sobrevivência e germinação; o comprimento da parte aérea (cm) e as biomassas secas da parte aérea, da raiz e total (mg).

## **2.2 Efeito das concentrações de sais e sacarose em meio de cultura MS para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais e apicais de *Hyptis suaveolens***

As plantas matrizes oriundas de sementes coletadas no Horto de Plantas Medicinais da UFPA foram cultivadas em casa de vegetação com sistema de fertirrigação. Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais e apicais de *H. suaveolens*, plantas com 60 dias foram tratadas com 2 g.L<sup>-1</sup> de Diuron<sup>®</sup>, três vezes por semana. Segmentos nodais e apicais, ambos com 1 cm, foram desinfestados em água corrente por 20 minutos, e agitados em uma solução com água sanitária comercial a 25%, por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Observações de um experimento preliminar, que avaliou 3 meios (MS; MS/2 e MS/4) e 2 concentrações de sacarose (5 e 20 g.L<sup>-1</sup>) indicaram que plântulas cultivadas nos meios MS/2 ou MS/4 suplementados com 20 g.L<sup>-1</sup> de açúcar tiveram um melhor crescimento. Com isso, foram montados 2 experimentos independentes, sendo um com segmento nodal e outro com segmento apical. Ambos os experimentos constituíram de um esquema fatorial 2 x 6, sendo dois meios (MS/2 e MS/4) e seis concentrações de sacarose (20; 25; 30; 35; 40 e 45 g.L<sup>-1</sup>). Os explantes nodais e apicais com o tamanho de 1 cm foram inoculados na orientação vertical em tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura. Em todos os meios acrescentaram-se 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado constituído de dezesseis tubos por tratamento, contendo um explante por tubo.



Foram avaliadas aos 30 dias: a porcentagem de sobrevivência, o comprimento de brotações (cm) e as biomassas secas das brotações, das raízes e total (mg).

### **2.3 Orientação de inoculação do segmento nodal no crescimento *in vitro* de *H. suaveolens***

Após o estabelecimento *in vitro*, visando avaliar a influência da orientação do explante, segmentos nodais com 1,0 cm de comprimento, provenientes de plântulas pré-estabelecidas, foram inoculados em tubos com 15 mL do meio de cultura MS/4, contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, acrescido de 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi aferido em  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem.

Os tratamentos consistiram nas orientações horizontal e vertical dos segmentos nodais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez repetições constituídas de quatro tubos por repetição.

Aos 30 dias avaliaram-se as seguintes variáveis: número de brotações, comprimento das brotações (cm) e biomassas seca da parte aérea, da raiz e total (mg).

### **2.4 Efeitos das concentrações de sais no meio de cultura MS no crescimento *in vitro* de *H. suaveolens***

Verificada a melhor orientação de inoculação do explante, avaliou-se o melhor meio para o subcultivo da espécie. Segmentos nodais de plântulas de *H. suaveolens* foram inoculados na posição horizontal, em quatro concentrações de sais do meio de cultura MS: 2MS, MS, MS/2 e MS/4, todos contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Em todos os meios acrescentaram-se 0,6% de ágar e o pH foi aferido em  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem.

O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo utilizados cinco repetições com quatro tubos contendo um explante. Foram avaliados aos 30 dias:

a porcentagem de sobrevivência, o número e o comprimento das brotações (cm), as biomassas secas das brotações e das raízes e a análise química dos constituintes voláteis.

## **2.5 Aclimatização**

Plântulas com 60 dias de idade foram aclimatizadas em casa de vegetação sob sombrite de 50%.

As tampas do tubo de ensaio contendo as plântulas foram retiradas e permaneceram por 48 horas. Após esse período lavou-se as raízes das plântulas, retirando assim o meio de cultura e transferiu-se as plântulas para tubetes com o substrato Tropstrato HA<sup>®</sup>. Avaliou-se aos 30 dias a porcentagem de pegamento.

## **2.6 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados: ao teste de Duncan a 5% de probabilidade, em relação aos fatores principais; e pelo teste de Tukey Kramer quando houve interações entre os fatores. O programa estatístico SAS versão 9.2 (SAS INSTITUTE, 2008) foi utilizado para o processamento dos dados.

## **2.7 Análise química da fração volátil por HS-CG/EM**

Amostras de folíolos de *H. suaveolens* foram coletadas de plântulas aos 30 dias de cultivo *in vitro* nos meios MS, MS/2 e MS/4, do experimento de meios de crescimento (item 2.4). Não foi realizada análise no meio 2MS devido à morte dos explantes. As amostras foram secas em estufa de circulação de ar a 39°C.

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA. Para extração da fração volátil de *H. suaveolens* empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland)* acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 100 °C durante 30 min, temperatura de seringa a 110 °C. Foram utilizadas 60 mg de folíolos secos, em duplicata, que foram acondicionadas em *vial* para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica. A fração volátil foi analisada em um sistema de cromatografia em fase gasosa *Agilent® 7890A* acoplado a um detector seletivo de massas *Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA)*, operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e da linha de transferência para o MS foram mantidas em 230 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 220 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 250 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:10. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram expressas pela porcentagem de área relativa do cromatograma total de íons.

Os constituintes da fração volátil foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, *Sigma-Aldrich®*, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST

SPEECH GROUP WEBSITE, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van den Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito das concentrações de sais e sacarose em meio de cultura MS na germinação de sementes de *Hyptis suaveolens in vitro*

Como pode ser observado na Tabela 2, a concentração de 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose influenciou negativamente a porcentagem de germinação e sobrevivência das plântulas. Devido ao grande número de parcelas perdidas nessa concentração, não foi feita a análise estatística do crescimento das plântulas para esses tratamentos. As concentrações de sais e sacarose são limitantes para a germinação e sobrevivência das plântulas *in vitro*.

Tabela 2 Porcentagem de sobrevivência de plântulas (%S), porcentagem de germinação (%G) e tempo médio de germinação (Tm-dias) de sementes de *Hyptis suaveolens* com 30 dias de cultivo *in vitro*, oriundas de sementes, em função de diferentes concentrações de sacarose e sais do meio MS. UFLA, Lavras, 2013

Sacarose (g/L)	Tm			%G			%S		
	MS	MS2	MS4	MS	MS2	MS4	MS	MS2	MS4
7,5	6 Aa	6 Aa	6 Aa	90	97	94	16	60	77
15	8 Aa	7 ABa	7 Aa	87	87	97	72	78	72
30	14 Ba	13 Ca	13 Ba	75	91	91	62	47	62
40	24 Cb	16 Ca	21 Cab	31	28	44	31	19	34
CV	20			-			-		

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey Kramer, a 5 % de significância.

As concentrações de sais do meio MS, com exceção daqueles suplementados com 40 g.L<sup>-1</sup> não influenciaram no tempo médio de germinação da semente. No entanto, os tempos médios menores de germinação, independente da concentração de sais do meio, foram nas concentrações de 7,5 e 15 g.L<sup>-1</sup>. Nessas concentrações os tempos médios de germinação foram 6 dias e de 7 a 8 dias, respectivamente (Tabela 2). Soares et al. (2009) obtiveram

melhores resultados com a concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose em trabalhos com mangabeira (*Hancornia speciosa*).

Com exceção dos meios suplementados com 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, observou-se valores maiores ou iguais a 75% na germinação das sementes de *H. suaveolens in vitro*, independente das concentrações de sais nos meios (Tabela 2). Provavelmente, o excesso de sacarose do meio extracelular (a alta concentração de solutos) limitou a absorção de água pela semente, devido à alta pressão osmótica (TAIZ; ZEIGER, 2009). A menor concentração de soluto, portanto disponibiliza mais água para embebição da semente, sendo importante para iniciar a mobilização de reservas e retomada do crescimento do eixo embrionário dessa, favorecendo assim a germinação nesses meios.

Estudo com diferentes concentrações de sais no MS, não influenciaram a germinação *in vitro* de timbó (*Derris urucu*) (CONCEIÇÃO, 2000). Na germinação *in vitro* de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) os meios de cultura MS e WPM, também não tiveram efeitos significativos (NERY et al., 2008). No entanto, corroborando com o presente estudo, Castro et al. (2011) observaram diminuição na germinação *in vitro* de palma-doce (*Nopalea cochenillifera* (L.) SalmDyck) com o aumento da sacarose.

Após a germinação, as plântulas tiveram um maior desenvolvimento nas concentrações de 15 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Plântulas em meio MS completo e com baixo teor de sacarose (7,5 g.L<sup>-1</sup>) apresentaram a menor porcentagem de sobrevivência. Isso pode estar relacionado à baixa quantidade de carboidrato, o que reduz a disponibilidade de substrato para as rotas biossintéticas da planta. Conforme Taiz e Zeiger (2009), na maioria das plantas a sacarose é o principal açúcar translocado e a forma de carbono que a maioria dos tecidos não fotossintéticos importa, ela pode ser considerada como o verdadeiro substrato de açúcar para a respiração vegetal.

Os dados de acúmulo de biomassa seca confirmam as observações acima (Tabela 3).

Tabela 3 Biomassa seca de brotações (BSB–mg), biomassa seca de raízes (BSR–mg), biomassa seca total (BST–mg) de plântulas de *Hyptis suaveolens* com 30 dias de cultivo *in vitro*, oriundas de sementes, em função de diferentes concentrações de sacarose (S) e sais do meio MS. UFLA, Lavras, 2013

S (g/L)	BSB			BSR			BST		
	MS	MS/2	MS/4	MS	MS/2	MS/4	MS	MS/2	MS/4
15	13,7Aa	8,4Bb	9,8Ab	8,0Aab	7,0Bb	9,7Aa	21,7Aa	15,5Bb	19,5Aab
30	5,5Bc	12,5Aa	8,6ABb	2,2Bc	9,9Aa	6,0Bb	7,4Bc	22,4Aa	14,6Bb
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CV	30			37			30		

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey Kramer, a 5 % de significância.

Sementes germinadas em meios MS (13,7; 8,0 e 21,7 mg, respectivamente) e MS/4 (9,8; 9,7 e 19,5 mg) produziram plântulas com maior biomassa seca de brotos, raízes e totais com a concentração de sacarose de 15 g.L<sup>-1</sup>. No meio MS/4 não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de 15 ou 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose para a biomassa seca de brotos. No meio MS/2 as maiores médias foram obtidas na presença de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, com 12,3 mg para a biomassa seca de brotação, 9,9 mg para a biomassa seca de raiz e 22,4 mg para a biomassa seca total.

Ao contrário das concentrações de sacarose, as concentrações de sais do meio MS não influenciaram o comprimento de brotos. Com diferenças não significativas estatisticamente e não havendo interação entre os fatores, a média de comprimento de brotos em relação aos sais do meio MS foi de 2,03 cm. Já, para as concentrações de sacarose houve diferenças estatísticas, as melhores

médias foram em 7,5 ou 15 g.L<sup>-1</sup> (2,5 e 2,4 cm), em comparação a 1,5 cm em 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

Durante o cultivo *in vitro*, as concentrações de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem somente efeito nutritivo, mas também a influência direta no crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996). Para *H. suaveolens* foi possível determinar que concentrações de sacarose entre 15 e 30 g.L<sup>-1</sup> proporcionaram melhor crescimento para o cultivo *in vitro*, já que as concentrações de 7,5 ou 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram resultados inferiores.

Resultados similares foram observados por Braun et al. (2010) em cultivo *in vitro* de plântulas oriundas de sementes de beterraba (*Beta vulgaris*). Os meios de cultura suplementados com 15 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose também proporcionam plântulas mais vigorosas e o com maior acúmulo de biomassa seca.

Portanto, para a germinação *in vitro* de sementes de *Hyptis suaveolens* indica-se tanto o meio de cultura MS suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, quanto o meio MS/2 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

### **3.2 Efeito das concentrações de sais e sacarose em meio de cultura MS para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais e apicais de *Hyptis suaveolens***

#### **A) Segmento Apical**

De acordo com a Tabela 4, em concentrações maiores de sacarose o acúmulo de biomassa de brotos foi maior. A sacarose é o principal açúcar translocado pela planta e a forma de carbono que a maioria dos tecidos não fotossintéticos importa (TAIZ; ZEIGER, 2009). A quantidade de substrato disponível para a planta realizar seus ciclos de biossíntese, com certeza influencia no seu acúmulo de biomassa.



Tabela 4 Biomassa seca de brotos (BSB mg) e biomassa seca total (BST-mg) de plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro* com 30 dias de cultivo oriundas de segmentos apicais, em função de concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras, 2013

Sacarose (g/L)	BSB		BST	
	MS/2	MS/4	MS/2	MS/4
20	14,63 Ba	11,80 Ba	14,85 Ba	11,95 Ba
25	14,80 Ba	12,56 Aba	14,81 Ba	12,67 ABa
30	18,57 Aa	12,40 ABb	18,72 Aa	12,48 ABb
35	19,81 Aa	12,82 ABb	19,88 Aa	13,37 ABb
40	19,22 Aa	13,74 ABb	19,31 Aa	14,71 ABb
45	16,76 Aba	15,79 Aa	16,90 Aba	16,21 Aa
CV	14		15	

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey Kramer, a 5 % de significância.

A biomassa seca da parte aérea das plântulas tiveram maiores médias a partir de 30 g.L<sup>-1</sup> no meio com meia força (MS/2), com média 18,57 mg; e a partir de 25 g.L<sup>-1</sup> no meio com um quarto de força (MS/4), com 12,56 mg. Já em relação aos sais do MS, houve no geral um maior acúmulo de biomassa seca de brotos no meio MS/2 em relação ao MS/4.

Pinto et al. (2011), avaliando o estabelecimento de hortelã-japonesa (*Mentha arvensis* L., *Lamiaceae*) em concentrações de sais do MS, obtiveram maiores valores de biomassa seca de parte aérea em meio MS e MS/2 que em MS/4. Franzin et al. (2004), em trabalhos com *Rollinia salicifolia*, obtiveram bons resultados com o meio MS/2, principalmente em relação ao tamanho do broto formado.

Os resultados para a biomassa seca total coincidiram com os da biomassa seca de brotos (Tabela 4).

O sistema radicular das plântulas se desenvolveu melhor em menor quantidade de sais (MS/4), com média de 0,48 mg. Já a sacarose não o

influenciou estatisticamente. No entanto observou-se uma tendência de melhor enraizamento nas plântulas com  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. Xavier, Wendling e Silva (2009) relataram a existência de evidências sobre a melhor ocorrência de rizogênese quando se mantêm as plantas bem nutridas, juntamente com a redução nos teores de nitrogênio, ocasionada pela diminuição de sais do meio; e que o alto conteúdo de carboidratos atua como um fator importante à rizogênese, já que a iniciação da raiz requer energia.

O comprimento da parte aérea teve maiores médias (2,89 cm) em baixa concentração de sacarose ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ), (Figura 3). Devido ao balanço osmótico, plântulas em meio de cultura com menor concentração de sacarose (potencial osmótico desprezível) absorvem mais água que àquelas em um meio mais concentrado (DIAS; BLANCO, 2010). As células vegetais de caules e raízes podem se expandir por alongamento com a entrada de água nestas; ocorrendo três etapas nesse processo: a absorção osmótica de água pela membrana plasmática é acionada por um gradiente de potencial hídrico, a pressão de turgescência aumenta devido à rigidez da parede celular e com isso ocorre os afrouxamentos bioquímicos da parede, permitindo a célula expandir-se (TAIZ; ZEIGER, 2009).

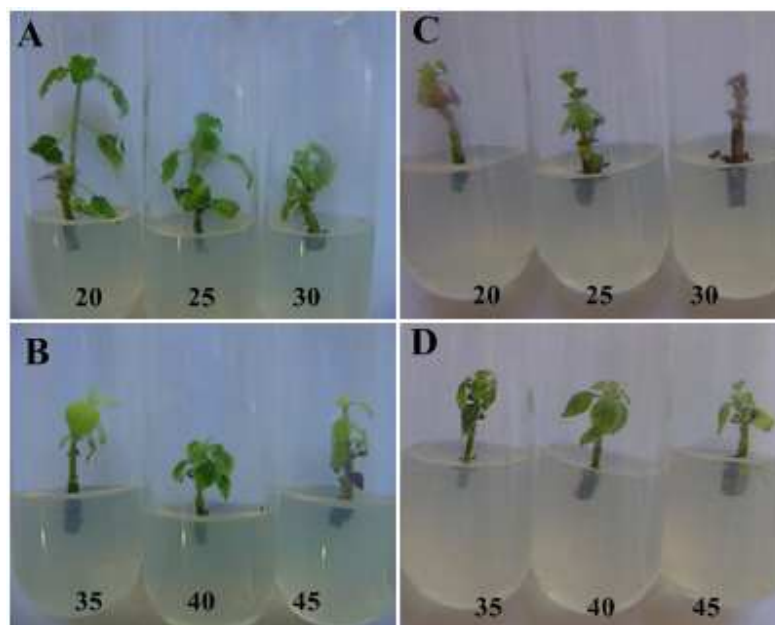


Figura 3 Plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro* originadas de segmentos apicais de casa de vegetação, aos 30 dias. a) MS/2 com 20, 25 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; b) MS/2 com 35, 40 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; c) MS/4 com 20, 25 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; d) MS/4 com 35, 40 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. UFLA, Lavras, 2013

Apesar das diferenças observadas nas variáveis de respostas, de maneira geral, o meio MS/2 suplementado com 30g/L de sacarose proporcionou melhor estabelecimento e crescimento das gemas apicais.

#### B) Segmento Nodal

A biomassa seca e o comprimento de brotos da parte aérea das plantas, em geral, não foi influenciado pelas concentrações de sacarose. Somente no meio MS/4 com 45 g.L<sup>-1</sup> houve menor acúmulo de biomassa seca em relação as outras concentrações (20; 25; 30; 35 e 40 g.L<sup>-1</sup>), 7,98 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 5).

Tabela 5 Biomassa seca de brotos (BSB mg), biomassa seca de raízes (BSR-mg) e biomassa seca total (BST-mg) de plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro* com 30 dias de cultivo oriundas de segmentos nodais, em função de concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras, 2013

S (g/L)	BSB		BSR		BST	
	MS/2	MS/4	MS/2	MS/4	MS/2	MS/4
20	3,9 Aa	9,72 ABa	0,08 Aa	0,53 Ba	3,98 Aa	10,25 Ba
25	3,9 Ab	10,08 ABa	0,00 Aa	0,97 Ba	3,91 Ab	10,75 Ba
30	3,4 Ab	12,39 ABa	0,06 Aa	1,48 Aba	3,48 Ab	13,87 ABa
35	3,8 Ab	13,83 Aa	0,08 Ab	2,68 Aa	3,92 Ab	16,52 Aa
40	3,4 Ab	12,32 ABa	0,07 Ab	1,63 Aba	3,49 Ab	12,86 ABa
45	5,2 Aa	7,98 Ba	0,11 Aa	1,27 Aba	5,29 Aa	9,24 Ba

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey Kramer, a 5 % de significância.

Já as concentrações de sais influenciaram o crescimento da parte aérea. O comprimento de brotos foi maior no meio MS/2 (1,99 cm), em comparação ao MS/4 (1,62 cm), e não houve diferença estatística das concentrações de sacarose em relação a esses. As biomassas secas de brotos no geral tiveram maiores médias no MS/4, exceto para as concentrações extremas de sacarose (20 e 45 g.L<sup>-1</sup>), que não apresentaram diferenças estatísticas entre os meios. Em trabalhos com *Lychnophora pinaster*, a diminuição da concentração dos sais do MS para MS/4 proporcionou maior crescimento das plântulas (SOUZA et al., 2007).

Os sistemas radiculares não diferiram estatisticamente em relação à sacarose para o meio MS/2. Já no meio MS/4, a partir de 30 g.L<sup>-1</sup> houve um melhor desenvolvimento. No geral, os meios não influenciaram no acúmulo de biomassa seca da raiz, exceto nas concentrações 35 e 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose que a quarta parte de sais teve maiores médias (2,68 e 1,63 mg). De forma geral, pode-se observar uma tendência de maior quantidade de raízes no MS/4. As raízes são responsáveis pela retirada de água e nutrientes do meio, um sistema radicular bem desenvolvido, portanto influencia uma boa formação de parte aérea. Rossi

et al. (2011), avaliando o estabelecimento de hortelã-japonesa (*Mentha arvensis* L., *Lamiaceae*) obtiveram o maior comprimento médio de raízes dessa planta em MS/2 e MS/4.

Verificou-se que os explantes em meio com menor salinidade possuem maior biomassa seca total (Figura 4), exceto nas concentrações de 20 e 45 g.L<sup>-1</sup>, que não apresentaram diferenças estatísticas. As maiores médias nas concentrações de 30, 35 e 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foram 13,87; 16,52 e 12,86 mg, respectivamente.

