



**FÚLVIA MARIA DOS SANTOS**

**ADUBAÇÃO ORGÂNICA, AGRO-  
HOMEOPATIA E CULTIVO *in vitro* NO  
CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE  
CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE *Aloysia*  
*gratissima***

**LAVRAS – MG**

**2012**

**FÚLVIA MARIA DOS SANTOS**

**ADUBAÇÃO ORGÂNICA, AGRO-HOMEOPATIA E CULTIVO *in vitro*  
NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS  
DE *Aloysia gratissima***

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

**Orientador**

**Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto**

**LAVRAS – MG**

**2012**

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

Santos, Fúlvia Maria dos.

Adubação orgânica, agro-homeopatia e cultivo *in vitro* no crescimento e a produção de constituintes voláteis de *Aloysia gratissima* / Fúlvia Maria dos Santos. – Lavras : UFLA, 2012.  
132 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.  
Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.  
Bibliografia.

1. Alfazema-brasileira. 2. Plantas medicinais. 3. *Phosphorus*. 4. Agroecologia. 5. CG-MS. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.88388

**FÚLVIA MARIA DOS SANTOS**

**ADUBAÇÃO ORGÂNICA, AGRO-HOMEOPATIA E CULTIVO *in vitro*  
NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS  
DE *Aloysia gratissima***

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

APROVADA em 29 de fevereiro de 2012.

Dra Milene Alves de Figueiredo Carvalho      EMBRAPA

Dra Suzan Kelly Vilela Bertolucci              UFLA

Dra Fernanda Carlota Nery                        UFSJ

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva              UFLA

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2012**

Assim como todas as portas são diferentes  
aparentemente todos os caminhos são diferentes  
Mas vão dar todos no mesmo lugar  
O caminho do fogo é a água  
Assim como o caminho do barco é o porto  
O caminho do sangue é o chicote  
Assim como o caminho do reto é o torto  
O caminho do risco é o sucesso  
Assim como o caminho do acaso é a sorte  
O caminho da dor é o amigo  
O caminho da vida é a morte...

*Raul Seixas e Paulo Coelho*

A todas as pessoas que ajudaram com meu  
doutorado comprando um pão de mel ou um artesanato.

*Dedico*

A minha família terrena e espiritual

*Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e à Virgem da Conceição. ‘Daime’ Amor, Vida e Fé!

A minha família, que sempre incentivou o estudo. Aos meus pais e irmãos, pelo apoio e convivência feliz.

Carla, Pedro Paulo, Piero, Eliane, Fernanda, Sayuri e Juliana que, apesar da distância, estiveram sempre ao meu lado, me apoiando nos momentos mais difíceis dessa jornada. Não sei o que seria de mim sem a amizade de vocês!

À Universidade Federal de Lavras, MG e a Università di Pisa (UNIPi), Itália.

À Capes, CNPq e à Fapemig, pelo financiamento do projeto.

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto pela orientação.

Ao professor Daniel Melo de Castro, pelo apoio de professor e amigo.

À professora Luisa Pistelli que com competência, seriedade e doçura contribuiu de forma imensurável para meu crescimento profissional.

Às professoras Laura Pistelli e Bárbara Ruffoni, ao Pier Luigi Cioni, a Alessandra Bracca e ao Guido Flamini pelo apoio e conversas científicas.

Ao pessoal do Horto, prof<sup>a</sup>. Suzan, Luiz, Geraldo, Leandro (Dico) e Paulo e ao Evaldo: vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos professores, colegas e funcionários da Fitotecnia.

Aos amigos Diogo, Marcelo, Milene, Tina, Fran, Ana Luisa e Vanessa. As “reuniões” foram de muita valia na minha formação.

Aos professores Moacir Pasqual, José Carlos Fachinello, Daniel M. Castro, Maria das Graças Cardoso, Maria Laene Moreira de Carvalho e Gabriel José de Carvalho pela ajuda e apoio sempre.

Aos amigos da Itália que com sua amizade deixaram saudades: Chiara Peccioli, Giulio Cassano, Sara Barberini, Francesca D’angiollilo, Micheli

Leonardi, Sergio Casella e Bernardo Melai e todos do Laboratório de Fitoquímica, Faculdade de Farmácia, Faculdade de Genética, Faculdade de Agricultura da Universidade de Pisa e CRA - Sanremo, It. A Laura Faiella e Silvia Giovanelli, grandes amigas para todas as horas e a Lorenzo Picchi pelas boas risadas de todos os dias no laboratório e nos passeios de final de semana. Foi minha grande surpresa, com tanta doçura e gentileza.

A minha família italiana que não mediu esforços para que eu me sentisse bem na Itália, Renzo Iacoponi, Cosimo Giuri e “mia zia bella Giovanna” e Francesca, Francesco. Antonella e Carla Iacoponi, Sandra Ferretti, Lorenzo, Rafaella Ferretti, Rodolfo, Sonia e os “bimbos” Francesco e Alberto Ferretti, e a todos os outros que não tenho espaço para escrever aqui. Sou muito grata a todos vocês!