Assim, recomenda-se para o estabelecimento de gemas nodais o meio MS/4 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

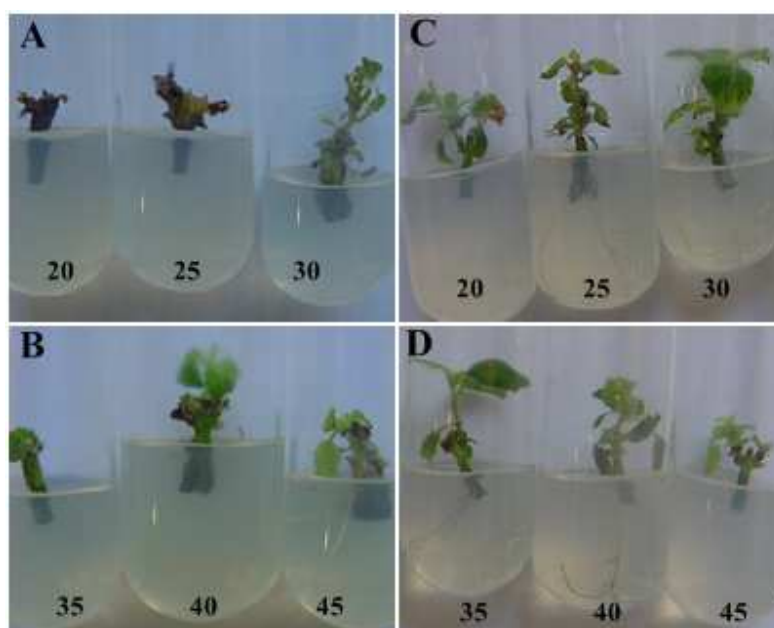


Figura 4 Plântulas de *Hyptis suaveolens* *in vitro* originadas de segmentos nodais de casa de vegetação, aos 30 dias. **a)** MS/2 com 20, 25 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; **b)** MS/2 com 35, 40 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; **c)** MS/4 com 20, 25 e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; **d)** MS/4 com 35, 40 e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. UFLA, Lavras, 2013

As condições para o cultivo *in vitro* são diferenciadas, uma vez que cada espécie possui características únicas, determinadas por fatores genéticos e fisiológicos. Assim, o suprimento dos nutrientes minerais no meio de cultura varia conforme a espécie vegetal e o processo de cultivo (ROSSI et al., 2011).

Além disso, a escolha do tipo de explante e do meio nutritivo são critérios importantes para o estabelecimento de cultivos *in vitro*. Embora, teoricamente, qualquer tecido possa ser utilizado como fonte de explante, alguns aspectos devem ser considerados e testados quanto à escolha do mais adequado aos processos morfogênicos de interesse (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Nota-se neste estudo uma menor fragilidade do segmento nodal em relação ao apical. Os explantes apicais são tecidos mais frágeis, podendo sofrer mais frente às injúrias no processo de desinfestação (GOLLE et al., 2012) e provavelmente as variações osmóticas.

Devido à menor fragilidade do segmento e condições de desenvolvimento da plântula recomenda-se o segmento nodal em relação ao apical para o estabelecimento de *Hyptis suaveolens*; esse em meio MS/4 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

### **3.3 Orientação de inoculação do segmento nodal no crescimento *in vitro* de *H. suaveolens***

A orientação horizontal do segmento nodal apresentou as melhores respostas das variáveis de crescimento analisadas (Tabela 6 e Figura 5). Isso possivelmente se deve a um maior contato do explante com o meio de cultura, proporcionando assim uma maior área de raiz no explante. Uma maior quantidade de raízes proporcionaria uma maior nutrição, e maior comprimento e biomassa de brotos.

Tabela 6 Número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB-cm), biomassa seca de brotos (BSB-mg), biomassa seca de raiz (BSR-mg) e biomassa seca total (BST-mg) em brotações de *Hyptis suaveolens* com 30 dias de cultivo, em função de diferentes orientações. UFLA, Lavras, 2013

Orientação	NB	CB	BSB	BSR	BST
Horizontal	1,84 a	1,79 a	13,89 a	5,98 a	19,87 a
Vertical	1,57 b	1,16 b	7,62 b	1,99 b	9,62 b
CV	17	30	35	29	30

As médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5 % de significância.



Figura 5 Influência da orientação vertical e horizontal dos explantes no crescimento de plântulas de *Hyptis suaveolens* *in vitro*. UFLA, Lavras, 2013

Erig e Schuc (2002) em trabalhos com macieira (*Malus domestica*), cv. Marubakaido obtiveram maiores médias de números de brotos na orientação horizontal, entretanto o comprimento de brotos não foi influenciado.

Em trabalho com mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), Erig e Schuc (2006) observaram maior média de brotos na orientação horizontal. Botrel (2012), em estudo com orientação de *Hyptis marrubioides* observou maior comprimento e

biomassa seca de brotos, número de nós, comprimento e biomassa seca da raiz, também na orientação horizontal.

O transporte polar de auxina do ápice para a parte basal da planta gera um gradiente longitudinal, afetando com isso vários processos de desenvolvimento e crescimento da planta (TAIZ; ZEIGER, 2009).

### **3.4 Efeitos das concentrações de sais no meio de cultura MS no crescimento e análise da fração volátil *in vitro* de *H. suaveolens***

Avaliou-se neste trabalho o crescimento *in vitro* e a análise da fração volátil de *Hyptis suaveolens*. Para uma melhor compreensão dividiu-se os resultados em subitens.

#### **3.4.1 Crescimento *in vitro***

A alta salinidade do meio teve efeito tóxico na planta, provocando necrose em todo o tratamento com o dobro de sais do meio MS. Os efeitos da salinização sobre as plantas podem ser causados pelas dificuldades de absorção de água, toxicidade de íons específicos e pela interferência dos sais nos processos fisiológicos (efeitos indiretos) reduzindo o crescimento e o desenvolvimento das plantas. O aumento da pressão osmótica causado pelo excesso de sais solúveis na solução poderá atingir um nível em que as plantas não terão forças de sucção suficiente para superar essa pressão osmótica e, em consequência, a planta não irá absorver água, mesmo de um solo aparentemente úmido (seca fisiológica). Dependendo do grau de salinidade, a planta em vez de absorver, poderá até perder a água que se encontra no seu interior, e esse processo se dá o nome de plasmólise (DIAS; BLANCO, 2010).

À medida que a salinidade do meio diminuiu, a porcentagem de sobrevivência aumentou (Tabela 7).



Tabela 7 Número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB-cm), número de folhas (NF), biomassa seca de folhas (BSF-mg), biomassa seca de caules (BSC-mg), biomassa seca de raiz (BSR-mg) e biomassa seca total (BST-mg) em brotações de *Hyptis suaveolens* com 30 dias de cultivo, em função de diferentes meios. UFLA, Lavras, 2013

Meio	NB	CB	NF	BSF	BSC	BSR	BST	%S
2MS	-	-	-	-	-	-	-	0
MS	1,9 a	1,9 a	6,4 ab	14,2 a	6,7 a	1,1 b	22,1 a	45
MS/2	1,8 a	2,4 a	6,9 a	13,0 a	4,5 a	4,9 a	22,4 a	65
MS/4	2,0 a	1,8 a	5,3 b	8,4 b	4,8 a	4,9 a	18,2 a	75
CV	18	20	13	19	26	38	14	-

As médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5 % de significância.

Segundo Dias e Blanco (2010), a disponibilidade de água para a cultura é reduzida com o aumento da salinidade.

O desenvolvimento de parte aérea da planta, em geral não foi afetado pelas diferenças de sais entre o meio MS ou com concentração de metade da força (50%) e um quarto da força (25%). Não houve diferenças estatísticas para o número, comprimento de brotos e biomassa seca de caule em relação a esses meios. Somente o número e a biomassa de folhas secas foram menores no meio mais diluído (MS/4).

Unemoto et al. (2007), em estudos com a espécie *Laelia lundii*, obtiveram plântulas mais vigorosas e um melhor desenvolvimento tanto em meio MS convencional, quanto em MS modificado com a metade dos macronutrientes. Entretanto, estudos com a espécie *Oncidium baueri* (Orchidaceae) indicaram maior desenvolvimento de mudas e altura da parte aérea em meio 50 % MS, com adição de 40 g/L de sacarose (SORACE et al., 2008).

O sistema radicular obteve maior desenvolvimento nos meios com menor salinidade (MS/2 e MS/4), com médias 4,91 e 4,92 mg, respectivamente. Segundo Golle et al. (2012), o processo de enraizamento pode estar ligado à relação carbono/nitrogênio (C/N), em que a redução do nitrogênio e o aumento de fontes de carboidrato favoreceram os processos de enraizamento.

Soares et al. (2011) em estudo com plântulas de macaúba verificaram maior número de raízes em meio MS reduzido à metade (MS/2). Estudos com *Cattleya loddigesii* Lindley, da família *Orchidaceae*, desenvolveram maior quantidade de raízes e comprimento em plântulas cultivadas em meio com 50% da concentração de sais do meio MS (GALDIANO et al., 2013).

O desenvolvimento das plântulas em todos os meios avaliados teve bons resultados. No entanto, o meio MS/2 se destacou, pois nas variáveis houve diferenças estatísticas, o meio MS/2 apresentou maior número de folhas em relação ao meio MS/4 e maior biomassa seca de raízes em relação ao meio MS (Figura 6).



Figura 6 Influência de sais do meio MS no crescimento de plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro*. **a)** Dobro de sais (2 MS); **b)** MS; **c)** 50 % do MS (MS/2) e **d)** 25 % do MS (MS/4). UFLA, Lavras, 2013

#### 3.4.2 Análise da fração volátil

Os constituintes da fração volátil das folhas de plântulas de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS estão listados na Tabela 8, onde se observa que 36 constituintes voláteis foram identificados nas análises químicas por HS-CG/MS.

Tabela 8 Constituição química volátil de plântulas de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* em diferentes saís do meio MS. UFLA, Lavras, 2013

COMPOSTOS	IR	SAIS DO MS		
		MS	MS/2	MS/4
		Área %±DP		
$\alpha$ -tujeno	925	nd	0,42±0,02	0,49±0,07
$\alpha$ -pineno	932	1,89±0,39	1,99±0,13	2,37±0,05
sabineno	973	16,20±2,74	14,93±2,15	15,07±0,95
$\beta$ -pineno	976	4,94±1,01	6,42±1,07	9,00±1,07
$\beta$ -mirreno	990	nd	0,46±0,03	0,55±0,20
$\alpha$ -felandreno	1005	nd	0,74±0,011	0,92±0,19
$\alpha$ -terpineno	1016	nd	nd	0,34±0,10
p-cimeno	1023	nd	nd	0,25±0,12
$\beta$ -felandreno	1028	5,89±0,08	6,99±0,02	10,46±2,51
1,8-cineol	1030	6,72±0,67	5,75±0,71	5,53±0,19
$\gamma$ -terpineno	1056	nd	0,38±0,01	0,74±0,24
hidrato de Z-sabineno	1065	nd	0,79±0,01	1,05±0,01
terpinoleno	1087	nd	0,44±0,02	1,41±0,12
hidrato de E-sabineno	1098	nd	0,65±0,09	0,69±0,01
terpinen-4-ol	1176	nd	0,33±0,04	0,42±0,10
$\alpha$ -terpineol	1190	nd	0,43±0,17	0,31±0,12
$\gamma$ -elemeno	1336	nd	0,27±0,02	0,25±0,03
$\alpha$ -cubebeno	1348	nd	nd	0,35±0,09
$\alpha$ -copaeno	1374	nd	0,77±0,07	1,40±0,39
$\beta$ -bourboneno	1383	nd	nd	0,14±0,00
$\beta$ -elemeno	1391	1,88±0,11	1,98±0,03	2,02±0,25
$\alpha$ -gurjuneno	1412	nd	nd	0,26±0,02
E-cariofileno	1419	26,02±0,30	20,86±1,56	14,38±0,68
$\beta$ -copaeno	1427	nd	nd	0,20±0,00

Índice de retenção relativo à série *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em colunas HP-5MS na ordem de eluição. DP = desvio padrão (*n*=2). nd = não detectado; tr = traço ( $\leq 0,01\%$ ).

Tabela 9 (continuação)

COMPOSTOS	IR	SAIS DO MS		
		MS	MS/2	MS/4
		Área %±DP		
$\alpha$ -guaiano	1437	nd	0,58±0,08	0,58±0,10
$\alpha$ -humuleno	1452	1,89±0,10	1,58±0,01	1,48±0,20
alo-aromadendreno	1459	1,18±0,03	0,72±0,23	0,44±0,02
$\gamma$ -muuroleno	1476	0,94±0,00	0,64±0,01	0,66±0,11
germacreno D	1481	15,31±0,31	15,83±0,41	12,70±1,31
$\beta$ -selineno	1485	1,63±0,019	1,17±0,07	1,08±0,20
biciclogermacreno	1496	12,83±1,18	12,19±0,44	9,45±1,37
$\alpha$ -muuroleno	1499	nd	nd	0,20±0,03
$\gamma$ -cadineno	1513	nd	0,39±0,01	0,34±0,047
$\delta$ -cadineno	1522	nd	0,63±0,01	0,66±0,11
espatulenol	1576	1,42±0,20	0,72±0,05	0,97±0,45
óxido de cariofileno	1581	0,68±0,00	0,36±0,03	0,49±0,18
<b>Hidrocarbonetos Monoterpênicos</b>		28,93	32,78	41,62
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		6,72	7,95	8,00
<b>Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos</b>		61,68	57,62	46,61
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		2,1	1,08	1,46
<b>Total de constituintes presentes</b>		15	29	36
<b>Total identificado</b>		99,43	99,44	97,70

Índice de retenção relativo à série *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em colunas HP-5MS na ordem de eluição. DP = desvio padrão (*n*=2). nd = não detectado; tr = traço ( $\leq 0,01\%$ ).

A complexidade do perfil cromatográfico aumentou à medida que as concentrações de sais diminuíram. Nota-se que foram detectados 15, 29 e 36 constituintes voláteis nas plântulas cultivadas em meio MS, MS/2 e MS/4, respectivamente. A menor disponibilidade de sais interfere diretamente nos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal. Conseqüentemente, a planta fica mais frágil e mais susceptível a adversidades do ambiente, como o ataque de patógenos e herbívoros. Havendo assim menor investimento em biomassa e maior investimento em substâncias de defesa química de plantas. Acredita-se que o metabolismo secundário é gerado por rotas ativadas em alguma situação específica de crescimento ou desenvolvimento, ou em alguma situação de estresse como o ataque de herbívoros e limitações nutricionais, por

exemplo, (SIMÕES; SPTIZER, 2000); atuando como um sistema de defesa da planta.

Em um estudo similar com plântulas de *Melissa officinalis* L., Reis et al. (2009) atribuíram que o maior teor de óleo essencial no meio MS/4 pode ter ocorrido em resposta de uma defesa da plântula, frente a uma situação de estresse causada pela deficiência de nutrientes. No presente estudo, pode ser que a maior complexidade da fração volátil seja também uma resposta a esse fator de estresse.

Hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos foram as classes dominantes de constituintes voláteis, compreendendo entre 88,23% a 90,61% da composição volátil total. Houve a presença também de monoterpenos (6,72 a 8,00%) e sesquiterpenos (1,08 a 2,10%) oxigenados.

Observa-se na Tabela 8 que, à medida que a concentração de sal no meio foi reduzida, houve aumento no teor de hidrocarbonetos monoterpênicos, cujos teores foram de 28,93%; 32,78% e 41,62%, respectivamente. O contrário ocorreu com os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, os quais apresentaram uma diferença de cerca de 15% na sua concentração total, entre os meios MS e MS/4.

Com base no exposto acima, pode afirmar que a concentração de sais do MS influencia a composição química qualitativa e quantitativa da fração volátil *in vitro*. Corroborando com o presente estudo, Reis et al. (2009) também observaram diferenças qualitativas e quantitativas no teor de constituintes majoritários em *Melissa officinalis*. Os componentes majoritários do óleo essencial de plântulas de *M. officinalis* cultivadas nos meios MS e MS/4 foram o geranial (25,23 e 16,21%, respectivamente) e o neral (24,5 e 20,53%, respectivamente). Já o componente majoritário presente no óleo de plântulas de melissa cultivadas em meio MS/2 foi o acetato de nerila (18,69%), indicando que o meio influenciou a composição química do óleo essencial de *M. officinalis* L.

Com exceção do manuscrito de Reis et al. (2009), não foi encontrado na literatura consultada outros trabalhos relacionando à produção e composição de constituintes voláteis *in vitro* com concentrações de sais do meio MS. No entanto, em cultivo hidropônico de *Salvia officinalis* L. (sálvia), Taarit et al. (2009) também observaram alterações na composição química qualitativa e quantitativa do óleo essencial dos frutos de sálvia frente ao estresse salino.

No que diz respeito à composição química da fração volátil de plântulas de *H. suaveolens*, a fração monoterpênica foi constituída, principalmente, de sabineno ( $14,93 \pm 2,15$  a  $16,20 \pm 2,74\%$ );  $\beta$ -pineno ( $4,94 \pm 1,01$  a  $9,00 \pm 1,07\%$ );  $\beta$ -felandreno ( $5,89 \pm 0,08$  a  $10,46 \pm 2,51\%$ ) e 1,8-cineol ( $5,75 \pm 0,71$  a  $6,72 \pm 0,67\%$ ). Por outro lado, a composição majoritária da fração sesquiterpênica foi representada pelo *E*-cariofileno ( $14,38 \pm 0,68$  a  $26,02 \pm 0,30\%$ ); germacreno D ( $12,70 \pm 1,31$  a  $15,83 \pm 0,41\%$ ) e biciclogermacreno ( $9,45 \pm 1,37$  a  $12,83 \pm 1,18\%$ ), Gráfico 1. Dentre todos esses constituintes, o teor de *E*-cariofileno foi o mais influenciado pela concentração de sais do meio MS. No meio com a maior concentração de sais (MS) produziu cerca de 10% a mais, que na menor concentração (MS/4).

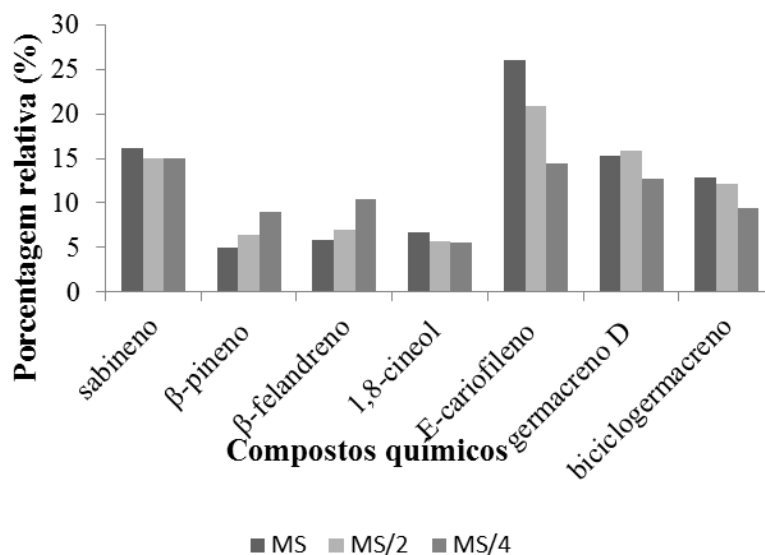


Gráfico 1 Porcentagem relativa (%) dos constituintes com maior teor na fração volátil de *Hyptis suaveolens* cultivada sob diferentes concentrações de sais do meio MS. UFLA, Lavras, 2013

Apesar de não podermos afirmar que esses constituintes majoritários desempenham as atividades biológicas da fração volátil, pois nem sempre são eles que têm a ação dela, podendo ser atribuído a um constituinte em menor proporção ou de um sinergismo entre os compostos existentes (HOUGHTON et al., 2007), o potencial de alguns deles foi evidenciado em trabalhos. β-pineno demonstrou ação inseticida e repelente de insetos (HARBONE, 1993; SIMÕES; SPTIZER, 2004). Mondello et al. (2006), mostraram que o 1,8 cineol apresenta ação antifúngica contra *Candida albicans*, interrupção do crescimento microbiano em *Listeria monocytogenes* (LIS-BALCHIM; DEANS, 1997) e atividade antioxidante *in vitro* (TOSCAN, 2010).

A composição da fração volátil observada nas plântulas cultivadas *in vitro* é similar a composição do óleo essencial da parte aérea de *Hyptis suaveolens* coletadas em 11 localidades do cerrado brasileiro nos experimentos de Azevedo et al. (2001). Nas análises por GC-MS, esses autores também



identificaram a presença de sabineno,  $\beta$ -felandreno, 1,8-cineol, limoneno e bicliclogermacreno, como os principais constituintes. Enquanto que Conti et al. (2011) identificaram o sabineno (27,0%), o *E*-cariofileno (17,1%), o terpinoleno (11,9%), o  $\beta$ -pineno (9,4%) e o limoneno (6,0%) como os principais constituintes do óleo essencial extraído das folhas de frescas de *H. suaveolens* cultivadas na Itália.

Em termos qualitativos, observou-se variações menos expressivas na composição química entre os meios MS/2 e MS/4, em comparação ao meio MS. No meio MS/2, os constituintes  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\beta$ -bourboneno,  $\alpha$ -gurjuneno,  $\beta$ -copaeno e  $\alpha$ -muuroleno estavam ausentes. Esses constituintes apresentaram concentrações individuais inferiores a 0,44% na composição volátil do meio MS/4.

As plântulas se desenvolveram menos *in vitro* (item 3.4.1) em meio MS/4 comparadas ao meio MS/2, provavelmente isso tenha influenciado na maior produção de terpenos para auxiliar na sua defesa e adaptação ao ambiente. Segundo Taiz e Zeiger (2009), os terpenos agem na defesa de muitos vegetais contra os herbívoros, devido à sua toxicidade para muitos insetos e animais herbívoros; exercem assim importantes funções de defesa no reino vegetal (GERSHENZON; CROTEAU, 1991). Muitos vegetais possuem misturas de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis (óleos essenciais), aos quais conferem aroma característico as suas folhas e apresentam reconhecidas propriedades como repelentes de insetos, além disso, os terpenos voláteis não só agem na diretamente na proteção, mas também atraem inimigos naturais de insetos herbívoros (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Em termos quantitativos, as diferenças mais expressivas observadas entre os meios MS/2 e MS/4 foram para o  $\beta$ -felandreno ( $6,99 \pm 0,02$  e  $10,46 \pm 2,51\%$ , respectivamente) e *E*-cariofileno ( $20,86 \pm 1,56\%$  e  $14,38 \pm 0,68\%$ ).