E com um agradecimento especial a minha tutora Luisa Pistelli, que com tanta competência e preocupação com meu bem estar, sempre presente e pronta a ajudar-me, foi meu presente de doutorado nessa reta final. Uma grande profissional e uma pessoa ímpar. Muito obrigada!

E aos meus amores, Luar, Homan, Dabih, Peteleco e Guardiã (*na memória*). Com vocês aprendi o verdadeiro significado das palavras “entrega” e “amor incondicional”.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Há dois tipos de sabedoria:  
a inferior e a superior.

A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe  
e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe.

Tenha a sabedoria superior.  
Seja um eterno aprendiz na escola da vida.

A sabedoria superior tolera;  
a inferior, julga;  
a superior, alivia;  
a inferior, culpa;  
a superior, perdoa; a inferior, condena.  
Tem coisas que o coração só fala  
para quem sabe escutar!

*Chico Xavier*

Quando si ride ci si lascia andare, si è nudi, ci si scopre.  
Quando uno ride, vedi un po' la sua anima.  
E poi quando si ride ci si muove, ci si scuote.  
Ci si scuote come un albero e si lascia per terra  
le cose che gli altri possono vedere e magari cogliere.  
Gli avari e coloro che non hanno niente da offrire, infatti, non ridono.

*Roberto Benigni*



## RESUMO GERAL

A espécie *Aloysia gratissima* tem a sinonímia *Lippia lycioides* (Cham.) e *Verbena gratissima*. Seus nomes populares são alfazema-do-brasil, erva-de-nossa-senhora, erva-da-graça, jurema e erva-santa. Tradicionalmente é utilizada no tratamento de problemas gastrintestinais e respiratórios. Objetivou-se identificar o efeito de diferentes tipos e doses de adubos orgânicos, diferentes dinamizações da homeopatia *Phosphorus* e o cultivo *in vitro* com os reguladores BAB, TDZ e IBA, no crescimento e no teor e qualidade de óleo essencial de alfazema-brasileira. Os resultados indicaram que a utilização da adubação orgânica no cultivo de plantas de *A. gratissima* alterou o crescimento vegetativo, como no rendimento e composição química de óleo essencial. As plantas de *A. gratissima* respondem positivamente a fertilização orgânica com esterco bovino e avícola. A biomassa seca da folha (BSF -72,58g) foi superior com fertilização de 6 kg m<sup>-2</sup> de adubo orgânico avícola, e com a dose de 12 kg m<sup>-2</sup> (62,13g) de esterco bovino. A fertilização avícola também proporcionou maior teor de óleo essencial e dobrou os teores do constituinte majoritário *trans*-pinocanfona. Observou-se também o efeito positivo da homeopatia *Phosphorus* sobre a germinação (21CH) e crescimento de *A. gratissima*, com as dinamizações 21CH e 24CH aumentando a biomassa da parte aérea, além de aumentar a produção de alguns compostos como  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno e *trans*-pinocanfona. A micropropagação da espécie *Aloysia gratissima*, com o meio WPM com 30g de sacarose produz plantas mais vigorosas e saudáveis. Para o cultivo *in vitro* o BAP e TDZ produz plantas com maior biomassa fresca e maior número de brotos. Plântulas cultivadas *in vitro* com diferentes reguladores de crescimento apresentaram aumento na produção de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, p-cimeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e germacreno D e B, quando comparadas com a planta matriz.

Palavras chave: *Aloysia gratissima*. Fertilização orgânica. Homeopatia. Óleo essencial.

## GENERAL ABSTRACT

*Aloysia gratissima* (Gilles ex Hook) Troncoso has the synonymy *Lippia lycioides* (Cham.) e *Verbena gratissima*. Popularly known as Jurema and Brazilian-lavander. It is a medicinal plant widely used for gastrointestinal and respiratory problems. The objective was to evaluate the effects of different levels of organic manure, different potencies of homeopathy Phosphorus and *in vitro* culture with regulators BAB, TDZ and IBA on plant growth, besides essential oil content and chemical compounds of Brazilian-lavender. The results showed that the plants *A. gratissima* were influenced by the use of organic fertilization on vegetative growth, as the yield and chemical composition of essential oil. Plants respond positively for organic fertilization with cattle and chicken manure. The leaf dry biomass (LDB-72.58 g) was higher using 6 kg m<sup>-2</sup> of chicken manure and 12 kgm<sup>-2</sup> for cattle manure (62.13 g). The chicken manure also increased the content of essential oil and doubled the levels major constituent trans-pinocamphone. There was a positive effect on the germination homeopathy *Phosphorus* (21CH) and growth of *A. gratissima* with potencies 21CH and 24CH increasing shoot biomass. In addition there was enhancement compounds production as  $\alpha$  - and  $\beta$ -pinene and trans-pinocamphone. The micropropagation of *A. gratissima* species on WPM medium supplemented with 30 g of sucrose produces more vigorous and healthy plantlets. For *in vitro* culture BAP and TDZ producing plantlets with higher fresh biomass and greater number of shoots. Plantlets grown *in vitro* in different plant growth regulator treatments showed increased production of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, p-cymene,  $\beta$ -caryophyllene, and humulene- $\alpha$  germacrene D and B, when compared with the mother plant.

Keywords: *Aloysia gratissima*. Organic fertilization. Homeopathy. Essential oil.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Aspectos de plantas de *Aloysia gratissima* do horto medicinal da UFLA (A), detalhe de ramos sadios (B), detalhe das inflorescências de plantas localizadas no jardim clonal (C). UFLA, Lavras, 2012..... 20
- Figura 2 Carbocátion precursor dos monoterpenos. Fonte: DEWICK, 2002 ..... 34
- Figura 3 Principais anéis dos monoterpenos e rota metabólica a partir do cátion mentil/  $\alpha$ -terpinil. Fonte: DEWICK, 2002..... 35
- Figura 4 Proposição de rotas metabólicas para o pineno in plantas de *Hyssopus officinalis* (KARP, CROTEAU, 1992)..... 36
- Figura 5 Rota metabólica a partir do cátion FPP. Fonte: DEWICK, 2002 ..... 37

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

- Figura 1 Proposição de rotas metabólicas para o pineno in plantas de *Hyssopus officinalis* (KARP, CROTEAU, 1992)..... 52

#### ARTIGO 2

- Figure 1 Percentage of compounds in essential oil from 10 dynamizations and two controls (ethanol 70°GL and water) of *V. gratissima* – monoterpene hydrocarbons; oxygenated monoterpenes; sesquiterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes..... 94

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| Figure 2 | Hierarchical Cluster Analyses obtained from chemical composition of <i>V. gratissima</i> essential oils treated with homeopathic <i>Phosphorus</i> in comparison with two controls (distilled water and ethanol 70° GL).....  | 95  |
| ARTIGO 3 |   |     |
| Figura 1 | A. Proposta de de rota de biotransformação em plantas de hissopo ( <i>Hyssopus officinalis</i> ). B. Suspensão celular de <i>Picea abies</i> . (KARPA, CROTEAU, 1992; LINDMARK-HENRIKSSON 2003).....  | 108 |
| Figura 2 | Plantas de <i>A. gratissima</i> após 35 dias no cultivo <i>in vitro</i> com meio WPM e reguladores de crescimento. A. 0,1 mg L <sup>-1</sup> BAP; B. 4 mg L <sup>-1</sup> BAP; C. 0,5 mg L <sup>-1</sup> AIB; D. WPM; E. 0,11 mg L <sup>-1</sup> TDZ; F. 0,33 mg L <sup>-1</sup> TDZ; G. 0,55 mg L <sup>-1</sup> TDZ; H. Detalhe da raiz nas plantas em WPM sem regulador de crescimento. UFLA, Lavras, 2012..... | 119 |