### 3.5 Aclimatização

A porcentagem de sobrevivência das plantas aclimatizadas foi de 90%. As plantas apresentaram-se vigorosas com um sistema radicular bem desenvolvido. Esses resultados indicam que, plântulas de *H. suaveolens* podem ser aclimatizadas sem uso de reguladores de crescimento, e que o substrato comercial Tropstrato HA é eficiente para o crescimento dessas (Figura 7).



Figura 7 Aclimatização de plântulas originadas de cultura de tecidos de *Hyptis suaveolens*. **a)** Plântulas com 45 dias *in vitro*; **b)** Plantas com 30 dias de aclimatização em casa de vegetação; **c)** Plantas após 90 dias de aclimatização em casa de vegetação. UFLA, Lavras, 2013

#### 4 CONCLUSÃO

É possível a micropropagação de *Hyptis suaveolens*. Os meios de cultura MS suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, e MS/2 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, são mais aptos a germinação de sementes *in vitro*. Indica-se para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Hyptis suaveolens* o meio MS/4 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, e para os segmentos apicais o meio MS/2 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. No entanto, as plantas mais homogêneas e vigorosas (menos frágeis) são produzidas com o segmento nodal e na orientação horizontal do explante.

Com o meio de cultura MS/2 houve melhores características de crescimento das plântulas; nesse mesmo meio e em MS/4 houve alterações químicas menos significativas da fração volátil em relação ao meio MS. Com isso podemos verificar que a concentração de sais do meio MS influencia a composição química qualitativa e quantitativa da fração volátil de folhas de plântulas de *H. suaveolens*.

Assim, como explantes inoculados *in vitro* na micropropagação de *Hyptis suaveolens*, o retorno de plântulas *in vitro* ao ambiente *ex vitro* também se mostrou eficiente. A aclimatização é eficaz usando o substrato tropstrato HA® em casa de vegetação.

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

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Illinois: Allures Publishinh Corporation, 2007.
- ASEKUN, O. T.; EKUNDAYO, O.; ADENIYI, B. A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. **Fitoterapia** Milano, v. 70, p. 440–442, 1999.
- AZEVEDO, N. R. et al. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Phytochemistry**, New York, v. 57, p. 733–736, 2001.
- AZEVEDO, N. R. et al. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, p. 205–216, 2002.
- BOTREL, P. P. **Micropropagação, teor e composição química volátil de Hyptis marruboides Epl. e atividade inseticida**. 2012. 118 p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BRAUN, H. et al. Germinação in vitro de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 539-546, jul./set. 2010.
- CASTRO, J. P. et al. *In vitro* germination and disinfestation of sweet cactus (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dyck). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 509-512, 2011.
- COLDEA, G. et al. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, p. 279–288, 2011.
- CONCEIÇÃO, H. E. O. **Cultivo in vitro, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em tímós (Derrissp)**. 2000. 191 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- CONSTABEL, F. Medicinal Plant Biotechnology. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 56, n. 5, p. 421-425, 1990.

CONTI, B. et al. Hyptis suaveolens and Hyptis spicigera (Lamiaceae) essential oils: qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against Sitophilus granarius (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae). **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 84, p. 219–228, 2011.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1931.

COSTA, M. A. P. C. et al. Morfogênese in vitro. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p.115-130.

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

DIAS, N. S.; BLANCO, F. F. **Efeitos dos sais no solo e na planta: manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010.

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

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

FRANZIN, S. M. et al. Obtenção de brotações aéreas in vitro de Rollinia salicifolia (SCHELCHT). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 131-133, jan./mar. 2004.

GALDIANO, R. F. et al. Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 583-592, mar./abr. 2013.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p. Part 1.

GERSHENZON. J. E.; CROTEAU, R. Terpenoides. In: Rosenthal, G.A. ; Berenbaum, M. R. (Ed.). **Herbivores: their interactions with secondary plant metabolities**. 2nd. ed. New York: Academic, 1991. p. 165-219.

GOLLE, D. P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* dc.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, jan./mar. 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p.183.

HARBONE, J. B. **Ecological biochemistry**. 4th. ed. London: Academic, 1993.

HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 110, p. 391-400, 2007.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. In: **Journal of Medicinal Plants Research**, Umuahia, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, Dec. 2009.

LIS-BALCHIM, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant oils against *Listeria monocitogenes*. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 82, p. 759-762. 1997.

LOPES, M. J. C. **Micropropagação *in vitro* da noqueira (*Juglans regia* L.) por rebentação axilar**. 2011. p.3. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica e Alimentar) - Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Castelo Branco, 2011.

MALELE, R. S. et al. Essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. From Tanzania: composition and antifungal activity. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, p. 438-440, 2003.

MANSUR, E. Cultura de tecidos aplicada a plantas medicinais. In: JORNADA FLUMINENSE DE PRODUTOS NATURAIS, 2., 2012, Arraial do Cabo. **Trabalhos apresentados...** Arraial do Cabo: Universidade Federal Fluminense, 2012.

MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1203-1209, 2006.

MISRA, T. N. et al. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*, part 1. spectral and biological studies on a triterpene acid. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 44, p. 6, 1981.

MONDELLO, F. et al. In vivo activity of terpine-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheele (tea tree) oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic human species. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 5, p. 158, 2006.

MOREIRA, A. C. P. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, p. 28-33, 2010.

MUKHERJEE, K. S.; MUKHERJEE, R. K.; GOSH, P. K. Chemistry of *Hyptis suaveolens*: a pentacyclic triterpene. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 47, n. 2, p. 377-378, Mar./Apr. 1984.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 15, p. 473-479, 1962.

NERY, M. C. et al. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (VAHL) NICH. **Cerne**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2008

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. **Topic detection and tracking evaluation**. 2008. Disponível em : <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em: 20 maio 2013.

OLIVEIRA, C. B. A. et al. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 33, p. 275-285, 2005.

PASTORE, J. F. B. et al. Phylogeny of the subtribe Hyptidinae (Lamiaceae tribe Ocimeae) as inferred from nuclear and plastid DNA. **Taxon**, Utrecht, v. 60, n. 5, p. 1317-1329, 2011.

PEERZADA, N. Chemical composition of the essential oil of *Hyptis Suaveolens*. **Molecules**, Basel, v. 2, p. 165-168, 1997.

PINTO, J. E. B. P. et al. Crescimento in vitro de hortelã-japonesa em função de diferentes concentrações de sais e de número e tipo de explante. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, v. 54, n. 3, p. 267-273, set./dez. 2011.

RANA, V. S. et al. Volatile constituents of *Hyptis suaveolens* flowering twig oil. **The International Journal of Aromatherapy**, Philadelphia, v. 14, p. 198–201, 2004.

REIS, E. S. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. in vitro sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, 2009.

ROSSI, Z. T. et al. Crescimento in vitro de hortelã-japonesa em função de diferentes concentrações de sais e de número e tipo de explante. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, v. 54, n. 3, p. 267-273, set./dez. 2011.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 91–120, 2000.

SAS INSTITUTE. **SAS statistical software**: release 9.2. Cary, 2008.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Integrated management of post harvest Fusarium rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, p. 246–254, 2008.

SILVA, R. C. P. et al. Efeito da composição de substratos no enraizamento de estacas de *Hyptis suaveolens*(L.). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 7, n. 2, p. 219-225, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 387-415.

SOARES, F. P. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1847 -1852, 2009. Especial.



SOARES, J. D. R. et al. Germinação de embriões e crescimento inicial in vitro de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 773-778, maio 2011.

SORACE, M. et al. Crescimento in vitro de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 775-782, out./dez. 2008.

SOUZA, A. V. et al. In vitro Propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): A Threatened Endemic Medicinal Plant. **Hortscience**, Alexandria, v. 42, n. 7, p. 1665-1669, 2007.

TAARIT, M. B. et al. Plant growth, essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) fruits cultivated under salt stress conditions. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 30, n. 3, p. 333-337, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenóides**. 2010. 57 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do sul, Caxias do Sul, 2010.

TRIPATI, A.; SHARMA, N.; SHARMA, V. In vitro efficacy of *Hyptis suaveolens* L. (Poir.) essential oil on growth and morphogenesis of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Massey) Snyder & Hansen. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 503-512, 2009.

UNEMOTO, L. K. et al. Propagação in vitro de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 2, p. 267-269, abr./jun. 2007.

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

VIJAYA, S. N. et al. Advancements in the Production of Secondary Metabolites. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 3, p. 112-123, 2010.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 272 p.

**ARTIGO 2**

**CRESCIMENTO VEGETATIVO E ANÁLISE DE CONSTITUINTES  
VOLÁTEIS *IN VITRO* DE *Hyptis suaveolens* (L.) POIT. :  
INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO, LUZ E  
DE DIFERENTES AMBIENTES**

**Helena Botelho de Andrade<sup>1</sup> Andreísa Flores Braga<sup>1</sup> Suzan Kelly Vilela  
Bertolucci<sup>1</sup> José Eduardo Brasil Pereira Pinto<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Setor de Plantas Mediciniais, Departamento de Agricultura, Universidade  
Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, CEP 37200-000  
Email: heleninhaba@yahoo.com.br

## RESUMO

O estabelecimento de um protocolo em cultura de tecidos envolve tanto fatores de ordem física como química a fim de melhorar o cultivo do explante. Portanto, objetivou-se estudar a influência de fatores químicos e físicos no crescimento e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *Hyptis suaveolens*. Dentre os fatores químicos foram avaliados primeiramente duas citocininas 0; 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup> para TDZ e BAP em interação com 0; 0,5 e 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Posteriormente, avaliou-se 0; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP em interação com 0 e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de AIA. Dentre os fatores físicos avaliou-se: densidades de fluxo de fótons (13; 28; 47 e 69 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) e qualidades espectrais da luz [azul, vermelho, amarelo, branco, verde, fluorescente com intensidade de 47 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, vermelho e azul (4:10), vermelho e azul (10:4) e vermelho e azul (7:7)]. Finalmente, avaliou-se a influência de diferentes ambientes na produção de constituintes voláteis (plântulas originadas de sementes cultivadas *in vitro* por 70 dias em meio MS com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, plântulas originadas de segmentos da casa de vegetação cultivadas *in vitro* em meio MS/4 com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose por 60 dias, plantas com 90 dias cultivadas em areia com fertirrigação em casa de vegetação e plantas cultivadas em canteiros com terra e irrigação). Observou-se um efeito negativo das citocininas e auxinas na formação de novos brotos. Plântulas cultivadas em 47 e 69 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> tiveram maior crescimento *in vitro*, mas a maior intensidade de luz inibiu a síntese de alguns compostos voláteis. A luz fluorescente causou maior inibição na produção de constituintes voláteis e no crescimento vegetativo. LEDs azul, vermelha, branca ou combinações de vermelha com azul incrementaram variáveis de crescimento. A produção de constituintes voláteis é altamente influenciada pelo tipo de ambiente de cultivo e de material propagativo.

Palavras-chave: Fração volátil. Citocininas. Auxinas. Densidades de fluxo de fótons e qualidades espectrais.

### ABSTRACT

The establishment of a tissue culture protocol involves both physical and chemical factors in order to improve the explant cultivation. Therefore, aimed to study the influence of chemical and physical factors in the growth and production of volatile constituents *in vitro* *Hyptis suaveolens*. Among the chemical factors were assessed firstly two cytokinins 0; 1 and 2 mg.L<sup>-1</sup> for TDZ and BAP in interacting with 0; 0.5 and 1 mg.L<sup>-1</sup> of NAA. Subsequently, it was evaluated 0; 0.05; 0.1; 0.2 and 0.4 mg.L<sup>-1</sup> of BAP in interaction with 0 and 0.25 mg.L<sup>-1</sup> of IAA. Among the physical factors were evaluated: photon flux densities (13; 28; 47 and 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) and spectral qualities of light [blue, red, yellow, white, green, fluorescent with intensity of 47  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , red and blue (4:10), red and blue (10:4) and red and blue (7:7)]. Finally, it was evaluated the influence of different environments on the production of volatile constituents (seedlings originated from seeds grown *in vitro* for 70 days on means MS with 15 g.L<sup>-1</sup> sucrose, seedlings originated from segments of greenhouse grown *in vitro* in means MS/4 with 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose for 60 days, with 90 days grown in sand with fertigation at greenhouse and plants grown in raised beds with soil and irrigation). There was a negative effect of cytokinin and auxin in the formation of new shoots. Seedlings grown at 47 and 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  had a higher growth *in vitro*, but the higher light intensity inhibited the synthesis of some volatile compounds. The fluorescent light caused greater inhibition in the production of volatile constituents and in the vegetative growth. LEDs blue, red, white or combinations of red with blue increment growth variables. The production of volatile constituents is highly influenced by the type of growing environment and propagation material.

Keywords: Volatile fraction. Cytokinins. Auxins. Photon flux densities and spectral qualities.

## 1 INTRODUÇÃO

*Hyptis suaveolens*, planta considerada invasora principalmente de lavouras de milho, possui alto potencial terapêutico. Sendo usada para o tratamento de doenças respiratórias, antiespasmódicas, sudoríferas e gota (LORENZI; MATOS, 2002).

O óleo dessa planta, que é constituído principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos (SILVA et al., 2003) tem sido muito estudado, devido principalmente, as suas propriedades fungicidas (JAYA; DUBEY, 2011; MOREIRA et al., 2010; SHARMA; TRIPATHI, 2008; TRIPATHI; SHARMA; SHARMA, 2009). Há uma elevada variabilidade na composição e no teor do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (MARTINS; SANTOS; POLO, 2006), sendo a variabilidade genética intraespecífica, as condições ambientais, as épocas de colheita, as condições de cultivo, o tipo de solo, a parte da planta utilizada, alguns dos principais fatores que a implicam (HAY; SVOBODA, 1993).

A técnica da cultura de tecidos de plantas é considerada eficaz na propagação de várias espécies, permitindo o crescimento de células, tecidos e órgãos isolados da planta-mãe, em condições assépticas e controlada. Constitui um promissor instrumento para o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam formas alternativas para a produção de mudas, conservação e melhoramento do material genético (ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000).

Os principais tipos de reguladores de crescimento, com efeito sobre a micropropagação, são as citocininas e auxinas (GONZALEZ, 1998) em que as concentrações são fatores determinantes para o crescimento da planta *in vitro*. As citocininas são utilizadas para estimular a divisão celular, atuando dessa forma na morfogênese. A 6-benzilaminopurina (BAP) a mais utilizada e a mais efetiva para um grande número de cultivares. O tidiazuron (TDZ) (N-fenil-N'-

1,2,3-tiadiazol-5-il-ureia) possui alta atividade de citocinina em cultivos *in vitro*, quando utilizado em pequenas concentrações (MOK et al., 1982).

As auxinas têm em comum a capacidade de atuar na expansão e alongamento celulares, ajudando também na divisão celular na cultura de tecidos (KRIKORIAN, 1991). O AIA, ANA e o AIB são as auxinas mais utilizadas (ZIMMERMAN; BROOME, 1981), sendo geralmente adicionadas no meio de cultura em baixas concentrações (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

Além de fatores químicos, há a necessidade de controlar também os físicos para um melhor cultivo *in vitro*. A luz é de fundamental importância para as plantas, tanto para o processo de regulação de seu crescimento e desenvolvimento vegetativo, quanto para o reprodutivo. As respostas morfofisiológicas das plantas não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas também da variação em qualidade luminosa (LARCHER, 2004).

Portanto, objetivou-se estudar fatores químicos (concentrações de citocininas e auxinas) e físicos (diferentes ambientes, densidades de fluxo de fótons e qualidade espectral da luz) no cultivo e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *Hyptis suaveolens*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, Brasil. Exsiccatas foram depositadas no herbário ESAL da Universidade Federal de Lavras, sob o registro 20475; e também no herbário da Universidade de São Paulo (SPF), sob o nome de coleta Andrade 1 (SPF), (Anexo A), onde o nome da planta está atualizado conforme estudo de Pastore et al. (2011).

Segmentos nodais de *H. suaveolens* foram coletados de plantas cultivadas em canteiro com areia, em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da UFLA, esses com areia lavada, empregando um sistema de fertirrigação uma vez ao dia. A solução nutritiva empregada continha as seguintes fontes e concentrações dos sais puros ( $\text{mg.L}^{-1}$ ):  $\text{CaNO}_3$ : 760;  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ : 225;  $\text{KCl}$ : 400;  $\text{MgSO}_4$ : 375; Tenso Ferro<sup>®</sup>: 44;  $\text{Mn SO}_4$ : 6,72;  $\text{HBO}_3$ : 3,28;  $\text{ZnSO}_3$ : 0,56;  $\text{CuSO}_4$ : 0,36;  $\text{NaMo}_4$ : 0,05 e Mono amônio fosfato (MAP): 110. A casa de vegetação, situada nas coordenadas geográficas 21° 14' S e 45° 00' W, a 918 m de altitude.

Os segmentos nodais foram desinfestados e inoculados em meio MS/4 suplementado com 30 g/L de sacarose, e posteriormente, repicados para o meio MS/2 suplementado com 30g/L de sacarose. Os segmentos nodais dos experimentos que avaliaram os fatores químicos (concentrações de citocininas e auxinas) e físicos (intensidade e qualidade espectral da luz) foram oriundos de plântulas multiplicadas no meio MS/2 com 30g/L de sacarose.

Para os experimentos que avaliaram os fatores químicos, após a inoculação, foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de  $25 \pm 2$  °C e intensidade luminosa de  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Para a determinação das biomassas secas, o material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C, até peso constante. Posteriormente, o material vegetal desidratado foi pesado, em balança analítica e as biomassas secas foram expressas em miligramas (mg).

### **2.1 Efeito de citocinina e auxina no cultivo *in vitro* de *H. suaveolens***

Segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento, foram inoculados horizontalmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura MS/2 suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e de diferentes concentrações de reguladores de crescimento. O pH foi aferido para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem.

Utilizou-se ANA (ácido naftalenoacético) em interação com BAP (6-benzilaminopurina) em um experimento para segmentos apicais, e outro para segmentos nodais. Para o ANA avaliaram-se as concentrações de 0; 0,5 e 1,00 mg.L<sup>-1</sup> e para o BAP 0; 1,00 e 2,00 mg.L<sup>-1</sup>. As mesmas condições foram realizadas para os experimentos com ANA e TDZ.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado constituído de dezesseis repetições. As variáveis de respostas avaliadas aos 30 dias foram: número de brotações; biomassas seca de brotações e calos (mg) e porcentagens de calos e brotações. Os dados do experimento TDZxANA com o segmento apical foram transformados para as variáveis: número de brotações  $(x+0,5)^{-3}$  e biomassa seca de brotação  $(x+0,5)^{-1,4}$ ; com o segmento nodal: número de brotações e biomassa seca de brotos com  $(x+0,5)^{-2}$ . Já no experimento BAPxANA com o segmento nodal, utilizou-se as transformações  $(x+0,5)^{-2}$  para o número de brotos e  $(x+0,5)^{-2,9}$  para a biomassa seca de brotos. Sendo x o número obtido.



No último experimento, avaliou-se a interação de AIA (ácido indolacético) e BAP. Para o AIA avaliou-se as concentrações de 0 e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> e para o BAP 0; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 mg.L<sup>-1</sup>. O meio básico utilizado foi o mesmo empregado para os experimentos anteriores, utilizando-se nesse apenas os segmentos nodais como explantes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado constituído de cinco repetições, com dois tubos de ensaio contendo um explante por tubo. As variáveis de respostas avaliadas aos 30 dias foram número e comprimento das brotações (cm); biomassa seca de brotações, calos e raízes (mg), e porcentagens de calos e brotações.

## **2.2 Avaliação das densidades de fluxo de fótons na regeneração de segmentos de *H. suaveolens***

O efeito das condições de luminosidade foi avaliado em dois experimentos, um utilizando segmentos nodais e o outro, apicais de plântulas com 40 dias de cultivo *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL do meio de cultura MS/2, contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, acrescido de 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e o pH aferido em  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem.

Após inoculação, o material foi levado para sala de crescimento e mantido nas seguintes densidades de fluxo de fótons: 13; 28; 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , oriundas de lâmpadas fluorescentes brancas. Aos 30 dias avaliou-se o número e o comprimento das brotações, as biomassas seca da parte aérea, do caule, raízes e total e análise química dos constituintes voláteis, a partir de 25 mg das folhas secas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quinze repetições contendo um explante por tubo. As variáveis respostas foram transformadas em  $(x+0,5)$ , onde x é o número obtido.

### 2.3 Avaliação das condições de qualidade de luz na regeneração de segmentos nodais de *H. suaveolens*

O efeito da qualidade espectral da luz foi avaliado utilizando-se segmentos nodais de plântulas com 50 dias de cultivo *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL do meio de cultura MS/2, contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, acrescido de 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e o pH aferido em 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem.

Após inoculação, o material foi mantido na sala de crescimento sob luzes fluorescentes, com intensidade de 47 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e LEDs (*Light Emitting Diode*) azul, vermelha, amarela, branca, verde, e nas combinações de azul:vermelha (4:10), (10:4) e (7:7). As Figuras (8 e 9) a seguir representam os espectros dos tratamentos.