## LISTA DE GRÁFICOS

### ARTIGO 1

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Gráfico 1 | Efeitos de diferentes doses de esterco bovino na biomassa seca de folha (BSF) e raiz (BSR) (A), relação raiz: parte aérea (R/PA) e biomassa seca de caule (BSC) (B), altura e diâmetro de caule (C). *Teste F ( $p \leq 0,05$ ). UFLA, Lavras, 2012.....  | 60 |
| Gráfico 2 | Efeitos de diferentes doses de esterco avícola na biomassa seca de folha (BSF) e raiz (BSR) (A), relação raiz: parte aérea (R/PA) e biomassa seca de caule (BSC) (B), altura e diâmetro de caule (C). *Teste F ( $p \leq 0,05$ ). UFLA, Lavras, 2012..... | 61 |
| Gráfico 3 | Gráfico 3 Efeitos de diferentes doses de esterco bovino na biomassa seca total (BST) de plantas de <i>A. gratissima</i> . *Teste F ( $p \leq 0,05$ ). UFLA, Lavras, 2012.....   | 66 |
| Gráfico 4 | Efeitos de diferentes doses de esterco avícola na biomassa seca total (BST) de plantas de <i>A. gratissima</i> . *Teste F ( $p \leq 0,05$ ). UFLA, Lavras, 2012.....  | 66 |
| Gráfico 5 | Efeitos de diferentes doses de esterco bovino no teor (%) e rendimento (mL planta <sup>-1</sup> ) de óleo essencial em plantas de <i>Aloysia gratissima</i> . * Teste F ( $p \leq 0.05$ ). UFLA, Lavras, 2012.....  | 68 |
| Gráfico 6 | Efeitos de diferentes doses de esterco avícola no teor (%) e rendimento (mL planta <sup>-1</sup> ) de óleo essencial em plantas de <i>Aloysia gratissima</i> . * Teste F ( $p \leq 0.05$ ). UFLA, Lavras, 2012.....                                       | 69 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Gráfico 7 | Porcentagem de compostos no óleo essencial de plantas de <i>A. gratissima</i> cultivadas com diferentes doses de esterco orgânico bovino e avícola - hidrocarbonetos monoterpênicos; monoterpênicos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados. UFLA, Lavras, 2012.....   | 75  |
| Gráfico 8 | Porcentagem de monoterpênicos advindos da rota metabólica do $\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno em plantas de <i>A. gratissima</i> cultivadas com diferentes doses de esterco orgânico bovino (AB) e avícola (AA). UFLA, Lavras, 2012.....  | 76  |
| ARTIGO 3  |   |     |
| Gráfico 1 | Composição (%) de alguns compostos voláteis da parte aérea da planta matriz <i>Aloysia gratissima</i> e das plantas <i>in vitro</i> cultivadas em diferentes tratamentos após 45 dias. UFLA, Lavras, 2012. <b>A.</b> Planta matriz; <b>B.</b> WPM; <b>C.</b> 0,11 mg L <sup>-1</sup> TDZ; <b>D.</b> 0,33 mg L <sup>-1</sup> TDZ; <b>E.</b> 0,55 mg L <sup>-1</sup> TDZ; <b>F.</b> 0,1 mg L <sup>-1</sup> BAP; <b>G.</b> 4 mg L <sup>-1</sup> BAP; <b>H.</b> 0,5 mg L <sup>-1</sup> AIB. UFLA, Lavras, 2012..... | 123 |
| Gráfico 2 | Porcentagem de compostos em plantas de <i>A. gratissima</i> cultivadas <i>in vitro</i> com diferentes reguladores de crescimento – hidrocarbonetos monoterpênicos; monoterpênicos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos. UFLA, Lavras, 2012.....  | 126 |

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Porcentagem da área relativa da composição química dos compostos majoritários <sup>§</sup> do óleo essencial de <i>A. gratissima</i> obtidos pelas diferentes fontes e doses de adubos orgânicos, em comparação com o controle (média de três repetições). UFLA, Lavras, 2012..... | 71 |
|----------|--|----|

### ARTIGO 2

|         |  |    |
|---------|--|----|
| Table 1 | Effects of different dynamizations <i>Phosphorus</i> together with two controls (distilled water and ethanol 70° GL) on the linear growth, the production of biomass and essential oil yield and efficiency in <i>Verbena gratissima</i> plants..... | 88 |
| Table 2 | Chemical composition of <i>Verbena gratissima</i> essential oils obtained by homeopathic <i>Phosphorus</i> in comparison with two controls (distilled water and ethanol 70° GL).....   | 91 |

### ARTIGO 3

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| Tabela 1 | Crescimento vegetativo de plantas de <i>A. gratissima</i> em dois tipos de meios de cultura e duas concentrações de sacarose, após 35 dias de cultivo. UFLA, Lavras, 2012.....  | 116 |
| Tabela 2 | Efeito dos reguladores de crescimento na biomassa fresca (BF, g); comprimento de brotação (CB, cm); número de par de folha (NPF); número de brotos (NB) e tamanho da raiz (TR, cm) das brotações do segmento nodal de <i>A. gratissima</i> .. | 118 |
| Tabela 3 | Porcentagem da área relativa da composição química do óleo essencial de <i>A. gratissima</i> obtidos pelas diferentes tratamentos <i>in vitro</i> e da planta matriz. UFLA, Lavras, 2012.....   | 124 |

## SUMÁRIO

|       |   |     |
|-------|---|-----|
|       | <b>PRIMEIRA PARTE</b>   |     |
| 1     | <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | 17  |
| 2     | <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....  | 18  |
| 2.1   | A espécie <i>Aloysia gratissima</i> .....   | 18  |
| 2.2   | Composição química e atividades biológicas de <i>A. gratissima</i> .....  | 21  |
| 2.3   | Adubação orgânica.....  | 22  |
| 2.4   | Agro-homeopatia.....  | 27  |
| 2.5   | Produção de constituintes voláteis na cultura <i>in vitro</i> .....   | 31  |
| 2.6   | Metabolismo secundário.....   | 33  |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 38  |
|       | <b>SEGUNDA PARTE</b>  |     |
|       | <b>ARTIGO 1 Adubos orgânicos no crescimento e produção de óleo essencial de alfazema-brasileira</b> .....   | 48  |
| 1     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 50  |
| 2     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 52  |
| 2.1   | Material vegetal.....   | 52  |
| 2.2   | Análise de crescimento .....  | 53  |
| 2.3   | Extração de óleo essencial.....   | 55  |
| 2.4   | Análises químicas.....  | 55  |
| 2.4.1 | Identificação de compostos.....   | 56  |
| 3     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 56  |
| 3.1   | Análise de crescimento.....   | 56  |
| 3.2   | Teor e rendimento de óleo essencial.....  | 67  |
| 3.3   | Composição química.....   | 69  |
| 4     | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 77  |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 78  |
|       | <b>ARTIGO 2 Characterization of Essential Oil and Effects on Growth of <i>Verbena gratissima</i> Plants Treated with Homeopathic Phosphorus</b> ..... | 83  |
|       | <b>EXPERIMENTAL</b> .....   | 96  |
|       | <b>REFERENCES</b> .....   | 98  |
|       | <b>ARTIGO 3 Indução de compostos voláteis <i>in vitro</i> em plantas de <i>Aloysia gratissima</i></b> .....   | 101 |



|              |  |     |
|--------------|--|-----|
|              | <b>Lista de Abreviaturas</b> .....   | 103 |
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 104 |
| <b>2</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 109 |
| <b>2.1</b>   | <b>Material vegetal</b> .....  | 109 |
| <b>2.2</b>   | <b>Meio de cultura e Fonte de explante</b> .....                                     | 109 |
| <b>2.3</b>   | <b>Reguladores de crescimento</b> .....  | 111 |
| <b>2.4</b>   | <b>Micro-extração em fase solida acoplada a cromatografia gasosa (SPME-CG)</b> ..... | 112 |
| <b>2.4.1</b> | <b>Análises químicas</b> .....   | 112 |
| <b>2.4.2</b> | <b>Identificação de compostos</b> .....  | 113 |
| <b>3</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 114 |
| <b>3.1</b>   | <b>Meio de cultura e fonte de explante</b> .....                                     | 114 |
| <b>3.2</b>   | <b>Reguladores de crescimento</b> .....  | 116 |
| <b>3.3</b>   | <b>Compostos voláteis por SMPE</b> .....   | 120 |
| <b>4</b>     | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 126 |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 127 |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A política pública brasileira está mudando sua atuação frente à cadeia de produção e uso de plantas medicinais desde 2005 com a publicação da Portaria 971 e do Decreto 5.813 (BRASIL, 2006a, 2006b).

Nas Políticas Públicas de Plantas Medicinais está inserida a Agricultura Familiar e com isso a agricultura orgânica, quando se refere à ampliação do acesso às plantas medicinais e fitoterápicos pelos usuários do SUS. Para o fornecimento da planta medicinal *in natura*, deverão ser garantidos critérios relativos ao setor produtivo primário que envolve a Agricultura Familiar, tal como: o fornecimento das espécies constantes cuja produção seja garantida pelas boas práticas de cultivo orgânico (SILVA; MORAES, 2008).

Essas políticas incentivam os pequenos produtores a cultivarem as plantas medicinais de interesse do SUS, produzindo plantas de qualidade, além de evitar o problema de extrativismo que muitas espécies medicinais estão sofrendo com o uso e coleta indiscriminada pelos mateiros e as populações locais.

Visando ao cultivo orgânico de qualidade, temos a publicação da Instrução Normativa nº 7 (19/05/99) que estabelece as normas da produção orgânica no Brasil e recomenda a aplicação do cultivo orgânico e da Homeopatia pelos produtores rurais (BRASIL, 1999).

No cultivo orgânico, temos aquele com adubação das plantas com esterco bovino e avícola e a agro-homeopatia. A agro-homeopatia confere para a maior parte das espécies plantas com maior rendimento e teor de princípios ativos, aumento da resistência a parasitas e doenças, melhoria de condições debilitadas, florescimento, quebra de dormência de sementes e produção de mudas sadias (ANDRADE et al., 2001; BOFF, 2009; CARVALHO et al., 2003, 2004; SANTOS et al., 2011).

Dentre os insumos que maximizam a produção das culturas, a adubação é uma das responsáveis pela elevação da produtividade e qualidade dos produtos obtidos. As plantas medicinais e aromáticas como qualquer outra cultura, dependem de suprimento adequado de nutrientes para boas produtividades agrícolas. Neste sentido, a adubação orgânica é fonte de nutrientes para as plantas que além de permitir suprimento adequado contribui para a melhoria das qualidades físicas, químicas e biológicas do solo (CORRÊA et al., 2010).

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A espécie *Aloysia gratissima***

A família Verbenaceae compreende 100 gêneros distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil, há 22 gêneros caracteristicamente aromáticos, como *Lippia*, *Aloysia*, *Vitex*, *Verbena* e *Lantana* (SALIMENA et al., 2010).

O gênero *Aloysia* inclui 30 espécies, distribuídas nas Américas, indo dos Estados Unidos até à Patagônia. A espécie *A. gratissima* é nativa do México ao Noroeste da Argentina, concentrando-se na região Sul do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie *Aloysia gratissima* tem a sinonímia *Lippia lycioides* (Cham.) e *Verbena gratissima*. Seus nomes populares são: alfazema-do-brasil, jurema, erva-de-nossa-senhora, erva-da-graça e erva-santa (LORENZI; MATOS, 2002).