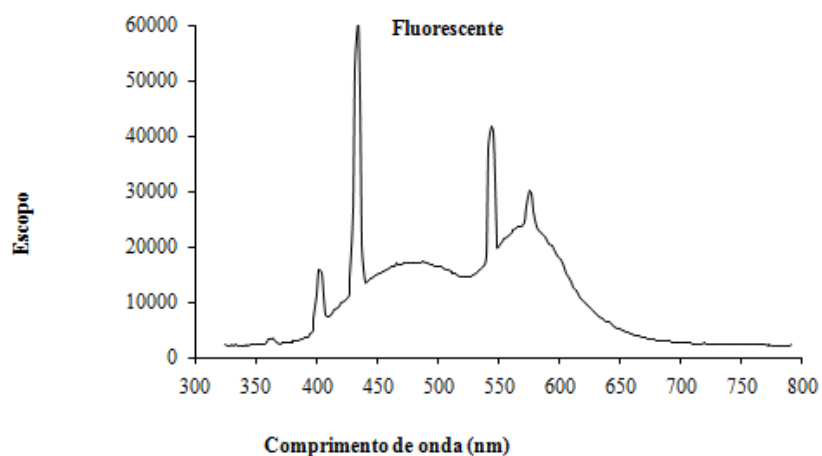


Figura 8 Espectro da luz fluorescente utilizada nas condições de qualidade de luz na regeneração de segmentos nodais de *H. suaveolens*. UFLA, Lavras, 2013

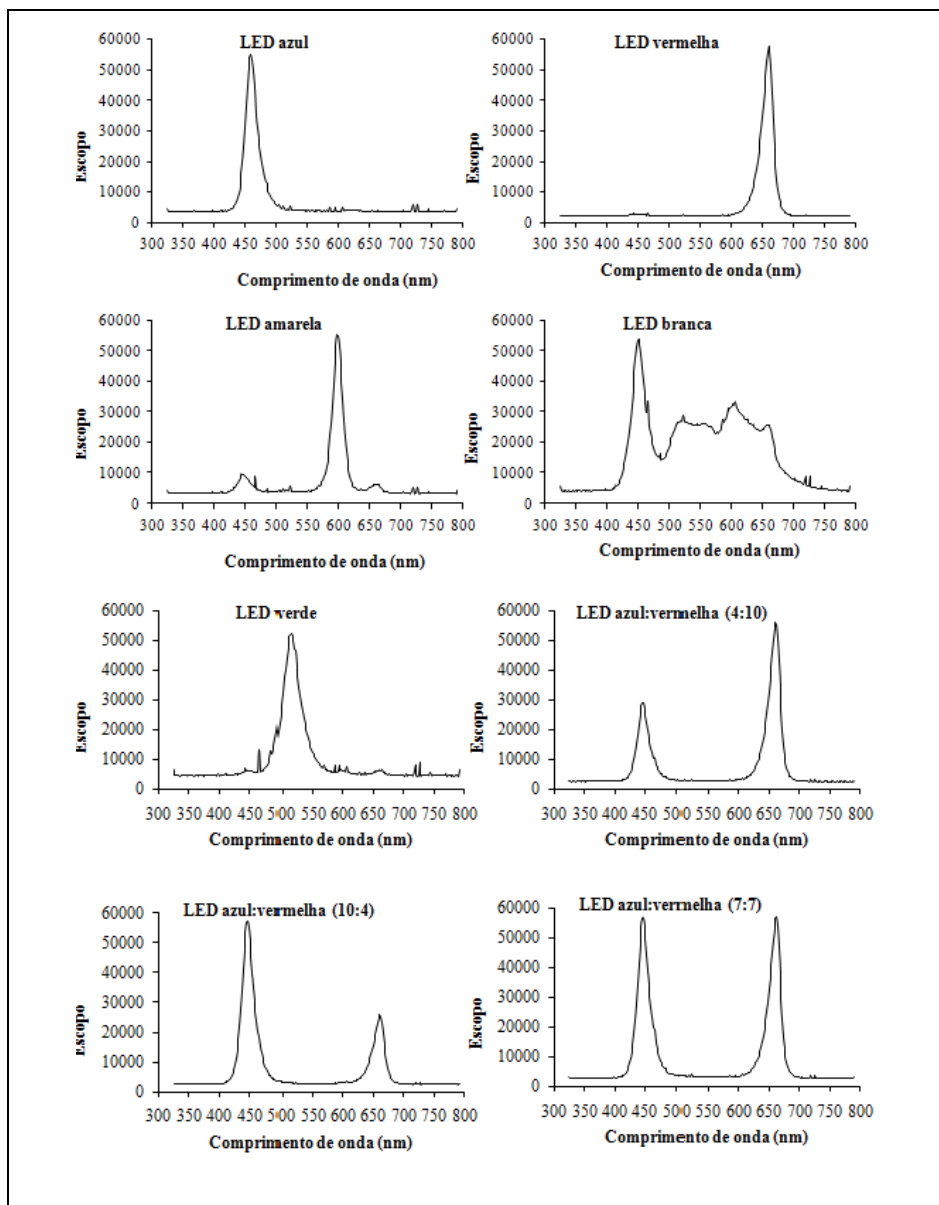


Figura 9 Espectros das diferentes LEDs (*Light Emitting Diode*) utilizadas nas condições de qualidade de luz na regeneração de segmentos nodais de *H. suaveolens*. UFLA, Lavras, 2013

Aos 35 dias avaliou-se o número e o comprimento das brotações, o número de folhas, as biomassas seca das folhas, dos caules e das raízes e análise química dos constituintes voláteis, a partir de 38 mg das folhas secas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições contendo três tubos de ensaio com um explante por tubo.

#### **2.4 Análise de constituintes voláteis de *H. suaveolens* em diferentes condições de cultivo**

Analisou-se neste experimento os constituintes voláteis presentes em quatro condições de cultivo de *H. suaveolens*: 1- plântulas cultivadas *in vitro* por 70 dias em meio MS com 15 g/L de sacarose originadas de sementes; 2- plântulas cultivadas *in vitro* em meio MS/4 com 30 g/L de sacarose por 60 dias originadas de segmentos nodais da casa de vegetação; 3- plantas com 90 dias cultivadas em areia com fertirrigação em casa de vegetação; e, 4- plantas cultivadas no Horto Medicinal da UFLA.

Folhas de *H. suaveolens* foram coletadas de sete indivíduos, as quais foram reunidas e secas. Após a secagem, o material foi misturado e coletado uma amostra composta. O material foi analisado em triplicata, a partir de 100 mg de folhas secas de cada localidade.

#### **2.5 Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados ao teste de Tukey Kramer a 5% quando houve interações entre os fatores; para os fatores principais; ao teste de Duncam a 5% de probabilidade em relação aos fatores principais, exceto para os experimentos de intensidade e qualidade de luz que foram avaliados pelo teste de Tukey a 5%. O programa estatístico SAS versão 9,2 (SAS INSTITUTE, 2008) foi utilizado para o processamento dos dados.

## 2.6 Análise da fração volátil por HS-CG/EM

Amostras de folhas de *H. suaveolens* foram coletadas de plântulas aos 30 dias de cultivo *in vitro* no experimento de condições de luz; aos 35 dias de cultivo *in vitro* para o experimento de qualidades de luz; e no experimento de condições de cultivo: plântulas cultivadas *in vitro* por 70 dias (MS com 15 g/L de sacarose originadas de sementes), plântulas cultivadas *in vitro* por 60 dias (originadas de gemas e em meio MS/4 com 30 g/L de sacarose), plantas com 90 dias (fertilirrigação em casa de vegetação) e, plantas com 90 dias cultivadas em canteiros. As amostras foram secas em estufa de circulação de ar a 39°C.

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA. Para extração da fração volátil de *H. suaveolens* empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland)* acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 100 °C durante 30 min, temperatura de seringa a 110 °C. Foram utilizadas 38 mg de folhas secas, em triplicata, no experimento de qualidade de luz; 25 mg em duplicata no experimento de condições de luz e 100 mg em quadruplicata no experimento de ambientes. Essas foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica. A fração volátil foi analisada em um sistema de cromatografia em fase gasosa *Agilent® 7890A* acoplado a um detector seletivo de massas *Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA)*, operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e da linha de transferência para o MS foram mantidas em 230 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 220 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 250 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:10. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram expressas pela porcentagem de área relativa do cromatograma total de íons.

Os constituintes da fração volátil foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20, *Sigma-Aldrich*®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST SPEECH GROUP WEBSITE, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van den Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito de citocinina e auxina no cultivo *in vitro* de *H. suaveolens*

A) Interação entre BAP x ANA na multiplicação de brotos em segmentos nodais e apicais de *H. suaveolens*.

Na Tabela 9 verifica-se que independente do explante (nodal ou apical) observou-se a formação de calos em todos os tratamentos suplementados com ANA e BAP. No entanto, nos segmentos nodais a formação de calos foi mais pronunciada, pois esses explantes apresentaram 93% a 100% de formação de calos. Observou-se também que na presença de BAP em qualquer concentração avaliada, mesmo na ausência da auxina, houve 100% de formação de calos no segmento nodal e entre 93% a 100% no apical. Na regeneração de melão (*Cucumis melo*) cv. Gaúcho, o aumento da permanência dos explantes cotiledonares nos meios de germinação e as elevadas concentrações de BAP nos meios de regeneração diminuíram a capacidade organogênica dos explantes e incrementaram a formação de calos (PINHO et al., 2010).

Tabela 10 Porcentagem de calos (%C), porcentagem de brotos (%B), número de brotos (NB), biomassa seca de brotos (BSB-mg), biomassa seca de calos (BSC-mg) de plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro* com 30 dias de cultivo, em função de concentrações de BAP e ANA. UFLA, Lavras, 2013

BAP (mg/L)	0,0 mg/L ANA									
	%C		%B		NB		BSB		BSC	
	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A
0	0	0	100	100	1,0 a	1,0 a	14,5 a	9,2 ab	0 c	0 c
1	100	100	0	69	0 c	1,0 a	0 c	7,5 ab	63,8 b	63,8 a
2	100	93	40	60	0,8 b	0,7 ab	4,7 b	6,1 b	79,2ab	42,9 b
0,5 mg/L ANA										
0	93	33	14	100	0,2 bc	1,0 a	2,1 bc	12,4 a	22,2 c	5,4 c
1	100	100	0	44	0 c	0,4 ab	0 c	2,2 bc	72,5ab	58,3 b
2	100	100	0	20	0 c	0,2 b	0 c	1,7 bc	82,4 a	72,0 a
1,0 mg/L ANA										
0	93	56	14	55	0,1 bc	0,6 ab	0,3 bc	5,9 bc	19,9 c	11,4c
1	100	100	0	7	0 c	0,1 b	0 c	0,1 c	51,5 b	80,1 a
2	100	100	0	53	0 c	0,5 ab	0 c	3,6 bc	53,7 b	58,3 b

N: nodal; A: apical; As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey Kramer, a 5 % de significância; <sup>a</sup> Variáveis respostas transformadas. NB nodal:  $(x+0,5)^{-2}$ . BSB nodal:  $(x+0,5)^{-2,9}$ . Sendo o x o número obtido.

Segundo Pereira et al. (2012), a utilização combinada de BAP e ANA em segmentos foliares de *Hyptis leucocephala* induziu calos compactos e indiferenciados; verificando-se uma elevada porcentagem de formação de calos, com mais 60% de indução nos meios de cultura suplementados com ANA e mais de 80% de indução nos meios de cultura suplementados com concentrações superiores a 1,98 mg.L<sup>-1</sup> de BAP na presença de ANA. Sendo a maior taxa de calogênese e de crescimento dos calos obtidas com a utilização combinada de 1,98 e 4,84 mg.L<sup>-1</sup> desses reguladores, respectivamente.



Em relação à biomassa seca de calos, as maiores médias foram observadas com a suplementação de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e nas interações de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (72,46 e 82,42 mg, respectivamente) nos segmentos nodais. Para os segmentos apicais, as maiores biomassas secas de calos foram nos tratamentos com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (63,78 mg), 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (72,05 mg) e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (80,12 mg). Independente da origem do explante, os calos apresentaram aspecto compacto (ausência de desagregação), coloração esverdeada ou marrom e com presença de pequenas raízes.

Já a máxima produção de brotos ocorreu na ausência de ambos reguladores para os segmentos nodais e apicais e nos segmentos apicais suplementados com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Consequentemente, os maiores acúmulos de biomassa seca de brotações também foram observados nesses tratamentos, embora o tratamento com 1,0 mg/L de BAP não tenha apresentado diferença estatística significativa para essa variável. As maiores médias de número de brotações também foram na ausência de reguladores de crescimento.

Esses resultados indicam que essa espécie não necessita de suplementação de reguladores de crescimento para a multiplicação *in vitro*. Em oposição ao presente estudo, na regeneração *in vitro* de mesocótilos de arroz (*Oryza sativa*) conforme se aumentou as concentrações do regulador de crescimento BAP, houve um incremento na regeneração de brotações (REY et al., 2009).

Em estudos conduzidos por Veloz, Taketa e Villarreal (2013) com reguladores de crescimento em segmentos nodais de *Hyptis suaveolens* alguns tratamentos suplementados com 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> de ANA em interação com cinetina (0,06; 0,2 e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) ou BAP (0,06 e 0,2 mg.L<sup>-1</sup>), os explantes mostraram protuberâncias dentro de uma semana em cultura, e depois de 13 dias, calos apareceram com três variações: 1) o desenvolvimento de calos e raízes; 2) o

desenvolvimento de brotos com raízes e a presença de calos; e, 3) a presença de calos e brotos, havendo a desfolha desses durante a primeira semana. Já, os tratamentos com citocinina (cinetina ou BAP) na ausência de ANA, não desenvolveram raízes, mas exibiram a presença de novos brotos.

B) Interação TDZ x ANA na multiplicação de brotos em segmentos nodais e apicais de *H. suaveolens*

Os resultados da interação TDZ x ANA são representados na Tabela 10 e foram similares àqueles observados na interação BAP x ANA, discutidos no item anterior. Observou-se que os reguladores de crescimento induziram a formação de calos ao invés de brotos. A ausência de calos foi observada apenas nos tratamentos isentos de reguladores de crescimento para ambos explantes (segmentos nodal e apical) e naqueles suplementados com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA para o segmento apical (Tabela 10). Os calos apresentaram aspecto compacto (ausência de desagregação), coloração esverdeada ou marrom e presença de pequenas raízes.

Tabela 11 Porcentagem de calos (%C), porcentagem de brotos (%B), número de brotos (NB), biomassa seca de brotos (BSB-mg), biomassa seca de calos (BSC-mg) de plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro* com 30 dias de cultivo, em função de concentrações de TDZ e ANA. UFLA, Lavras, 2013

TDZ (mg/L)	0,0 mg/L ANA									
	%C		%B		NB		BSB		BSC	
	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A
0	0	0	100	100	1,6a	1,0a	14,9 <sup>a</sup>	14,3a	0c	0c
1	100	100	22	30	0,3bc	0,3bc	1,6bc	4,5bc	41,4bc	48,4b
2	100	92	0	42	0c	0,4b	0c	7,6b	58,0b	45,7b
0,5 mg/L ANA										
0	100	0	18	100	0,2bc	1,7a	1,1bc	10,8a	27,0c	8,4c
1	100	100	6	0	0,1bc	0c	1,0bc	0c	59,5b	68,1ab
2	100	100	0	0	0c	0c	0c	0c	84,2a	70,9a
1,0 mg/L ANA										
0	86	20	43	80	0,6b	0,7ab	3,6b	9,5ab	23,4c	0c
1	100	100	0	0	0c	0c	0c	0c	59,9b	80,7a
2	100	100	0	0	0c	0c	0c	0c	59,8b	77,7a
CV	-	-	-	-	26	30	29	32	31	28

N: nodal; A:apical; As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey Kramer, a 5 % de significância. <sup>a</sup> Variáveis resposta transformadas. NB apical:  $(x+0,5)^{-3}$ . BSB apical:  $(x+0,5)^{-1/4}$ . NB e BSB nodal:  $(x+0,5)^{-2}$

Veloz, Taketa e Villarreal (2013), em cultivo de raízes de *Hyptis suaveolens in vitro*, observou que a presença de reguladores de crescimento induziu o crescimento de calos conjuntamente com raízes, e em três linhagens de células de calos houve acúmulo de podofilotoxina, uma substância usada topicamente no tratamento de verrugas genitais causadas pelo vírus causador do papiloma humano, em concentrações de 0,003, 0,005 e 0,006% (peso seco), quando ANA foi combinada com cinetina ou BAP.

Para o segmento nodal a maior biomassa seca de calos foi observada na interação de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Nos segmentos apicais os tratamentos com interação de ANA e BAP, independente das concentrações apresentaram os maiores acúmulos de biomassa seca de calos.

Corroborando com os resultados observados na interação BAP x ANA (item anterior), também foi observado o maior percentual, número e biomassa seca de brotos nos tratamentos isentos de ambos reguladores para os segmentos nodais e apicais e nos segmentos apicais suplementados com 0,5 mg/L de ANA. Portanto, os resultados indicam que a suplementação de reguladores de crescimento, especialmente de citocininas, não favorecem o crescimento e desenvolvimento de brotações *in vitro*.

#### C) Interação BAP x AIA em segmentos nodais

Neste experimento tentou-se induzir a produção de múltiplos brotos com a diminuição da concentração de reguladores de crescimento, e a substituição do ANA pelo AIA. No entanto, como observado nos experimentos anteriores, a presença de reguladores induziu a formação de 60 a 100% de calos, exceto na suplementação de 0,25 mg/L de AIA (Tabela 11).

Tabela 12 Porcentagem de calos (%C), porcentagem de brotos (%B), número de brotos (NB), biomassa seca de brotos (BSB-mg), biomassa seca de calos (BSC-mg) de plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro* com 30 dias de cultivo, em função de concentrações de BAP e AIA. UFLA, Lavras, 2013

BAP (mg/L)	0,00 mg/L AIA			
	%C	%B	BSB	BSC
0	0	100	12,4 ab	0,0 c
0,05	80	100	17,6 a	5,9 bc
0,1	60	100	11,6 ab	2,8 c
0,2	100	100	13,0 ab	6,4 bc
0,4	100	100	7,6 bc	20,7 a
0,25 mg/L AIA				
0	0	100	10,9 b	0,0 c
0,05	100	100	9,1 bc	4,9 bc
0,1	100	100	10,7 b	11,2 b
0,2	100	80	2,9 c	16,1 ab
0,4	100	100	3,7 c	23,3 a
CV	-	-	29	40

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey Kramer, a 5 % de significância.

O explante já possui provavelmente um alto teor endógeno de auxina, possivelmente a presença exógena dela induziu a formação de calos. As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e o alongamento celular e as citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical, sendo que o balanço entre esses dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de células, tecidos e órgãos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os calos induzidos nas combinações de BAP e AIA apresentaram consistência friável (presença de desagregação) e coloração amarelada. Isso pode ser devido à menor concentração utilizada para os reguladores de crescimento. O calo é um aglomerado de células e tecidos formado pela intensa divisão das células do explante. O tipo de calo formado em um determinado

genótipo, seu grau de diferenciação celular e o seu potencial embriogênico dependem, sobretudo, do tipo de explante e do meio de cultura utilizado (PEREIRA et al., 2012). A friabilidade seria uma característica importante para obtenção de embriões somáticos, sendo bastante correlacionada à espécie e ao tipo de explante Santos et al. (2008).

Os calos com maior biomassa seca foram aqueles cultivados nas maiores concentrações de BAP, caracterizado pelos tratamentos com  $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP (20,70 mg) e na interação de 0,2 e  $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$  da citocinina com  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA (16,07 e 23,35 mg, respectivamente).

Com exceção do tratamento que interagiu  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP com  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA que apresentou porcentagem de 80% de brotos, os demais apresentaram 100%. No entanto, verificou-se que o AIA inibiu o número de brotos, com média de 1,34 em  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA e 1,65 na ausência deste, já a citocinina não influenciou essa variável de resposta.

O acúmulo de biomassa seca de brotações foi menor nos tratamentos com presença de AIA e na maior concentração de BAP ( $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ ). As maiores médias foram verificadas em 0; 0,05; 0,1 e  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP, os quais apresentaram biomassas secas de 12,4; 17,6; 11,6 e 13,0 mg, respectivamente (Tabela 11).

Em todas as interações de auxinas e citocininas avaliadas, notou-se que os reguladores de crescimento influenciaram a indução de calos e não a de brotos (Figura 10 e 11). A menor concentração de regulador utilizada e o uso da auxina AIA influenciaram maior presença de brotações, mas ainda assim não houve uma taxa de multiplicação eficiente.

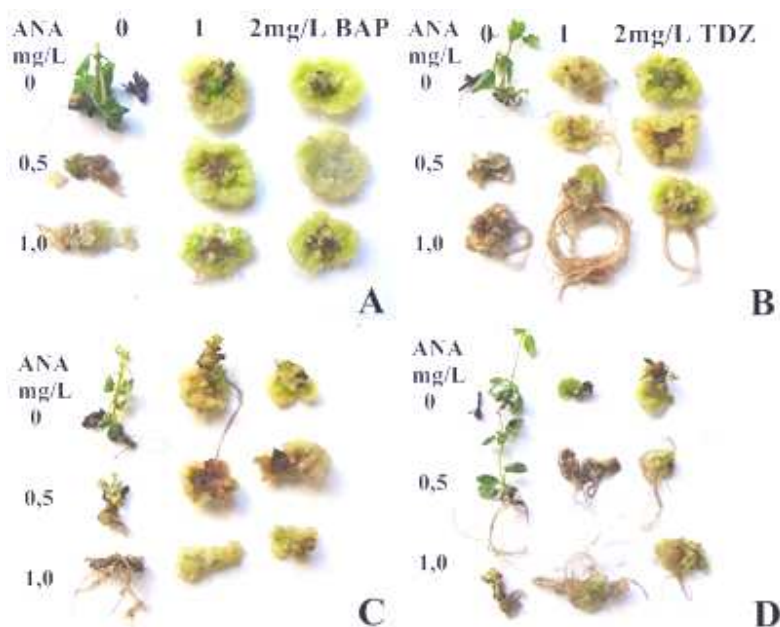


Figura 10 Influência da interação dos reguladores de crescimento (BAP, TDZ e ANA) nos segmentos de *Hyptis suaveolens in vitro*. **a)** Interação de BAP e ANA em segmentos nodais; **b)** Interação de TDZ e ANA em segmentos nodais; **c)** Interação de BAP e ANA em segmentos apicais e **d)** Interação de TDZ e ANA em segmentos apicais. UFLA, Lavras, 2013



Figura 11 Efeito da interação de reguladores de crescimento (BAPxAIA) no crescimento de segmento nodal de *Hyptis suaveolens* *in vitro*. UFLA, Lavras, 2013

Na repicagem de uma plântula de *Hyptis suaveolens* cultivada *in vitro* em meio MS/2 com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, regenera-se de 3 a 4 plântulas a partir de segmentos nodais. Devido a isso, a repicagem é mais indicada para a multiplicação das plântulas que os reguladores de crescimento avaliados.