Tradicionalmente é utilizada no tratamento de problemas gastrointestinais e respiratórios. Algumas espécies de *Lippia* têm ação antimalarial e atividade citostática. Em muitos casos, são utilizadas as flores e a parte aérea, na forma de infusão ou decocção (LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie *A. gratissima* é um arbusto que pode alcançar três metros de altura, com padrão irregular de crescimento. As folhas são simples, opostas, às vezes alternadas, inteiras ou dentadas, lanceoladas, macias ou subcoriáceas, com brotos fortes e herbáceos. Suas flores são brancas, fragrantas, em agrupamentos axilares solitários ou geminados ou, ainda, em inflorescências paniculadas e terminais, com floração intensa. Com folhagem persistente, floresce na primavera e no verão (Figura 1). Planta considerada ornamental por sua floração intensa e aroma agradável, também medicinal e melífera (CARDOSO, 2005).

A propagação de *A. gratissima* pode ser por via sexuada (sementes) ou por via assexuada ou vegetativa, a partir de estacas. Para a propagação assexuada de *A. gratissima*, foi determinado em estudos recentes que o tipo de estaca influencia significativamente na percentagem de enraizamento, sendo a estaca herbácea a mais indicada, assim como substratos ricos em matéria orgânica influencia na propagação sexuada (SANTOS et al., 2009).



Figura 1 Aspectos de plantas de *Aloysia gratissima* do horto medicinal da UFLA (A), detalhe de ramos saudáveis (B), detalhe das inflorescências de plantas localizadas no jardim clonal (C). UFLA, Lavras, 2012.

## 2.2 Composição química e atividades biológicas de *A. gratissima*

Além dos efeitos no desenvolvimento das espécies, pesquisas têm mostrado a influência do ambiente na produção de metabólitos secundários vegetais, quanto a sua qualidade e a quantidade. Muitos deles destacam-se pela sua importância como princípios ativos de plantas (ALVES, 2003; CASTRO et al., 2001; PINTO et al., 2007; SALMIEN et al., 1999; SANTOS et al., 2011).

Para *A. gratissima*, Ricciardi et al. (2006) observaram que, de acordo com a época de colheita, no outono e na primavera, ocorriam alterações qualitativas no seu óleo essencial, obtendo resultados bem diversos de cetonas monoterpênicas e hidrocarbonetos sesquiterpenos. Nas espécies provenientes do Brasil, do Uruguai e da Argentina são encontrados nas folhas: 1,8 cineol, limoneno, sabineno,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -bisaboleno (SOLER; DELLACASSA; MOYNA, 1986); porém, nas inflorescências, os componentes são pulegona, limoneno, tuiona e espatulenol (ZYGADILLO et al., 1995).

A qualidade de irradiância influencia na quantidade e qualidade do óleo essencial de *A. gratissima*, sendo o maior teor de óleo essencial a pleno sol. O óleo essencial das inflorescências é mais eficiente no controle dos microorganismos *Streptococcus pneumonea* e a levedura *Candida albicans* além da atividade para muitas bactérias gram-positivas responsáveis por infecções do trato respiratório em humanos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*) (CÁCERES et al., 1993).

Para a importância agrícola, em estudos da ação fungitóxica do óleo essencial total das folhas de *A. gratissima*, Pinto et al. (2007) verificaram uma inibição no crescimento micelial em três concentrações (20 ppm, 100 ppm e 500 ppm) para o fungo *C. gloeosporioides*; para o fungo *F. oxysporium* apenas a concentração de 500 ppm foi significativa para tal inibição.

Outras ações de importância farmacêutica são descritas, como sua atividade citostática, atividade antimalarial para o *Plasmodium falciparum* e *P. berghei*, atividade para o *Schistosoma mansoni* e atividade larvívora ao *Aedes aegypti* (CRAVEIRO et al., 1981). Além dessas atividades, o óleo essencial da espécie de *Aloysia* é descrito apresentando atividade anestésica local (timol) e atividade analgésica (ABENA et al., 2003; SOUZA-BRITO; SOUZA-BRITO, 1993).

A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, implementa o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF), estabelecendo diretrizes e ações que contemplam a produção de plantas medicinais de forma orgânica, isenta de contaminantes químicos e de qualidade (BRASIL, 2006b).

O presente estudo teve como objetivos identificar o efeito de diferentes doses de adubos orgânicos, diferentes dinamizações da homeopatia *Phosphorus* no crescimento vegetativo e no teor de óleo essencial de alfazema-brasileira, como investigar a propagação e a produção de constituintes voláteis *in vitro* em plantas de *A. gratissima*.

### **2.3 Adubação orgânica**

Em confronto à Agricultura tradicional, temos a Agricultura Orgânica, método alternativo de produção que visa à maior sustentabilidade, melhores condições de trabalho ao agricultor (sem agrotóxicos e, por conseguinte, alimentos mais saudáveis) e menor agressão ao ambiente (VASCONCELOS, 2009).

O sistema orgânico de produção, também chamado de Agricultura Orgânica, foi proposto pelo inglês Albert Howard, no início do século XX, que fez pesquisa agrícola na Índia, por quase 40 anos (TRIVELLATO; FREITAS,

2003). Howard observou que os agricultores locais não utilizavam fertilizantes químicos, nem agrotóxicos no cultivo de suas lavouras e, no entanto, as plantas e os animais de tração usados no trabalho agrícola apresentavam menor incidência de doenças do que aqueles conduzidos de forma convencional, na estação experimental onde trabalhava. Assim sendo, conduziu vários experimentos que o levaram a reconhecer que o fator essencial para eliminação das doenças em plantas e animais era a fertilidade do solo (VASCONCELOS, 2009).

Nos tratos culturais que maximizam a produção das culturas, para a maioria das espécies, a adubação é uma das responsáveis pela elevação da produtividade e qualidade dos produtos obtidos. As plantas medicinais e aromáticas como qualquer outra cultura, dependem de suprimento adequado de nutrientes para boas produtividades agrícolas. Neste contexto, a adubação orgânica é fonte de nutrientes para as plantas que além de permitir suprimento adequado contribui para a melhoria das qualidades físicas, químicas e biológicas do solo (CORRÊA et al., 2010).

Outro avanço na Agricultura Orgânica foi a inclusão do uso da homeopatia em sistemas agrícolas. O que contribuiu para o desenvolvimento de estudos, a partir da inclusão dessa prática na Instrução Normativa nº 7 (19/05/99), que dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais, oficializando assim a homeopatia como insumo permitido na agropecuária orgânica (BRASIL, 1999).

Conforme descrito por Lisboa et al. (2007), o crescimento da agricultura orgânica tem despertado a necessidade de se desenvolver técnicas para melhor gerenciar este sistema de produção agrícola, tornando-o mais eficiente, sobretudo no manejo dos nutrientes essenciais. Neste contexto, os adubos orgânicos, de origem animal ou vegetal, e o nitrogênio presente na matéria orgânica do solo destacam-se como fontes fornecedoras de N às plantas.



A utilização do adubo orgânico em relação à aplicação de fertilizantes químicos é significativa, principalmente pela liberação gradual dos nutrientes na medida em que são demandados para o crescimento da planta. Se os nutrientes forem imediatamente disponibilizados no solo, como ocorre com os fertilizantes químicos, podem ser perdidos por volatilização (em especial o nitrogênio), fixação (fósforo) ou lixiviação (principalmente o potássio) (SEVERINO et al., 2004).

Há poucas pesquisas com o uso de adubação orgânica em plantas medicinais, porém tendo resultados expressivos em trabalhos com *Baccharis trimera* (Less.) DC, *Achillea millefolium* L., *Ocimum selloi* Benth, *Origanum vulgare* L., dentre outras (CORRÊA et al., 2010; COSTA et al., 2008; SCHEFFER, 1998; SILVA et al., 2006).

No entanto, as informações sobre seu uso são bastante limitadas, o que justifica a necessidade de se realizar pesquisas para viabilizar seu emprego como fertilização alternativa e eficiente (ARAUJO et al., 2007).

Dentre os materiais orgânicos, o esterco é um daqueles mais encontrados em diferentes regiões do Brasil. Esse material é produzido por diferentes espécies de animais, como a vaca, cavalo, porco e frango. A produção média diária de esterco desses animais é bem significativa. Uma vaca pesando 453 kg produz 23,5 kg de esterco por dia, um cavalo de 385 kg produz 16,3 kg, um porco de 72 kg produz 3,4 kg de esterco e um frango pesando 1,6 kg produz 100 g de esterco + urina (TRANI et al., 2011).

Esterco bovino tem níveis elevados de salinidade, e dependendo da sua proporção no substrato, pode afetar a CE na mistura com outros materiais e, por conseguinte, restringir o seu valor. Assim, os resíduos devem ser analisados, com vista à exploração do potencial agrícola e redução da carga poluente no meio ambiente, causada por eliminação inadequada. O conhecimento sobre as propriedades nutricionais e físico-química de resíduos orgânicos pode ajudar a

determinar as proporções destes materiais para a produção de substrato e meio adequado para o crescimento das plantas (HIGASHIKAWA; SILVA; BETTIOL, 2010).

O esterco de galinha é o componente mais rico em nutrientes, em comparação com o esterco bovino e o composto orgânico, sendo também o resíduo, com os maiores teores de nitrogênio total, N-amônio e fósforo, além de Ca, S e B (HIGASHIKAWA; SILVA; BETTIOL, 2010). Além do que auxiliam no aumento da produção de algumas culturas e na redução de fitopatógenos que sobrevivem no solo (BLUM et al., 2003).