Certos tecidos sintetizam as quantidades de hormônios que necessitam, outros são totalmente dependentes da aplicação endógena (PINTO; PASQUAL, 1990). Uma das grandes vantagens da não necessidade do uso de reguladores de crescimento, é que esses podem ocasionar variação somaclonal nas plântulas.



Este trabalho teve o intuito de propor um método, empregando a organogênese direta, para a multiplicação *in vitro* de *H. suaveolens*. Porém, devido à produção de calos friáveis em baixas concentrações de reguladores de crescimento, sugere-se que em próximos estudos, a organogênese indireta, como a embriogênese somática sejam avaliados. Além de que na cultura de tecidos é importante estabelecer eficientes protocolos de regeneração, tanto envolvendo embriogênese como organogênese (REY et al., 2009). A embriogênese somática indireta tem sido preconizada como uma via adequada para a multiplicação *in vitro*, pois possibilita elevada taxa de multiplicação. Entretanto, a obtenção de calos, fase preliminar para obter os embriões somáticos, representa uma etapa crucial a ser ajustada (PEREIRA et al., 2012). Um menor tempo de exposição (tempo de choque) do explante no meio com regulador de crescimento também poderiam ser avaliados. Em estudos com a regeneração *in vitro* de melão (*Cucumis melo*), cv. 'Gaúcho', o aumento do período de permanência das sementes nos meios germinativos, além de induzir menor regeneração dos explantes, determinou uma sensibilidade menor destes às concentrações de BAP empregadas nos meios regenerativos (PINHO et al., 2010).

### **3.2 Avaliação das densidades de fluxo de fótons na regeneração de segmentos de *H. suaveolens***

Avaliou-se neste trabalho a regeneração *in vitro* e a análise da fração volátil de *Hyptis suaveolens*. Para uma melhor compreensão dividiu-se os resultados em subitens.

#### **3.2.1 Regeneração *in vitro***

As plântulas de *H. suaveolens* tanto originadas de segmentos apicais quanto laterais sofreram influência das diferentes densidades de fluxo de fótons.

A porcentagem de sobrevivência das plantas foi maior nas intensidades mais altas (47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) para os dois tipos de segmentos, com médias em torno de 80 a 87% (Tabela 12).

Tabela 13 Número de brotos (NB), comprimento do broto principal (CBP-cm), biomassa seca do caule (BSC-mg), biomassa seca de folhas (BSF-mg), biomassa seca de raízes (BSR-mg), biomassa seca total (BST-mg), e porcentagem de sobrevivência (%S) de plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro*, com 30 dias de cultivo, em função da densidade do fluxo de fótons (D). UFLA, Lavras, 2013

D ( $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	NB <sup>a</sup>	CBP <sup>a</sup>	BSC <sup>a</sup>	BSF <sup>a</sup>	BSR <sup>a</sup>	BST <sup>a</sup>	%S
<b>Segmento Apical</b>							
<b>13</b>	0,8 b	1,1 b	2,6 b	3,9 c	0,7 b	8,1 c	33
<b>28</b>	1,3 ab	2,8 a	5,1 ab	6,8 bc	1,0 b	11,9 bc	60
<b>47</b>	1,9 a	2,9 a	7,5 a	12,1 ab	1,4 b	20,1 ab	87
<b>69</b>	1,9 a	3,0 a	7,8 a	15,7 a	4,3 a	26,9 a	87
<b>Segmento Nodal</b>							
<b>13</b>	1,2 b	1,8 b	3,7 b	4,9 b	0,8 b	8,6 b	40
<b>28</b>	1,0 b	1,5 b	4,3 b	4,9 b	0,7 b	8,9 b	53
<b>47</b>	2,2 a	3,9 a	10,9 a	15,2 a	5,9 a	31,1 a	87
<b>69</b>	2,2 a	3,1 ab	8,4 ab	14,5 a	5,5 a	27,4 a	80

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de significância. <sup>a</sup> Variáveis transformadas em (x+0,5), onde x é o número obtido.

Conforme Donnelly e Vidaver (1984), com o aumento da irradiância ocorre uma rápida expansão de folhas novas com características autotróficas, potencializando a melhoria das taxas de sobrevivência. Contudo, devido às condições *in vitro*, como alta umidade relativa, baixa radiação fotossinteticamente ativa e o meio de crescimento com carboidratos como fonte de energia, as folhas formadas teoricamente poderiam não obter competência fotossintética (YOON et al., 2009).

A luz no ponto de vista de irradiância é importante para a fotossíntese, que é a energia utilizada na síntese de compostos carbonados (TAIZ; ZEIGER, 2009), para o crescimento e desenvolvimento das plântulas (autotrofia).

As maiores densidades de fluxo de fótons em ambos os segmentos resultaram em maiores números e comprimento de brotos; biomassa seca de caules, folhas, raízes e total (Tabela 12 e Figura 12). Esse resultado corrobora com Mishra et al. (2011), que relatam que essa espécie é distribuída nas regiões tropicais, não sendo comumente encontrada nas regiões subtropicais.

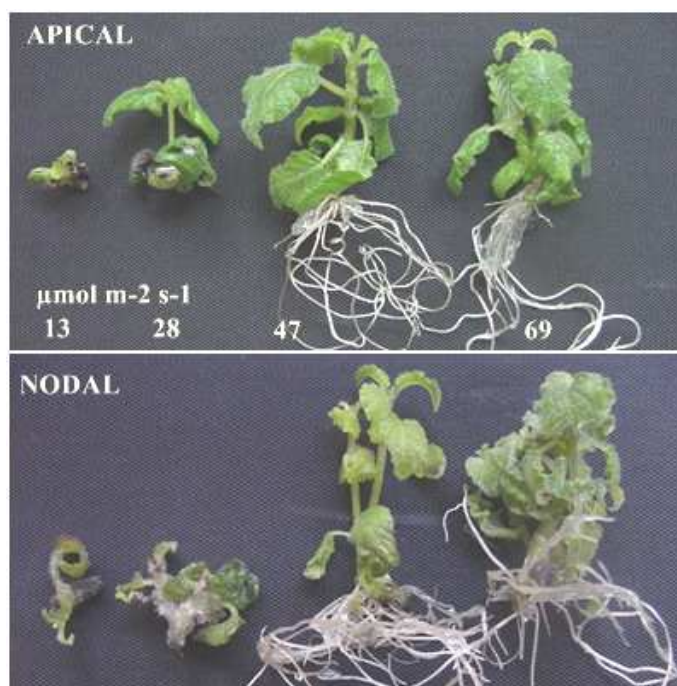


Figura 12 Influência da densidade de fluxo de fótons ( $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) em plântulas de *Hyptis suaveolens* *in vitro* oriundas de segmentos apicais e nodais. UFLA, Lavras, 2013

Observou-se que nos segmentos apicais a maior intensidade de luz influenciou para um maior crescimento da plântula. O resultado dos segmentos

nodais foram os mesmos, exceto para o comprimento da brotação principal e a biomassa seca do caule que decaíram na maior intensidade de luz em relação a anterior, no entanto apesar de não haver diferença estatística observa-se que nesse segmento houve uma tendência de menores médias para maior irradiância. A biossíntese da auxina AIA está associada aos tecidos com rápida divisão celular e crescimento, especialmente nas partes aéreas (TAIZ; ZEIGER, 2009); Darwin descobriu em seus estudos o fenômeno de fototropismo, que é o crescimento da plântula em direção à fonte de luz, devido à presença de auxina (TAIZ; ZEIGER, 2009). No entanto o AIA pode ser oxidado por enzimas peroxidases na alta intensidade luminosa (TAIZ; ZEIGER, 2009). As plântulas originadas do segmento apical, onde a auxina é produzida, têm um maior crescimento em uma maior irradiância que as plântulas originadas de segmentos nodais, provavelmente devido ao teor de auxina endógeno. Nos tecidos vegetais, o AIA é inativado imediatamente após ou concomitantemente com a ação promotora do crescimento, sua degradação se faz por meio da oxidação (KERBAUY, 2004).

Cada espécie pode responder diferentemente a densidade de fluxo de fótons. Maiores densidades de fótons podem ser prejudiciais ao crescimento da plântula, afetando o seu aparato fotossintético. Conforme Muller et al. (2001) a energia luminosa em excesso pode levar à produção de espécies tóxicas, tais como superóxidos, oxigênio singleto e peróxidos; no entanto vários mecanismos podem minimizar esses danos como os carotenoides (protetores), a modificação da distribuição de energia entre os fotossistemas I e II pelos pigmentos proteicos das antenas e o ciclo das xantofilas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Como essa espécie é mais cultivada e adaptada em climas quentes e com alta irradiância, possui características como a pubescência para tolerar a maior densidade de fluxo de fótons. Em alguns ambientes com abundância de luz, as folhas frequentemente têm características anatômicas especiais como

tricomas, glândula de sal e cera epicuticular, que aumentam a reflexão da luz pela superfície foliar, reduzindo assim, a absorção luminosa (EHLERINGER et al., 1976).

Além disso, muitas propriedades do aparato fotossintético mudam em função da luz disponível, bem como o ponto de compensação da luz, que é mais alto em folhas de sol que em folhas de sombra (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Neste estudo, as densidades de fluxo de fótons de 13 e 28 parecem ser insuficientes para o crescimento da plântula, tanto para o segmento apical ou nodal. Entretanto, a intensidade de 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  foi ótima para regular o crescimento e atividade fotossintética. A luz pode, frequentemente, limitar o crescimento e a reprodução das plantas, sendo assim um recurso crítico dessas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Segundo Taiz e Zeiger (2009) de acordo com a curva de resposta de árvores individuais e de um dossel, a taxa fotossintética geralmente não satura, mesmo sob a luz solar total. Com isso, a produtividade e a biomassa da cultura estão relacionadas à quantidade total de luz recebida durante a fase de crescimento, tendo água e nutrientes suficientes (ORT; BAKER, 1988).

Soontornchainaksaeng et al. (2001) em estudos com o crescimento *in vitro* de *Phaius tankervilleae* e *Vanda coerulea* (ambas Orchidaceae) nas intensidades de 28, 37, 56, 74 e 93  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , observaram maior acúmulo de biomassa seca, altura de plantas, número de folhas e desenvolvimento de área foliar dessas duas espécies na intensidade de 74  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , sendo a intensidade mais baixa insuficiente para o crescimento das plântulas e aquela mais alta excessiva para o crescimento ótimo e atividade fotossintética. No entanto, Jo et al. (2008) trabalhando com *Alocasia amazônica* (nome popular: alocasia) *in vitro* obtiveram melhores resultados de crescimento e desenvolvimento de plântulas em baixas irradiâncias (15 ou 30  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), no entanto o maior acúmulo de biomassa seca foi na densidades de 30 e 60  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Segundo Naves (1993) o diâmetro do caule pode ser um bom indicador da capacidade assimilatória líquida da planta. Resultados semelhantes foram observados por Sales et al. (2009) com hortelã-do-campo *in vivo* (*Hyptis marruboides*), verificando um menor diâmetro do caule na altura do colo no ambiente com menor irradiância (20%).

A luz utilizada na cultura de tecidos é um fator influenciador na multiplicação e no enraizamento da plântula, podendo em irradiações inadequadas não favorecer a indução e o desenvolvimento de raízes (PASA et al., 2012; RADMANN et al., 2002).

Resultados de Carvalho et al. (2012) em estudos com plântulas de *Hyptis marruboides* cultivadas *in vitro*, corroboram com o presente estudo. Esses autores observaram que em maiores irradiâncias (entre 75 e 125  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) tiveram as melhores respostas de taxa fotossintética e bons índices de crescimento.

Devido ao maior desenvolvimento aéreo e radicular das plântulas, tanto nas densidades de fluxo de fótons de 47 quanto a de 69  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  são aptas para o cultivo de plântulas oriundas de segmentos apicais ou laterais *in vitro*. Esses ambientes podem promover melhores condições para o posterior estabelecimento dessas plântulas no ambiente *ex vitro*.

### **3.2.2 Análise da fração volátil**

Os resultados das análises da fração volátil das folhas de plântulas oriundas de segmentos apicais e laterais, mantidas sob as diferentes intensidades de irradiância estão representadas nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 14 Constituição química da fração volátil de plântulas de *H. suaveolens* (C) originadas de segmentos apicais cultivados *in vitro* em diferentes densidades de fluxo de fótons (D). UFLA, Lavras, 2013

C	IR	D ( $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )			
		13	28	47	69
		Área % $\pm$ DP			
<b><math>\alpha</math>-tujeno</b>	925	0,33 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,03
<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	932	0,90 $\pm$ 0,15	1,16 $\pm$ 0,08	0,91 $\pm$ 0,09	2,21 $\pm$ 0,92
<b>sabineno</b>	972	15,50 $\pm$ 0,76	13,08 $\pm$ 0,47	17,04 $\pm$ 1,76	14,19 $\pm$ 4,99
<b><math>\beta</math>-pineno</b>	976	2,33 $\pm$ 0,49	2,95 $\pm$ 0,13	2,12 $\pm$ 0,22	8,14 $\pm$ 4,01
<b><math>\beta</math>-mirceno</b>	991	0,16 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,00
<b><math>\alpha</math>-felandreno</b>	1005	0,63 $\pm$ 0,20	0,50 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,00	0,72 $\pm$ 0,05
<b><math>\alpha</math>-terpineno</b>	1016	0,27 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,01	nd
<b><math>\beta</math>-felandreno</b>	1028	5,69 $\pm$ 1,59	4,68 $\pm$ 0,21	6,53 $\pm$ 0,18	7,13 $\pm$ 0,07
<b>1,8-cineol</b>	1030	2,34 $\pm$ 0,45	3,27 $\pm$ 0,67	1,55 $\pm$ 0,32	3,69 $\pm$ 0,16
<b><math>\gamma</math>-terpineno</b>	1057	0,43 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,08
<b>hidrato de Z-sabineno</b>	1066	nd	0,15 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,20
<b>terpinoleno</b>	1088	0,54 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,09	0,38 $\pm$ 0,05	nd
<b><math>\gamma</math>-elemeno</b>	1334	0,41 $\pm$ 0,21	0,44 $\pm$ 0,34	nd	nd
<b><math>\delta</math>-elemeno</b>	1336	0,22 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01
<b><math>\alpha</math>-cubebeno</b>	1349	nd	0,15 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,00	nd
<b><math>\alpha</math>-copaeno</b>	1375	1,26 $\pm$ 0,34	0,86 $\pm$ 0,22	1,58 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,09
<b><math>\beta</math>-cubebeno</b>	1386	1,96 $\pm$ 0,12	1,14 $\pm$ 1,55	2,24 $\pm$ 0,02	1,55 $\pm$ 0,07
<b><math>\alpha</math>-gurjuneno</b>	1415	0,22 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,03	nd
<b><i>E</i>-cariofileno</b>	1423	18,38 $\pm$ 0,61	20,13 $\pm$ 0,52	17,17 $\pm$ 0,99	19,27 $\pm$ 1,78
<b><math>\beta</math>-copaeno</b>	1428	nd	0,21 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,00	nd
<b><math>\alpha</math>-guaieno</b>	1437	0,71 $\pm$ 0,14	0,62 $\pm$ 0,12	0,77 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,04
<b>não identificado</b>	1442	0,32 $\pm$ 0,15	0,24 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,10	0,33 $\pm$ 0,07
<b>epi-biciclosesqui-felandreno</b>	1445	0,19 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	nd	nd
<b><math>\alpha</math>-humuleno</b>	1452	1,49 $\pm$ 0,05	1,57 $\pm$ 0,04	1,77 $\pm$ 0,08	1,79 $\pm$ 0,24
<b>alo-aromadendreno</b>	1459	1,19 $\pm$ 0,11	0,47 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,09

<sup>a</sup>Índice de retenção relativo à série n-alcacos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em colunas HP-5MS na ordem de eluição. DP = desvio padrão ( $n=2$ ). nd = não detectado; tr = traço ( $\leq 0,01\%$ ).

Tabela 15 (continuação)

C	IR	D ( $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )			
		13	28	47	69
Área % $\pm$ DP					
<i>cis</i> -cadin-1(6,4-dieno)	1461	nd	0,37 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,03	nd
$\gamma$ -muuroloeno	1476	0,82 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,04	0,51 $\pm$ 0,10	0,45 $\pm$ 0,04
germacreno D	1480	20,66 $\pm$ 3,11	20,44 $\pm$ 0,71	17,24 $\pm$ 0,29	12,63 $\pm$ 0,77
$\beta$ -selineno	1485	1,39 $\pm$ 0,08	1,23 $\pm$ 0,04	1,26 $\pm$ 0,12	1,36 $\pm$ 0,01
não identificado	1490	0,40 $\pm$ 0,11	0,31 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,05
biciclogermacreno	1496	12,94 $\pm$ 0,03	16,29 $\pm$ 0,34	18,52 $\pm$ 0,99	15,33 $\pm$ 0,13
$\alpha$ -muuroloeno	1499	0,41 $\pm$ 0,15	0,28 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,03	nd
$\gamma$ -cadineno	1513	0,61 $\pm$ 0,00	0,51 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,01
$\delta$ -cadineno	1523	1,13 $\pm$ 0,08	0,91 $\pm$ 0,10	0,67 $\pm$ 0,10	0,74 $\pm$ 0,05
$\alpha$ -cadineno	1537	0,21 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,03	nd
não identificado	1543	0,72 $\pm$ 0,32	nd	0,15 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,09
espatulenol	1576	1,05 $\pm$ 0,18	0,82 $\pm$ 0,09	1,65 $\pm$ 0,38	1,34 $\pm$ 0,13
óxido de cariofileno	1581	0,36 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,05	nd
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>		26,78	23,92	28,88	33,61
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		2,34	3,27	1,55	3,69
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>		64,2	67,05	64,31	55,56
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		1,41	1,21	2,09	1,34
<b>Não identificado</b>		1,44	0,55	0,8	0,94
<b>Total de constituintes presentes</b>		34	37	36	27
<b>Total identificado (%)</b>		<b>96,14</b>	<b>96,00</b>	<b>97,64</b>	<b>95,15</b>

<sup>a</sup>Índice de retenção relativo à série n-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em colunas HP-5MS na ordem de eluição. DP = desvio padrão ( $n=2$ ). nd = não detectado; tr = traço ( $\leq 0,01\%$ ).



Tabela 16 Constituição química da fração volátil de plântulas de *H. suaveolens* (C) originadas de segmentos nodais cultivados *in vitro* em diferentes densidades de fluxo de fótons (D). UFLA, Lavras, 2013

C	IR	D ( $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )			
		13	28	47	69
Área % $\pm$ DP					
$\alpha$ -tujeno	925	nd	0,23 $\pm$ 0,00	0,45 $\pm$ 0,09	0,28 $\pm$ 0,00
$\alpha$ -pineno	932	1,60 $\pm$ 0,44	1,41 $\pm$ 0,21	2,04 $\pm$ 0,33	1,31 $\pm$ 0,12
sabineno	972	17,04 $\pm$ 4,39	11,26 $\pm$ 0,81	19,59 $\pm$ 0,91	15,77 $\pm$ 1,29
$\beta$ -pineno	976	4,05 $\pm$ 0,92	3,88 $\pm$ 0,80	4,75 $\pm$ 0,71	4,07 $\pm$ 0,02
$\beta$ -mirceno	991	nd	0,24 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,16	nd
$\alpha$ -felandreno	1005	0,72 $\pm$ 0,14	0,40 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,10
$\alpha$ -terpineno	1016	nd	nd	0,30 $\pm$ 0,06	nd
$\beta$ -felandreno	1028	6,64 $\pm$ 1,02	3,80 $\pm$ 0,42	8,07 $\pm$ 0,82	7,24 $\pm$ 0,78
1,8-cineol	1030	4,46 $\pm$ 1,72	2,83 $\pm$ 0,53	6,07 $\pm$ 2,77	1,98 $\pm$ 0,77
$\gamma$ -terpineno	1057	0,35 $\pm$ 0,11	0,24 $\pm$ 0,08	0,44 $\pm$ 0,08	0,32 $\pm$ 0,04
hidrato de Z-sabineno	1066	0,54 $\pm$ 0,07	0,49 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,03
terpinoleno	1088	nd	nd	0,62 $\pm$ 0,10	0,40 $\pm$ 0,01
$\gamma$ -elemeno	1334	nd	nd	nd	nd
$\delta$ -elemeno	1336	0,28 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,05	nd
$\alpha$ -cubebeno	1349	nd	nd	nd	0,31 $\pm$ 0,08
$\alpha$ -copaeno	1375	0,76 $\pm$ 0,35	1,10 $\pm$ 0,31	0,85 $\pm$ 0,60	1,83 $\pm$ 0,36
$\beta$ -cubebeno	1386	2,01 $\pm$ 0,28	2,36 $\pm$ 0,23	1,88 $\pm$ 0,31	2,06 $\pm$ 0,12
<i>E</i> -cariofileno	1418	18,25 $\pm$ 3,02	23,80 $\pm$ 0,53	15,86 $\pm$ 0,19	16,47 $\pm$ 0,39
$\beta$ -copaeno	1428	nd	0,25 $\pm$ 0,12	0,17 $\pm$ 0,00	nd
$\alpha$ -guaieno	1437	0,59 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,08	0,74 $\pm$ 0,04	0,87 $\pm$ 0,22
não identificado	1442	0,25 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,15	0,29 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,17
$\alpha$ -humuleno	1452	1,68 $\pm$ 0,23	1,84 $\pm$ 0,03	1,59 $\pm$ 0,23	1,94 $\pm$ 0,25
alo-aromadendreno	1459	0,47 $\pm$ 0,14	0,74 $\pm$ 0,27	0,42 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,08
<i>cis</i> -cadina-1(6,4-dieno)	1461	0,30 $\pm$ 0,01	nd	0,21 $\pm$ 0,01	nd
$\gamma$ -muuroleno	1476	0,52 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,18	0,55 $\pm$ 0,09	0,59 $\pm$ 0,14
germacreno D	1480	19,62 $\pm$ 3,53	24,06 $\pm$ 0,44	12,88 $\pm$ 1,19	15,61 $\pm$ 1,02

<sup>a</sup>Índice de retenção relativo à série n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em colunas HP-5MS na ordem de eluição. DP = desvio padrão ( $n=2$ ). nd = não detectado; tr = traço ( $\leq 0,01\%$ ).

Tabela 14 (continuação)

C	IR	D ( $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )			
		13	28	47	69
Área % $\pm$ DP					
<b><math>\beta</math>-selineno</b>	1485	1,25 $\pm$ 0,18	1,46 $\pm$ 0,02	1,39 $\pm$ 0,08	1,51 $\pm$ 0,11
<b>não identificado</b>	1490	0,27 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,16	0,29 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,12
<b>biciclogermacreno</b>	1496	13,42 $\pm$ 1,22	11,52 $\pm$ 0,85	13,60 $\pm$ 1,43	17,78 $\pm$ 0,05
<b><math>\alpha</math>-muuroleno</b>	1499	0,25 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,16	0,25 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,04
<b><math>\gamma</math>-cadineno</b>	1513	0,51 $\pm$ 0,08	0,55 $\pm$ 0,12	0,36 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,04
<b><math>\delta</math>-cadineno</b>	1523	0,86 $\pm$ 0,23	1,24 $\pm$ 0,29	0,71 $\pm$ 0,10	0,81 $\pm$ 0,09
<b><math>\alpha</math>-cadineno</b>	1537	0,30 $\pm$ 0,26	0,19 $\pm$ 0,05	nd	0,30 $\pm$ 0,11
<b>espatulenol</b>	1576	0,45 $\pm$ 0,19	0,61 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,68	1,56 $\pm$ 0,32
<b>óxido de cariofileno</b>	1581	0,31 $\pm$ 0,25	0,34 $\pm$ 0,13	0,44 $\pm$ 0,19	0,38 $\pm$ 0,03
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>		30,94	21,95	37,82	30,53
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		4,46	2,83	6,07	1,98
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>		61,07	71,12	51,76	61,16
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		0,76	0,95	1,66	1,94
<b>Não identificado</b>		0,52	0,64	0,58	0,70
<b>Total de constituintes presentes</b>		28	30	32	29
<b>Total identificado (%)</b>		<b>97,73</b>	<b>97,49</b>	<b>97,88</b>	<b>96,29</b>

<sup>a</sup>Índice de retenção relativo à série n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em colunas HP-5MS na ordem de eluição. DP = desvio padrão ( $n=2$ ). nd = não detectado; tr = traço ( $\leq 0,01\%$ ).

Foram identificados 35 constituintes químicos nas análises das plântulas oriundas de segmentos apicais e 33 para as originárias de segmentos laterais, os quais representaram mais de 95% da composição química total. O perfil cromatográfico dos segmentos apicais apresentou maior complexidade que àquele obtido para os laterais nas intensidades de 13, 28 e 47  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . No perfil cromatográfico das primeiras estavam presentes entre 34 a 37 constituintes voláteis, enquanto para as últimas entre 28 e 32 constituintes presentes. A alta intensidade luminosa reduziu a complexidade do perfil cromatográfico para ambos os segmentos, sendo que para os apicais foram observados a presença de 27 constituintes e para os laterais 29.

Houve maior complexidade da fração volátil em plântulas originadas de segmentos apicais. Possivelmente, a auxina endógena influenciou nessa complexidade. Certos tecidos sintetizam as quantidades de hormônios que necessitam, outros são totalmente dependentes da aplicação endógena (PINTO; PASQUAL, 1990).

As densidades, de fluxo de fótons, extremas foram prejudiciais às plântulas. Nas menores irradiâncias a planta fica mais frágil e suscetível: a adversidade do ambiente e ao ataque de patógenos e herbívoros; com isso há menor investimento em biomassa e maior investimento em substâncias de defesa química das plantas. No entanto, as plântulas tiveram maior crescimento na intensidade mais alta, tendo assim uma fração volátil menos complexa. O AIA pode ser oxidado por enzimas peroxidases na alta intensidade luminosa (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Além disso, Hidrocarbonetos sesquiterpênicos foi a classe dominante de constituintes voláteis, independentemente do tipo de explante ou de intensidade luminosa, compreendendo teores entre 51,76% a 71,12% da composição volátil total. Para os segmentos apicais essa classe de constituintes apresentou menores teores na maior intensidade de luz (55,56%), não apresentando diferenças significativas nas demais intensidades (64,20 a 67,05%). Já para os segmentos laterais na menor e na maior intensidade de luz, não houve diferença entre os teores de sesquiterpenos hidrocarbonetos totais (61,07 e 61,16%, respectivamente). Porém, houve um aumento e uma queda expressiva no total de constituintes dessa classe nas intensidades de 28 e 47  $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , com teores de 71,12% e 51,76%, respectivamente.

Em ambos os tipos de explantes, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos com teores mais expressivos foram *E*-cariofileno, o germacreno D e o biciclogermacreno, Gráfico 2 e 3. Nos segmentos apicais os teores de *E*-cariofileno (17,17 $\pm$ 0,99 a 20,13 $\pm$ 0,52%) e biciclogermacreno (12,94 $\pm$ 0,03 a

18,52±0,99%) não apresentaram variações significativas entre as intensidades luminosas. No entanto, para o germacreno D, nas maiores intensidades luminosas (47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) houve diminuição dos seus teores (17,24±0,29 e 12,63±0,77%), comparados ao valor máximo de 23,77% nas intensidades de luz de 13 e 28  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

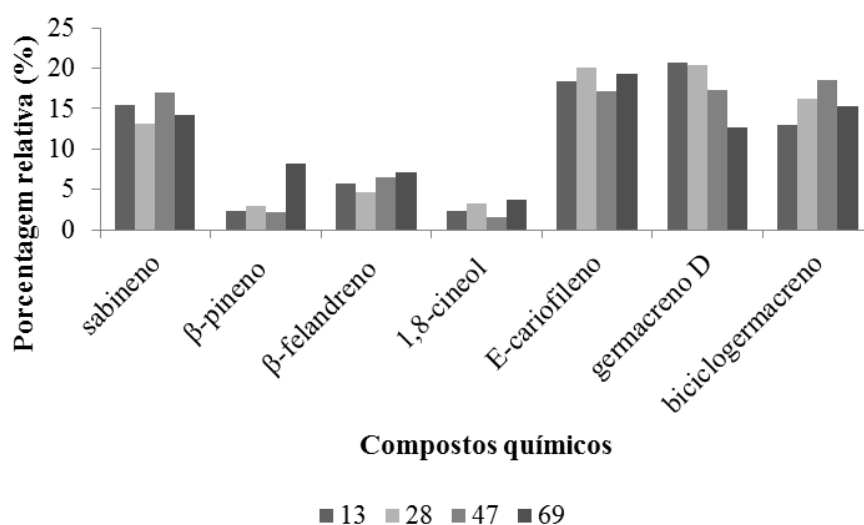


Gráfico 2 Porcentagem relativa (%) dos constituintes com maior teor na fração volátil de *Hyptis suaveolens*, originadas de segmentos apicais cultivados *in vitro*, sob diferentes densidades de fluxo de fótons (13; 28; 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). UFLA, Lavras, 2013

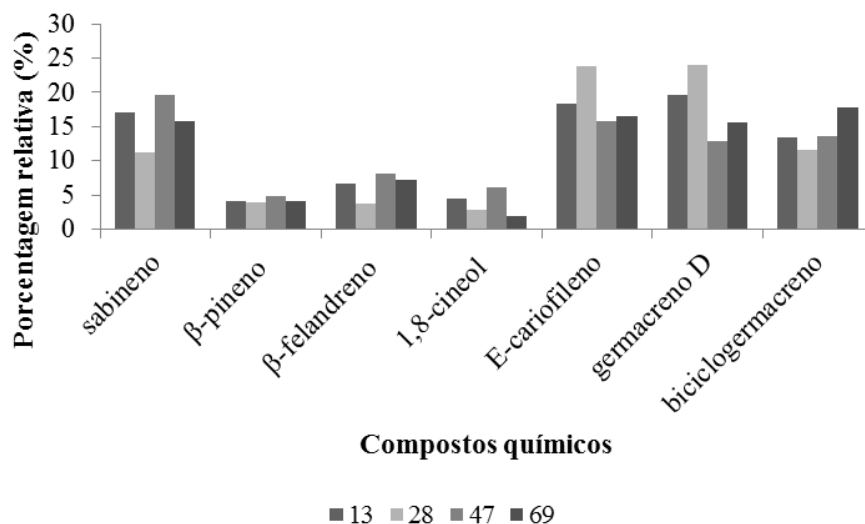


Gráfico 3 Percentagem relativa (%) dos constituintes com maior teor na fração volátil de *Hyptis suaveolens*, originadas de segmentos nodais cultivados *in vitro*, sob diferentes densidades de fluxo de fótons (13; 28; 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). UFLA, Lavras, 2013

Hidrocarbonetos monoterpênicos foi a segunda classe de constituintes dominantes na fração volátil de plântulas de *H. suaveolens*. Houve diferenças consideráveis no teor de monoterpênicos totais nas diferentes intensidades luminosas e tipos de segmentos. Tanto para os segmentos apicais quanto laterais, o menor teor dessa classe foi observado na intensidade de 28  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (23,92% e 21,95%, respectivamente). No entanto, o maior teor dessa classe nos segmentos apicais foi observado sob 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (33,61%) e para os laterais na intensidade de 47  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (37,82%). Em todos os experimentos, dentre os hidrocarbonetos monoterpênicos que apresentaram maiores teores estão o sabineno (11,26 $\pm$ 0,81 a 19,59 $\pm$ 0,91%), o  $\beta$ -pineno (2,12 $\pm$ 0,22 a 8,14 $\pm$ 4,01%), o  $\beta$ -felandreno (3,80 $\pm$ 0,42 a 8,07 $\pm$ 0,82%) e o 1,8-cineol (1,55 $\pm$ 0,32 a 6,07 $\pm$ 2,77), Gráfico 2 e 3. Dentre as diferenças quantitativas mais expressivas observadas, destaca-se o aumento dos teores de  $\beta$ -pineno nos segmentos apicais cultivados

sob  $69 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa. Em ambos explantes, os teores de  $\beta$ -felandreno foram os menores na intensidade de  $28 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Os óleos essenciais podem ter diferentes teores de constituintes em função do *habitat* em que as plantas são cultivadas (CONTI et al., 2011).

O potencial de alguns deles foram evidenciados em trabalhos.  $\beta$ -pineno demonstrou ação inseticida e repelente de insetos (HARBONE, 1993; SIMÕES; SPTIZER, 2004). Mondello et al. (2006) mostrou que o 1,8 cineol apresenta ação antifúngica contra *Candida albicans*, interrupção do crescimento microbiano em *Listeria monocytogenes* (LIS-BALCHIM; DEANS, 1997) e atividade antioxidante *in vitro* (TOSCAN, 2010).

Na fração volátil de *H. suaveolens* cultivada *in vitro* sob as diferentes intensidades luminosas também foi observada a presença de monoterpenos (1,55 a 6,07%) e sesquiterpenos (0,76 a 2,09%) oxigenados.

Em contraposição com os resultados do presente trabalho, nas análises do óleo essencial, por GC/MS, das folhas de *Hyptis suaveolens*, Conti et al. (2011) verificaram que os hidrocarbonetos monoterpênicos foram o grupo mais representativo (64,1%), seguido por hidrocarbonetos sesquiterpênicos (24,0%), monoterpenos oxigenados (8,1%) e sesquiterpenos oxigenados (2,4%). No entanto, corroborando com os resultados do presente estudo, Azevedo et al. (2001) verificou que os hidrocarbonetos monoterpênicos foi o principal grupo de componentes na maioria das populações (36,89-73,40%) em amostras de óleos essenciais extraídos de plantas de *Hyptis suaveolens* do Cerrado brasileiro. Além disso, Azevedo et al. (2001) identificou o sabineno e o biciclogermacreno em altos teores, ao lado do limoneno, felandreno e 1,8-cineol. Já no óleo essencial das partes aéreas de populações de *Hyptis suaveolens*, em estágio vegetativo, de floração e de frutificação, Oliveira et al. (2005) identificaram sabineno, limoneno, 1,8-cineol, *E*-cariofileno e espatulenol como os constituintes majoritários.

Observou-se que a maior intensidade de luz inibiu a produção de alguns compostos voláteis como  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -elemeno,  $\beta$ -copaeno, dentre outros.

Como observado anteriormente, a irradiância de 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  resultou em parte aérea e sistema radicular mais desenvolvido para ambos tipos de explantes. No entanto, na maior irradiância houve inibição na síntese de diversos constituintes voláteis. De acordo com Demmig-Adams e Adams (1992), a fotoinibição pode ocorrer quando a necessidade fotossintética da planta é excedida, o que parece ter ocorrido nas plântulas de *H. suaveolens*. Devido a esse fato e considerando os resultados de crescimento da plântula *in vitro*, as evidências apontaram que a intensidade de luz de 47  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  foi a melhor para o cultivo *in vitro* de *H. suaveolens*.

### **3.3 Avaliação das condições de qualidade de luz na regeneração de segmentos nodais de *H. suaveolens***

Avaliou-se neste trabalho a regeneração dos segmentos nodais *in vitro* e a análise da fração volátil de *Hyptis suaveolens*. Para uma melhor compreensão dividiu-se os resultados em subitens.

#### **3.3.1 Regeneração de segmentos nodais *in vitro***

Os resultados observados no crescimento das plântulas cultivadas sob diferentes qualidades de luz foram específicos para cada variável resposta analisada, o que corrobora com Carvalho et al. (2012) que afirmaram que a luz é um fator ambiental que pode ser manipulado durante o crescimento *in vitro*. Em comparação com a lâmpada fluorescente, as lâmpadas LED (*light emission diode*) branca, vermelha, azul ou combinações de vermelha:azul incrementaram as variáveis de crescimento analisadas (Figura 13 e Tabela 15).



Figura 13 Influência do espectro de luz no crescimento de segmento nodal de *Hyptis suaveolens in vitro* (V/A = proporção vermelho/azul). UFLA, Lavras, 2013



Tabela 17 Número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB-cm), número de folhas (NF), biomassa seca de folhas (BSF-mg), biomassa seca de calos (BSC-mg), biomassa seca de raízes (BSR-mg) e biomassa seca total (mg) de plântulas de *Hyptis suaveolens in vitro* com 35 dias de cultivo, em função de qualidades de luz (**A:** azul, **B:** vermelha, **C:** amarela, **D:** branca, **E:** verde, **F:** fluorescente, **G:** vermelha: azul 7:7, **H:** vermelha:azul4:10 e **I:** vermelha:azul 10:4). UFLA, Lavras, 2013

Luz	NB	CB	NF	BSF	BSC	BSR	BST
<b>A</b>	3,5 ab	1,4 d	13,9 abc	15,7 bc	4,6 b	3,7 b	23,6 c
<b>B</b>	2,8 ab	3,7 ab	13,7 abc	15,0 bcd	7,8 ab	7,5 ab	30,3 bc
<b>C</b>	1,6 b	3,4 abc	10,2 c	9,2 d	4,8 b	3,5 b	17,5 c
<b>D</b>	3,1 ab	2,4 cd	19,5 a	23,2 a	10,1 a	9,5 ab	42,8 ab
<b>E</b>	1,9 b	4,4 a	10,3 c	11,5 cd	7,1 ab	4,2 b	22,7 c
<b>F</b>	1,9 b	2,5 bcd	12,2 bc	13,0 bcd	4,9 b	3,5 b	21,5 c
<b>G</b>	2,2 b	1,6 d	12,3 bc	18,7 ab	5,1 b	6,3 bc	30,4 bc
<b>H</b>	3,3 ab	1,6 d	17,9 ab	17,8 abc	9,7 a	15,2 a	42,7 ab
<b>I</b>	4,1 a	2,2 cd	19,1 a	19,0 ab	11,0 a	15,0 a	45,0 a
CV	32	25	20	19	28	49	22

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de significância.

Entre os pigmentos que podem promover as respostas fotomorfogênica nas plantas, os mais importantes são aqueles que absorvem a luz vermelha e azul, sendo o fitocromo um pigmento proteico envolvido na maioria desses fenômenos, que absorve luz mais fortemente nas regiões do vermelho e do vermelho distante, mas também absorve luz azul (TAIZ; ZEIGEIR, 2009).

Segundo Taiz e Zeiger (2009), o fitocromo regula a transcrição de inúmeros genes, muito desses envolvidos na pigmentação verde (como aqueles codificados no núcleo para a subunidade pequena da rubisco e a proteína de ligação da clorofila a/b para o complexo de absorção de luz).

A resposta à luz branca do fitocromo é devido ao fato dessa luz ser composta por uma mistura de comprimentos de onda no vermelho, vermelho-distante e azul (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os números de brotos (2,76 a 4,13) e folhas (13,70 a 19,47) foram incrementados nos tratamentos que foram mantidos sob as luzes azul, vermelha, branca e combinações de vermelha:azul de 4:10 e 10:4, não havendo diferenças estatísticas significativas entre elas. No entanto, dentre as últimas lâmpadas citadas, os maiores acúmulos de biomassa seca das folhas foram sob a luz branca (23,19 mg), vermelha:azul 4:10 (17,79 mg) e vermelha:azul 10:4 (19,02 mg).

A biomassa seca do caule, raiz e total também apresentaram resultados similares. Para o sistema radicular, os melhores resultados foram observados nas luzes vermelha, branca, vermelha:azul 4:10 e vermelho:azul 10:4, apresentando maiores médias de biomassa seca de raiz, 7,54; 9,51; 15,20 e 15,01 respectivamente. Maior biomassa seca total foi observada nos tratamentos sob luz branca (42,84 mg), vermelho:azul 4:10 (42,70 mg) e vermelho:azul 10:4 (45,01 mg).

Em razão da quebra da dominância apical, causada pela degradação de auxinas, plantas cultivadas sob a faixa do espectro de luz azul podem resultar em altas taxas de brotações laterais (CHEE; POOL, 1989; SILVA; DEBERGH, 1997). Luca et al. (2001) verificaram plântulas de *Alternanthera brasiliana* L. cultivadas sob luz azul e verde formaram até quatro brotos por explante, enquanto que em todos os outros tratamentos (vermelha, branca e escuro) o número de brotos por explante foi de apenas dois.

Corroborando também com resultados deste trabalho, em estudos com *Zantedeschia albomaculata*, o maior número de brotos ocorreu em luz branca e vermelha combinada com azul (CHANG et al., 2003). Para multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* GF 677, Morini e Muleo (2003) obtiveram maior número de brotos em luz branca. Em estudo com macieira (*Malus domestica*) com 4,4  $\mu$ M de BAP no meio de cultura, tanto o número médio de gemas como a taxa de multiplicação, foram superiores sob a luz vermelha e branca (ERIG; SCHUC, 2006). No cultivo *in vitro* de porta-enxerto de *Prunus*

clone I.S. 5/14, o maior número médio de gemas por broto também foi obtido utilizando a luz vermelha (ROSSI et al., 2002). Erig e Schuc (2005) em estudos com framboeseira (*Rubus sidaeus* L.) também obteve o maior número médio de brotos com a luz vermelha, entretanto a luz verde também proporcionou esse resultado.

A luz branca tem sido utilizada em cultura de tecidos e seus efeitos sobre a morfogênese são mais conhecidos (RIBEIRO et al., 2009), no entanto aquela mais comum é a fluorescente. A luz azul é importante na formação da clorofila, no desenvolvimento do cloroplasto, na abertura do estômato e na fotomorfogênese (AKOYUNOGLU; ANNI, 1984).

A função do tipo de luz no crescimento e desenvolvimento das plantas pode variar com a espécie de planta, o estágio de crescimento, as condições ambientais, a composição do meio de cultura e a ventilação; devido a isso, são necessários estudos detalhados para correlacionar o tipo de luz às condições de crescimento e, inclusive, aos objetivos do cultivo (ERIG; SCHUC, 2005).

A folha é a parte da planta que possui maior concentração de constituintes voláteis, sendo assim para esse objetivo recomenda-se a propagação dessa plântula *in vitro* nas luzes branca, vermelho e azul (7:7), vermelho e azul (4:10) e vermelho e azul (10:4).

### **3.2.2 Análise da fração volátil**

Os resultados das análises químicas da fração volátil das folhas de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* estão representados na Tabela 16, onde 41 constituintes voláteis foram identificados numa faixa entre 94,19 % a 99,48 % da composição química total.

Tabela 18 Constituição química da fração volátil analisada por HS-CG/MS de folhas de plântulas de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* em diferentes qualidades de luz. **A:** azul, **B:** vermelha, **C:** amarela, **D:** branca, **E:** verde, **F:** fluorescente, **G:** vermelha: azul 7:7, **H:** vermelha:azul4:10 e **I:** vermelha:azul 10:4. UFLA, Lavras, 2013

COMPOSTOS	QUALIDADES DE LUZ								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	<b>Área %±DP</b>								
<b><math>\alpha</math>-tujeno</b>	0,23± 0,1	0,23± 0,0	0,23±0 ,0	0,21± 0,0	0,23± 0,0	0,22±0 ,1	0,14± 0,0	0,24± 0,0	0,21±0 ,0
<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	2,08± 0,4	4,45± 0,3	2,47±0 ,7	2,68± 0,4	2,54± 0,3	2,69±0 ,4	3,17± 0,2	2,23± 0,3	3,78±0 ,0
<b>canfeno</b>	nd	0,12± 0,0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,10±0 ,0
<b>sabineno</b>	12,63 ±2	7,51± 0,7	12,97± 3,8	11,34 ±3	10,71 ±1,4	8,06±3 ,1	5,77± 1,5	12,89 ±1,2	7,38±0 ,7
<b><math>\beta</math>-pineno</b>	7,14± 1,1	17,39 ±0,9	9,69±3 ,6	10,45 ±1	9,61± 1,3	10,62± 2,2	12,85 ±0,9	8,25± 1,4	14,19± 0,1
<b><math>\beta</math>-mirceno</b>	0,32± 0,0	0,44± 0,0	0,36±0 ,0	0,39± 0,0	0,31± 0,0	0,32±0 ,1	0,32± 0,0	0,40± 0,0	0,48±0 ,0
<b><math>\alpha</math>-felandreno</b>	0,63± 0,0	0,74± 0,1	0,71±0 ,1	0,64± 0,2	0,73± 0,0	0,61±0 ,1	0,71± 0,2	0,74± 0,1	0,71±0 ,0
<b><math>\delta</math>-3-careno</b>	nd	0,13± 0,0	nd	0,11± 0,0	nd	nd	0,11± 0,0	nd	0,17±0 ,0
<b><math>\alpha</math>-terpineno</b>	0,19± 0,1	0,19± 0,0	nd	0,15± 0,0	0,16± 0,1	nd	nd	0,19± 0,0	0,22±0 ,0
<b><math>\beta</math>-felandreno</b>	5,51± 0,4	6,99± 0,8	6,35±0 ,6	5,94± 1,2	6,53± 0,3	5,72±0 ,4	6,52± 1,5	6,48± 0,5	6,36±0 ,5
<b>1,8-cineol</b>	1,09± 0,4	0,36± 0,0	0,78±0 ,2	0,45± 0,3	0,40± 0,2	1,09±0 ,5	0,35± 0,1	0,52± 0,0	0,84±0 ,1
<b><math>\gamma</math>-terpineno</b>	0,26± 0,1	0,24± 0,0	0,19±0 ,0	0,20± 0,0	0,21± 0,1	0,20±0 ,1	0,11± 0,0	0,28± 0,0	0,27±0 ,0
<b>hidrato de Z-sabineno</b>	0,13± 0,0	nd	0,12±0 ,0	nd	0,14± 0,0	nd	nd	0,10± 0,0	nd
<b>terpinoleno</b>	1,30± 0,3	3,19± 0,4	1,29±0 ,8	2,38± 0,4	1,76± 0,6	0,65±0 ,1	2,15± 0,3	1,12± 0,2	3,83±0 ,4
<b>borneol</b>	nd	0,30± 0,1	nd	0,11± 0,0	nd	nd	0,16± 0,0	nd	0,14±0 ,0
<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	nd	0,26± 0,1	nd	0,25± 0,0	0,12± 0,0	nd	0,14± 0,0	0,24± 0,1	0,34±0 ,0

DP = desvio padrão ( $n=3$ ). nd = não detectado; tr = traço ( $\leq 0,01\%$ ).

Tabela 16 (continuação)

COMPOSTOS	QUALIDADES DE LUZ								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	Área %±DP								
<b>γ-elemeno</b>	0,27± 0,0	0,24± 0,0	0,24± 0,0	0,28± 0,0	0,23± 0,0	0,24± 0,0	0,33± 0,0	0,22± 0,0	0,24± 0,0
<b>α-cubebeno</b>	0,40± 0,1	0,32± 0,1	0,46± 0,1	0,35± 0,1	0,45± 0,1	0,24± 0,0	0,25± 0,0	0,38± 0,0	0,37± 0,0
<b>α-copaeno</b>	2,11± 0,2	1,38± 0,3	2,37± 0,4	1,63± 0,4	2,32± 0,3	1,22± 0,2	1,20± 0,1	2,00± 0,2	1,64± 0,2
<b>β-cubebeno</b>	0,20± 0,0	0,14± 0,0	0,21± 0,0	0,18± 0,0	0,21± 0,0	nd	nd	0,19± 0,0	nd
<b>β-elemeno</b>	1,78± 0,2	1,62± 0,3	1,92± 0,1	1,87± 0,1	1,75± 0,1	1,84± 0,2	1,93± 0,1	1,78± 0,1	1,56± 0,1
<b>α-gurjuneno</b>	0,13± 0,0	0,14± 0,0	nd	0,15± 0,0	0,15± 0,0	0,20± 0,0	0,14± 0,0	0,15± 0,0	0,18± 0,0
<b>E-cariofileno</b>	21,00 ±2	17,81 ±1,7	17,39 ±1,3	21,60 ±2	19,34 ±1,7	22,48 ±5,3	21,97 ±1,4	19,55 ±1,2	18,79 ±1,1
<b>β-copaeno</b>	0,26± 0,1	0,23± 0,0	0,20± 0,0	0,21± 0,0	0,21± 0,1	0,25± 0,0	0,19± 0,0	0,28± 0,1	0,37± 0,1
<b>α-guaieno</b>	0,99± 0,2	1,02± 0,1	0,70± 0,1	0,75± 0,0	1,02± 0,3	1,17± 0,0	1,05± 0,0	0,87± 0,2	1,12± 0,1
<b>não identificado</b>	0,40± 0,2	0,35± 0,1	0,21± 0,0	0,26± 0,0	0,24± 0,1	0,37± 0,0	0,31± 0,0	0,37± 0,1	0,56± 0,1
<b>epi-biciclosesquifelandreno</b>	0,14± 0,0	0,12± 0,0	0,16± 0,0	0,17± 0,0	0,16± 0,0	nd	nd	0,18± 0,0	0,17± 0,0
<b>cis-muurolo-3,5-dieno</b>	0,12± 0,0	0,12± 0,0	nd	nd	0,14± 0,0	nd	nd	0,11± 0,0	0,14± 0,0
<b>α-humuleno</b>	2,28± 0,1	1,77± 0,0	1,85± 0,1	2,10± 0,1	2,13± 0,0	2,43± 0,3	2,33± 0,2	2,11± 0,1	1,97± 0,0
<b>alo-aromadendreno</b>	0,60± 0,0	0,48± 0,0	1,14± 0,0	1,05± 0,1	1,21± 0,1	1,14± 0,1	0,56± 0,0	1,21± 0,1	0,64± 0,1
<b>γ-muuroloeno</b>	0,69± 0,1	0,71± 0,1	0,64± 0,0	0,58± 0,3	0,79± 0,2	0,97± 0,1	0,68± 0,1	0,79± 0,2	0,81± 0,1
<b>germacreno D</b>	16,22 ±1	13,00 ±2,0	19,69 ±0,3	16,04 ±1	16,77 ±0,8	16,05 ±1,9	14,34 ±2,2	17,21 ±1,0	13,52 ±0,0
<b>β-selineno</b>	1,37± 0,2	1,11± 0,0	1,14± 0,1	1,13± 0,0	1,24± 0,2	1,54± 0,15	1,29± 0,1	1,19± 0,2	1,07± 0,0
<b>não identificado</b>	0,46± 0,2	0,41± 0,1	0,32± 0,0	0,30± 0,4	0,38± 0,1	0,47± 0,0	0,33± 0,1	0,41± 0,1	0,56± 0,1

DP = desvio padrão ( $n=3$ ). nd = não detectado; tr = traço ( $\leq 0,01\%$ ).

Tabela 16 (conclusão)

COMPOSTOS	QUALIDADES DE LUZ								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	Área %±DP								
<b>biciclogermacreno</b>	12,58 ±1	10,70 ±0,7	11,66 ±0,4	11,59 ±0,0	11,76 ±0,0	12,82 ±0,4	14,18 ±0,3	10,27 ±1,5	9,58 ±0,3
<b>α-muuroleno</b>	0,38 ±0,1	0,36± 0,0	0,34± 0,1	0,24± 0,0	0,45± 0,1	0,55± 0,0	0,28± 0,0	0,39± 0,1	0,44 ±0,0
<b>γ-cadineno</b>	0,47 ±0,1	0,41± 0,0	0,40± 0,0	0,37± 0,0	0,42± 0,1	0,52± 0,0	0,34± 0,0	0,43± 0,0	0,51 ±0,1
<b>δ-cadineno</b>	1,06 ±0,2	1,09± 0,1	1,07± 0,1	0,81± 0,0	1,37± 0,3	1,51± 0,1	0,87± 0,1	1,16± 0,1	1,23 ±0,1
<b>trans-cadina-1,4-dieno</b>	0,12 ±0,0	0,12± 0,0	nd	nd	0,15± 0,0	nd	nd	0,12± 0,0	0,15 ±0,0
<b>α-cadineno</b>	0,17 ±0	0,17± 0,0	0,16± 0,0	0,14± 0,0	0,18± 0,0	0,20± 0,0	0,13± 0,0	0,19± 0,0	0,21 ±0,0
<b>não identificado</b>	0,39 ±0,3	0,41± 0,1	0,39± 0,0	0,44± 0,0	0,62± 0,2	0,45± 0,2	0,50± 0,3	1,07± 0,2	0,57 ±0,2
<b>espatulenol</b>	0,33 ±0,0	0,11± 0,0	0,13± 0,0	0,22± 0,0	0,21± 0,0	0,30± 0,1	0,23± 0,0	0,21± 0,1	0,17 ±0,0
<b>óxido decariofileno</b>	0,14 ±0,0	nd	nd	nd	0,15± 0,0	0,23± 0,0	0,13± 0,0	0,15± 0,0	0,10 ±0,0
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>	30,29	41,62	34,26	35,14	34,78	30,18	30,00	32,82	37,7
<b>Monoterpenos oxigenados</b>	1,22	0,92	0,9	0,81	0,66	1,09	0,65	0,86	1,32
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>	63,34	53,06	61,74	60,55	62,44	64,26	62,04	60,78	54,71
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>	0,47	0,11	0,13	0,22	0,36	0,53	0,36	0,36	0,27
<b>Não identificado</b>	1,25	1,17	0,92	1,0	1,24	1,29	1,14	1,85	1,69
<b>Toral de constituintes presentes</b>	39	41	34	38	40	33	36	40	41
<b>Total identificado(%)</b>	<b>96,56</b>	<b>96,88</b>	<b>97,92</b>	<b>97,72</b>	<b>99,48</b>	<b>97,35</b>	<b>94,19</b>	<b>96,68</b>	<b>95,68</b>

DP = desvio padrão ( $n=3$ ). nd = não detectado; tr = traço ( $\leq 0,01\%$ ).

Assim como nas análises de crescimento, a luz fluorescente foi a que inibiu a síntese do maior número de constituintes voláteis. Enquanto que sob a luz vermelha e combinação vermelha:azul 10:4 foi observado um perfil cromatográfico com 41 constituintes, na luz fluorescente apenas 33 estavam presentes. Dentre os constituintes que foram inibidos pela luz fluorescente

citam-se o canfeno,  $\delta$ -3-careno,  $\alpha$ -terpineno, *Z*-sabineno, borneol,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -cubebeno, epi-biciclosesquifelandreno, *cis*-muurolo-3,5-dieno e *trans*-cadina-1,4-dieno.

Independente da qualidade de luz os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (53,06 a 64,26%) foi a classe dominante, seguida pelos hidrocarbonetos monoterpênicos (30,00 a 41,62%), monoterpênicos oxigenados (0,65 a 1,32%) e sesquiterpênicos oxigenados (0,11 a 0,53%). As maiores inibições dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram observadas sob a luz vermelha (53,06%) e combinação vermelha:azul 10:4 (54,71%), no entanto nesses tratamentos observaram-se os maiores teores de monoterpênicos oxigenados (41,62 e 37,7%, respectivamente).

Azevedo et al. (2002), em trabalho com *Hyptis suaveolens* no cerrado brasileiro, investigaram o óleo essencial da parte aérea de nove amostras por CG-MS e verificaram que os sesquiterpênicos oxigenados foi o principal grupo na maioria das populações. Já em outro trabalho com o óleo dessa espécie os hidrocarbonetos monoterpênicos foram identificados como o principal grupo presente (RANA et al., 2004).

Independente da qualidade de luz, os principais constituintes identificados foram o sabineno ( $5,77 \pm 1,47$  a  $12,89 \pm 1,2$ ),  $\beta$ -pineno ( $7,14 \pm 1,06$  a  $17,39 \pm 0,92$ ), *E*-cariofileno ( $17,39 \pm 1,35$  a  $21,92 \pm 1,4$ ), germacreno D ( $13,00 \pm 2,06$  a  $19,69 \pm 0,33$ ) e biciclogermacreno ( $9,58 \pm 0,3$  a  $14,18 \pm 0,3$ ), Gráficos 4 e 5. Estudos de Azevedo et al. (2002) com a composição de nove amostras de óleo essencial de plantas de *Hyptis suaveolens* do Cerrado brasileiro na fase de frutificação, investigado por GC-MS, verificou-se o espatulenol, 1,8-cineol e *E*-cariofileno como os principais constituintes. Já, os constituintes: sabineno,  $\beta$ -cariofileno, terpinoleno,  $\beta$ -pineno e limoneno (6,0%) foram verificados por Conti et al. (2011) em análises por cromatografia gasosa com um alto teor no óleo essencial.

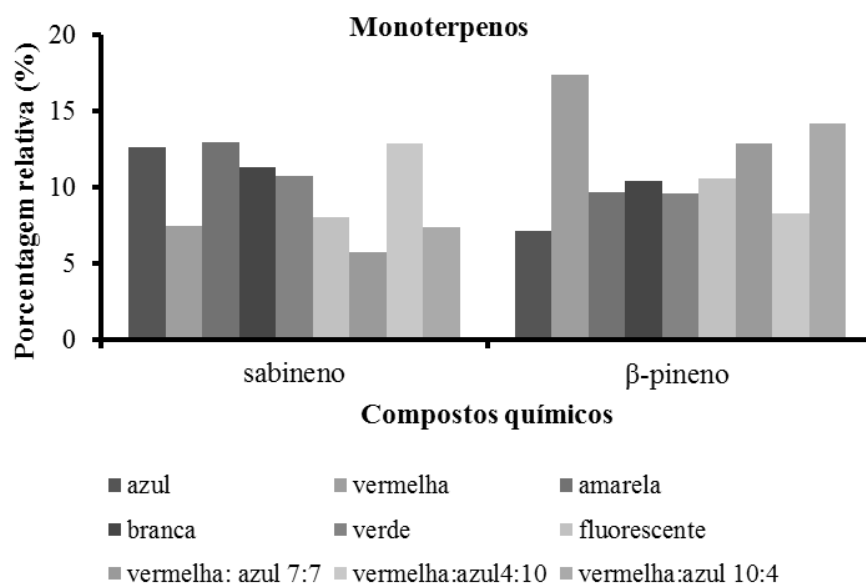


Gráfico 4 Porcentagem relativa (%) dos constituintes da classe de monoterpenos com maior teor na fração volátil de *Haptis suaveolens*, sob diferentes qualidades de luz. UFLA, Lavras, 2013



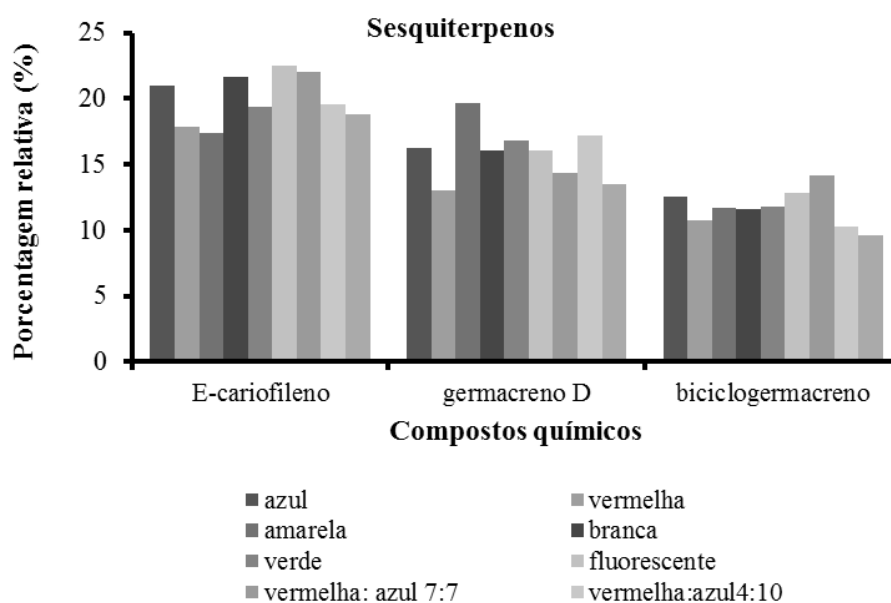


Gráfico 5 Percentagem relativa (%) dos constituintes da classe de sesquiterpenos com maior teor na fração volátil de *Hypsis suaveolens*, sob diferentes qualidades de luz. UFLA, Lavras, 2013

O potencial de alguns deles foi evidenciado em trabalhos.  $\beta$ -pineno demonstrou ação inseticida e repelente de insetos (HARBONE, 1993; SIMÕES; SPTIZER, 2004). Mondello et al. (2006), mostraram que o 1,8 cineol apresenta ação antifúngica contra *Candida albicans*, interrupção do crescimento microbiano em *Listeria monocytogenes* (LIS-BALCHIM; DEANS, 1997) e atividade antioxidante *in vitro* (TOSCAN, 2010).

Pelas faixas dos constituintes obtidas no presente estudo pôde-se observar que os monoterpenos hidrocarbonetos, sabineno e  $\beta$ -pineno, foram os constituintes que apresentaram maiores variações nos teores. A luz azul, amarela e combinação vermelha:azul 4:10 foram as que incrementaram os teores de sabineno ( $12,63 \pm 2,0$  a  $12,89 \pm 1,2$ ). Já a luz vermelha e combinação vermelha:azul 10:4 incrementaram os teores de  $\beta$ -pineno ( $17,30 \pm 0,9$  e  $14,19 \pm 0,1$ , respectivamente).

Verificou-se algumas variações quantitativas não tão significativas e que alguns compostos voláteis foram inibidos por determinados espectros de luz. A luz fluorescente foi a que causou maior efeito inibitório tanto para os constituintes voláteis quanto para os parâmetros de crescimento.

A qualidade da luz surge como uma ferramenta na manipulação da indução de balanços fisiológicos favoráveis a respostas específicas no crescimento das plantas (MORINI; MULEO, 2003). Nesse contexto incluem-se os metabólitos secundários.

### **3.3 Análise de constituintes voláteis de *H. suaveolens* em diferentes condições de cultivo**

Na análise da fração volátil foram identificados 41 constituintes químicos entre os diferentes ambientes, representando mais de 96,47% da composição total (Tabela 17). Independente do ambiente, a classe dos hidrocarbonetos monoterpênicos foi a classe dominante (39,85 a 72,55%). O maior teor de hidrocarbonetos monoterpênicos foi observado nas plântulas oriundas de sementes e o menor nas plantas cultivadas na fertirrigação (plantas matrizes).

Tabela 19 Constituição química da fração volátil de *Hyptis suaveolens* em diferentes ambientes (**Fertirrigação**: plantas cultivadas em casa de vegetação sob o sistema de fertirrigação; **Horto**: canteiro a pleno sol no Horto de plantas medicinais da UFLA; **G in vitro**: plântulas oriundas de segmentos nodais de casa de vegetação inoculadas in vitro em meio MS/4 e 30 g/L de sacarose; e, **S in vitro**: plântulas oriundas de sementes inoculadas in vitro em meio MS e 15 g/L de sacarose). UFLA, Lavras, 2013

COMPOSTOS	IR <sup>a</sup>	Ambientes			
		Fertirrigação	Horto	G in vitro (MS/4)	S in vitro (MS)
		Área %±DP			
hexanal	801	0,33±0,06	nd	nd	nd
Z-3-hexen-1-ol	850	3,63±1,11	0,67±0,28	0,35±0,16	0,28±0,08
1-hexanol	863	0,46±0,11	nd	nd	nd
α-tujeno	925	0,56±0,03	0,46±0,08	0,96±0,10	1,22±0,41
α-pineno	932	2,69±1,08	2,05±0,33	6,74±1,40	0,98±0,25
canfeno	947	nd	nd	0,22±0,04	nd
sabineno	972	10,40±2,03	14,83±3,13	15,59±4,74	37,96±0,61
β-pineno	977	11,56±4,70	8,13±1,37	28,90±2,20	2,96±1,67
β-mirceno	990	0,45±0,18	0,47±0,14	0,46±0,16	nd
α-felandreno	1005	1,12±0,23	1,18±0,28	1,04±0,04	0,67±0,08
δ-3-careno	1011	nd	0,18±0,03	0,17±0,05	nd
α-terpeno	1016	0,28±0,02	0,26±0,02	0,46±0,13	0,72±0,18
p-cimeno	1023	0,71±0,07	0,44±0,08	0,62±0,07	0,57±0,34
β-felandreno	1028	15,41±2,62	17,63±2,06	14,30±1,98	7,43±0,07
1,8-cineol	1030	19,71±1,80	7,29±1,44	3,40±0,98	5,53±0,73
γ-terpineno	1057	0,48±0,04	0,49±0,08	0,74±0,15	1,15±0,27
hidrato de Z-sabineno	1066	0,62±0,09	0,45±0,09	1,06±0,06	1,25±0,37
terpinoleno	1088	nd	2,38±0,64	1,62±0,70	0,77±0,10

<sup>a</sup>Índice de retenção relativo a série *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em colunas HP-5MS na ordem de eluição. DP = desvio padrão (*n*=4). nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%).

Tabela 17 (conclusão)

COMPOSTOS	IR <sup>a</sup>	Ambientes			
		Fertirrigaç ão	Horto	G <i>in vitro</i> (MS/4)	S <i>in vitro</i> (MS)
		Área %±DP			
hidrato de <i>E</i> -sabineno	1099	0,59±0,06	0,41±0,17	0,67±0,08	1,09±0,22
trans-pinocarveol	1138	nd	nd	0,12±0,04	nd
cânfora	1143	nd	0,35±0,05	0,83±0,24	nd
borneol	1164	nd	nd	0,26±0,15	nd
terpinen-4-ol	1176	nd	0,51±0,16	0,39±0,11	0,65±0,12
$\alpha$ -terpineol	1190	0,80±0,12	0,48±0,13	0,62±0,31	nd
mirtenol	1196	nd	nd	0,12±0,003	nd
$\alpha$ -cubebeno	1349	nd	nd	0,13±0,07	0,52±0,01
$\alpha$ -copaeno	1375	0,78±0,35	0,67±0,26	0,45±0,27	2,38±0,03
(-)- $\beta$ -bourboneno	1384	0,97±0,20	4,49±1,34	nd	nd
$\beta$ -elemeno	1391	0,53±0,12	0,72±0,08	0,50±0,07	1,24±0,09
<i>E</i> -cariofileno	1418	14,10±3,75	15,29±1,77	9,56±1,36	8,99±0,98
$\beta$ -copaeno	1428	nd	0,56±0,15	nd	0,23±0,02
$\alpha$ -guaiano	1438	nd	0,30±0,03	0,17±0,04	0,30±0,06
$\alpha$ -humuleno	1452	1,14±0,20	1,00±0,08	0,69±0,04	0,98±0,09
alo- aromadendreno	1459	0,26±0,08	0,41±0,06	0,20±0,07	0,35±0,03
$\gamma$ -muuroleno	1476	nd	0,18±0,02	0,20±0,02	0,52±0,07
germacreno D	1480	2,08±1,32	5,06±0,26	3,14±0,23	7,69±0,46
$\beta$ -selineno	1485	0,75±0,06	0,53±0,05	0,58±0,05	1,25±0,06
biciclo- germacreno	1496	5,21±0,10	6,00±0,82	3,11±0,48	7,03±1,40
$\delta$ -cadineno	1523	nd	0,21±0,04	0,17±0,01	0,34±0,03
espatulenol	1576	2,14±0,68	2,39±0,64	0,43±0,12	1,99±0,06
óxido de cariofileno	1582	1,46±0,99	nd	0,27±0,02	0,30±0,01
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>		39,85	47,84	72,55	55,40
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		25,52	9,71	6,76	7,55
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>		25,82	35,41	18,90	31,82
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		3,60	2,39	0,70	2,29
<b>Outros (álcoois e aldeído alifático)</b>		4,42	0,67	0,35	0,28
<b>Total de constituintes presentes</b>		28	33	37	30
<b>Total identificado (%)</b>		<b>99,22</b>	<b>96,47</b>	<b>99,23</b>	<b>97,00</b>

<sup>a</sup>Índice de retenção relativo a série *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em colunas HP-5MS na ordem de eluição. DP = desvio padrão (*n*=4). nd = não detectado; tr = traço ( $\leq 0,01\%$ ).

Com exceção da fertirrigação, os sesquiterpenos hidrocarbonetos foi a segunda classe dominante de constituintes químicos, cujos teores foram de 35,41%, 18,90% e 31,82%, para o horto e plântulas cultivadas *in vitro* oriundas de segmentos nodais e sementes, respectivamente. No ambiente de fertirrigação houve a presença quase equitativa de monoterpenos oxigenados (25,52%) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (25,82%).

Corroborando com o presente estudo, os trabalhos de Azevedo et al. (2001), Conti et al. (2011) e Rana et al. (2004) também identificaram os hidrocarbonetos monoterpênicos como a classe principal de constituintes voláteis de *Hyptis suaveolens*. No entanto, em outros trabalhos com essa mesma planta, Oliveira et al. (2005) verificou os monoterpenos oxigenados e Azevedo et al. (2002) verificaram os sesquiterpenos oxigenados como a classe principal.

Diferenças qualitativas significativas foram observadas nos perfis cromatográficos das amostras analisadas. O perfil cromatográfico mais complexo foi o de plântulas cultivadas *in vitro* (meio MS/4 suplementado com 30 g/L de sacarose) oriundas de segmentos nodais com 37 constituintes químicos, seguido do horto (à pleno sol e com irrigação), plântulas cultivadas *in vitro* (MS suplementado com 15 g/L de sacarose) oriundas de sementes e fertirrigação em casa de vegetação, com 33,30 e 28 constituintes químicos. Observa-se no item 3.4.1 do artigo 1 deste trabalho que a complexidade volátil é influenciada pelos sais do meio MS, tendo maior complexidade o meio menos salino. O ambiente de fertirrigação, possivelmente ofereceu condições ótimas para a sobrevivência da planta, não estimulando assim a produção de compostos de defesa para a planta. Segundo Gershenzon e Croteau (1991), os terpenos exercem importantes funções de defesa no reino vegetal.

De acordo com Martins, Santos e Polo (2006) há uma elevada variabilidade na composição e no teor de constituintes majoritários do óleo

essencial de *Hyptis suaveolens*. Vários são os fatores que podem implicar nessa variabilidade da composição do óleo essencial como a variabilidade genética intraespecífica, condições ambientais, épocas de colheita, condições de cultivo, tipo de solo, a parte da planta utilizada, dentre outros (HAY; SVOBODA, 1993).

Dentre os monoterpenos hidrocarbonetos majoritários foram identificados o sabineno ( $10,40 \pm 2,03$  a  $37,96 \pm 0,61$ ), o  $\beta$ -pineno ( $2,96 \pm 1,67$  a  $28,90 \pm 2,20$ ) e o  $\beta$ -felandreno ( $7,43 \pm 0,07$  a  $17,63 \pm 2,06$ ), Gráfico 6. Nota-se nas faixas de teores desses constituintes que as diferenças foram bastante expressivas entre os ambientes. O teor de sabineno foi máximo nas plântulas oriundas de sementes, o  $\beta$ -pineno nas plântulas oriundas de segmentos nodais e o  $\beta$ -felandreno nas plantas do horto. Já o monoterpeno oxigenado 1,8-cineol teve sua máxima produção nas plantas cultivadas na fertirrigação e o sesquiterpeno hidrocarboneto *E*-cariofileno teve sua máxima produção nas plantas *ex vitro*.

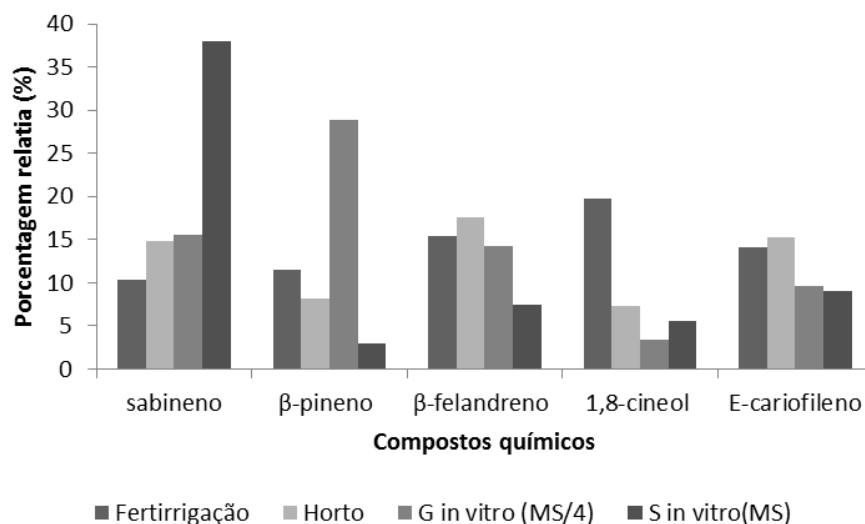


Gráfico 6 Percentagem relativa (%) dos constituintes com maior teor na fração volátil de *Hyptis suaveolens*, sob diferentes condições de cultivo (Fertirrigação, Horto, G *in vitro*: plântulas oriundas de segmentos nodais de casa de vegetação inoculadas *in vitro* em meio MS/4 e 30 g/L de sacarose; e, S *in vitro*: plântulas oriundas de sementes inoculadas *in vitro* em meio MS e 15 g/L de sacarose). UFLA, Lavras, 2013

O potencial de alguns deles foi evidenciado em outros trabalhos.  $\beta$ -pineno demonstrou ação inseticida e repelente de insetos (HARBONE, 1993; SIMÕES; SPTIZER, 2004). Mondello et al. (2006), mostraram que o 1,8 cineol apresenta ação antifúngica contra *Candida albicans*, interrupção do crescimento microbiano em *Listeria monocytogenes* (Lis-BALCHIM; DEANS, 1997) e atividade antioxidante *in vitro* (TOSCAN, 2010).

Elevados teores desses constituintes voláteis foram observados em outros trabalhos com *Hyptis suaveolens*. Azevedo et al. (2001) verificou também altos teores de sabineno e  $\beta$ -felandreno, além do limoneno, biciclogermacreno e 1,8-cineol em. Já Oliveira et al. (2005) identificaram a presença de sabineno,

limoneno, 1,8-cineol, *E*-cariofileno e espatulenol como constituintes majoritários do óleo essencial de *H. suaveolens*.

Os constituintes voláteis podem ter diferentes teores em função do *habitat* em que as plantas são cultivadas (CONTI et al., 2011). A variabilidade química corresponde bem aos resultados tanto de polimorfismo na germinação das sementes, quanto à taxa diferencial de crescimento das plântulas de *Hyptis suaveolens* (AZEVEDO et al., 2001).



#### 4 CONCLUSÃO

Tanto os fatores físicos como os químicos influenciam o cultivo *in vitro* de *Hyptis suaveolens*. Sendo a produção de constituintes voláteis, altamente influenciada pelo tipo de ambiente de cultivo e de material propagativo.

Para essa espécie não há a necessidade do uso de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro*.

Em relação aos fatores físicos, a densidade de fluxo de fótons irradiada nas plântulas com  $47 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  influenciou melhores respostas no crescimento vegetativo e a produção de constituintes voláteis.

Não há diferenças quantitativas entre os constituintes voláteis nos diferentes espectros de luzes. No entanto, a luz fluorescente causa maior efeito inibitório tanto para os constituintes voláteis quanto para os parâmetros de crescimento, e os espectros das lâmpadas azul, vermelha, branca ou combinações de vermelha com azul incrementam variáveis de crescimento das plântulas *in vitro*, sem afetar na produção de constituintes voláteis.

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

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Illinois: Allures Publishinh Corporation, 2007.
- AKOYUNOGLU, G.; ANNI, H. Blue light effect on chloroplast development in higher plants. In: SENGER, H. (Ed.). **Blue light effects in biological systems**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 397-406.
- AZEVEDO, N. R. et al. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Phytochemistry**, New York, v. 57, p. 733–736, 2001.
- AZEVEDO, N. R. et al. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, p. 205–216, 2002.
- CARVALHO, Y. G. S. et al. Taxa fotossintética de plântulas de *hyptis marruboides* epling cultivadas *in vitro* submetidas. In: CONGRESSO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DO CÂMPUS RIO VERDE DO IFGOIANO, 1., 2012, Rio Verde. **Anais...** Rio Verde: [s. n.], 2012. 1 CD ROM.
- CHANG, H. S. et al. Micropropagation of Calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot proliferation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 39, n. 2, p. 129-134, 2003.
- CHEE, R.; POOL, R. M. Morphogenetic responses to propate trimming, spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 114, n. 2, p. 350- 354, 1989.
- CONTI, B. et al. *Hyptis suaveolens* and *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) essential oils: qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae). **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 84, p. 219–228, 2011.
- DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention índices of monoterpenes and sesquiterpenes on methys silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 503, p. 1-24, 1990.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS III, W. W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.599-626, 1992.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. **American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, p.177-181, 1984.

EHLERINGER, J. R. et al. Leaf pubescence: effects on absorptance and photosynthesis in a desert shrub. **Science**, Washington, v. 192, p. 376-377, 1976.

ERIG, A. C.; SCHUC, W. S. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'BATUM' 1. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 488-490, dez. 2005.

ERIG, A. C.; SCHUC, W. S. Ação da 6-benzilaminopurina e da qualidade da luz na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* BORKH.) CVS. Galaxy e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 151-155, abr./jun. 2006.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GERSHENZON, J. E.; CROTEAU, R. Terpenoides. In: Rosenthal, G.A. ; Berenbaum, M. R. (Ed.). **Herbivores: their interactions with secondary plant metabolities**. 2nd. ed. New York: Academic, 1991. p. 165-219.

GONZALEZ, E. A. J. Cultivo de ápices y meristemas. In: PONCE, J. N. P. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Havana: Ediciones GEO, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p.183.

HARBONE, J. B. **Ecological biochemistry**. 4th ed. London: Academic, 1993.

HAY, R. K. M.; SVOBODA, K. P. Botany. In: HAY, R. K. M.; WATERMAN, P. G. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Essex: Longman, 1993. p. 5.

JAYA, B. P.; DUBEY, N. K. Evaluation of chemically characterised essential oils of *Coleus aromaticus*, *Hyptis suaveolens* and *Ageratum conyzoides* against storage fungi and aflatoxin contamination of food commodities. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 46, p. 754–760, 2011.

JO, E. et al. Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. **Plant Biotechnology Reports**, Heidelberg, v. 2, p. 207–212, 2008.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos y aplicaciones. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 41-77.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004. 531 p.

LIS-BALCHIM, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant oils against *Listeria monocitogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, p. 759-762, 1997.

LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LUCA, R. L. et al. Ação de diferentes faixas do espectro luminoso na otimização da produção de *Alternanthera brasiliana* L., uma planta medicinal. In: ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Anais...**Goiânia: Redbio, 2001. 6 p.

MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. **Quimica Nova**, São Paulo: v. 29, n. 6, p. 1203-1209, 2006.

MISHRA, S. B. et al. Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Haikou, v. 4, n. 9, p. 689-693, 2011.

MOK, M. C. et al. Cytokinin activity of N- phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). **Phytochemistry**, New York, v. 21, n. 7, p. 1509-1511, 1982.

MONDELLO, F. et al. In vivo activity of terpine-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic human species. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 5, p. 158, 2006.

MOREIRA, A. C. P. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, p. 28-33, 2010.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer, 2003. p. 3-35.

MULLER, P. et al. Non-photochemical quenching: a response to excess light energy. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 125, p. 1558-1566, 2001.

NAVES, V. L. **Crescimento, distribuição de matéria seca, concentração de clorofilas e comportamento estomático de mudas de três espécies florestais submetidas a diferentes níveis de radiação fotossinteticamente ativa**. 1993. 76 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. **Topic detection and tracking evaluation**. 2008. Disponível em : <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em: 20 maio 2013.

OLIVEIRA, M. J. et al. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 33, p. 275–285, 2005.

ORT, D. R.; BAKER, N. R. Consideration of photosynthetic efficiency at low light as major determinant of crop photosynthetic performance. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 26, p. 555-565, 1988.

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

PASTORE, J. F. B. et al. Phylogeny of the subtribe Hyptidinae (Lamiaceae tribe Ocimeae) as inferred from nuclear and plastid DNA. **Taxon**, Utrecht, v. 60, n. 5, p. 1317-1329, 2011.

PEREIRA et al. Indução e caracterização morfológica e bioquímica de calos de *Hyptis leucocephala* (Lamiaceae). **Sitientibus - Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 12, n. 1, p. 151–156, 2012.

PINHO, D. S. et al. Regeneração *in vitro* de melão, cv. 'Gaúcho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1083-1089, maio 2010.

PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. **Introdução a cultura de tecidos**. Lavras: ESAL, 1990. 73 p. (Apostila).

RADMANN, E. B. et al. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, p. 624-628, 2002.

RANA, V. S. et al. Volatile constituents of *Hyptis suaveolens* flowering twig oil. **The International Journal of Aromatherapy**, Philadelphia, v. 14, p. 198–201, 2004.

REY, M. S. et al. Regeneração *in vitro* de mesocótilos de arroz (*Oryza sativa* L.) regeneration *in vitro* of rice mesocotyles (*Oryza sativa* L.). **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 15, n. 1/4, p. 23-29, jan./dez. 2009.

RIBEIRO, M. N. O. et al. Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2388-2393, nov. 2009.

ROSSI, A. et al. Efeito de diferentes tratamentos de luz na micropropagação de porta-enxertos para *Prunus* spp. da série de clones I. S. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002. 5 p.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 2, p. 91-120, 2000.

SALES, J. F. et al. Influência do nível de irradiância no crescimento, produção e composição química do óleo essencial de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides* Epl.). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 389-396, abr./jun. 2009.

SANTOS, J. P. et al. Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes a concentrações de BAP. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 127-131, 2008.

SAS INSTITUTE. **SAS statistical software**: release 9.2. Cary, 2008.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Integrated management of post harvest Fusarium rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, p. 246-254, 2008.

SILVA, A. F. et al. Chemical composition of the essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, p. 1-7, 2003.

SILVA, M. H.; DEBERGH, P. C. The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 187-193, 1997.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004.

SOONTORNCHAINAKSAENG, P. et al. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L'Herit.) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. **Science Asia**, Bangkok, v. 27, p. 233-237, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenóides**. 2010. 57 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do sul, Caxias do Sul, 2010.

TRIPATI, A.; SHARMA, N.; SHARMA, V. In vitro efficacy of *Hyptis suaveolens* L. (Poit.) essential oil on growth and morphogenesis of *Fusarium oxysporum* f.sp.gladioli (Massey) Snyder & Hansen. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 503-512, 2009.

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

VELOZ, R. A.; TAKETA, A. C.; VILLARREAL, M. L. Production of podophyllotoxin from roots and plantlets of *Hyptis suave olens* cultivated *in vitro*. **Pharmacognosy Research**, Mumbai, v. 5, n. 2, p. 93–102, Apr./June 2013.

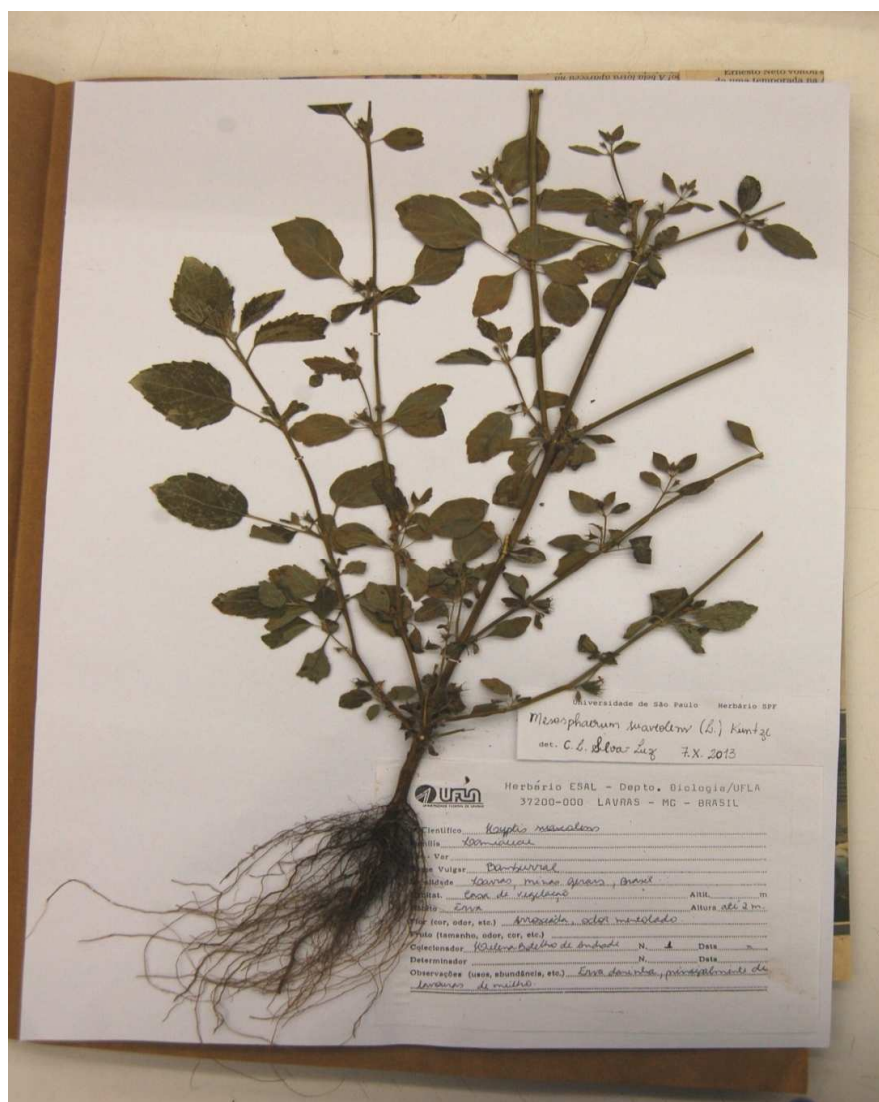
YOON, Y. J. et al. Impact of in vitro CO<sub>2</sub> enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of Phalaenopsis plantlets to *ex vitro* conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 65, p. 183-188, 2009.

ZIMMERMANN, R. H.; BROOME, O. C. Phoroglucinol and in vitro rooting of the apple cultivar cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 5, p. 648-652, Sept. 1981.



**ANEXOS**

## ANEXO A



Exsicata de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., modernamente identificada como *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze por Cintia L. Silva Luz em outubro de 2013, doada ao herbário da Universidade de São Paulo via herbário de Lavras para identificação.

Fonte: Universidade de São Paulo (SPF).