Os teores de componentes químicos (N, P, K, Ca e Mg) variam conforme a origem do esterco avícola, onde o nitrogênio (2,6-3,0% de N), fósforo (3,9-4,5% de P) e potássio (1,0-3,0% de K) estão em níveis elevados. A adição ao solo de cama aviária aumenta o pH e diminui o teor de alumínio trocável, diminuindo assim, os efeitos tóxicos deste íon para as plantas (BLUM et al., 2003).

Um composto ou adubo orgânico estabilizado deve ter relação C/N igual ou menor que 18, podendo ser aplicado ao solo sem causar qualquer dano às plantas, aumentando a eficiência do uso de nutrientes. No caso do composto ou adubo apresentar relação C/N alta (baixo teor de nitrogênio ou alto teor de carbono), os micro-organismos, para decomporem esse resíduo, irão utilizar o nitrogênio do solo, competindo com as plantas, causando deficiência de nitrogênio nas mesmas. Por outro lado, se o composto apresentar relação C/N muito baixa (rico em nitrogênio), haverá rápida perda de nitrogênio, principalmente por volatilização, fazendo com que a planta não o aproveite adequadamente (KIEHL, 1985; PEIXOTO, 2000).

A recomendação para o uso de adubo orgânico é de 30 a 50 t ha<sup>-1</sup> de esterco bovino bem curtido ou compostado, sendo a maior dose para solos

arenosos. Caso o esterco seja de galinha, a recomendação é de  $\frac{1}{4}$  da dose recomendada para o esterco bovino (TRANI et al., 1996).

Nas doses de adubação orgânica 0; 1; 2; 4 e 8 kg m<sup>-2</sup> de esterco bovino em plantas de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., verificou-se que o aumento nas doses resultou em maiores rendimentos de biomassa, porém, em decréscimo no teor de óleo essencial (MING, 1998).

Estudo de doses de esterco bovino curtido (0, 3, 6, 9 e 12 kg m<sup>-2</sup>) em plantas de *Aloysia triphylla* sugere que a dose de 12 kg m<sup>-2</sup> proporcionou maior ganho de biomassa seca e a dose de 9 kg m<sup>-2</sup> de esterco bovino maior teor de óleo essencial (BRANT et al., 2010).

Plantas de *Ocimum selloi* cultivadas com esterco bovino (0; 3; 6; 9 e 12 kg m<sup>-2</sup>) e esterco avícola (0; 1,5; 3; 4,5 e 6 kg m<sup>-2</sup>) proporcionou ganhos de biomassa seca foliar atingindo o valor máximo de 0,23 g planta<sup>-1</sup> com 8,1 kg m<sup>-2</sup> de esterco bovino e 0,31 g planta<sup>-1</sup> com 4,0 kg m<sup>-2</sup> de esterco avícola. O chavicol foi o seu constituinte majoritário, com um incremento de aproximadamente 12% na biossíntese desse fitoconstituente, independente do tipo e da dose de adubação orgânica em relação ao controle (COSTA et al., 2008).

Rosal et al. (2011) estudando tipos de adubação orgânica em plantas de *Plectranthus neochilus* verificaram que a produção de biomassa seca total nas plantas adubadas com esterco avícola (30 t ha<sup>-1</sup>), esterco bovino (60 t ha<sup>-1</sup>) e composto (60 t ha<sup>-1</sup>), foi de 12,43; 8,33 e 3,31 vezes maior que o controle (sem adubo). Na análise química, para o tratamento com adubação bovina, verificaram quatro constituintes majoritários: óxido de cariofileno (33,53%), 1-epi-cubenol (5,74%), cubenol (13,67%) e  $\alpha$ -cadinol (20,39%). Para a adubação avícola, foram três constituintes majoritários: óxido de cariofileno (43,70%), cubenol (8,62%) e  $\alpha$ -cadinol (11,93%).

## 2.4 Agro-homeopatia

A homeopatia é uma ciência que se baseia no vitalismo. Ao longo da história do pensamento humano, surgiram várias escolas filosóficas e científicas que se preocuparam com a interpretação do fenômeno vida, com base na existência de força além da própria matéria (ROSSI, 2008).

A agricultura vitalista é a prática das bases agroecológicas e do princípio ou força vital que rege a natureza empregada na organização do agroecossistema visando à produção de alimentos saudáveis dentro de um equilíbrio dinâmico. É a agricultura que entende o princípio da vida e da morte (energia vital), e desse modo sabe que ambos estados do conceito da matéria são essenciais ao sistema produtivo de menor custo energético (CASALI; CASTRO; ANDRADE, 2006; ROSSI, 2008).

Conforme Rossi (2008), vitalismo é a doutrina que afirma a necessidade de um princípio irreduzível, sem divisor comum ao domínio físico-químico para explicar os fenômenos vitais, assim o corpo físico dos organismos vivos é animado e dominado pela força ou energia vital. A força vital é a unidade de ação que rege a vida física, conferindo-lhe as sensações próprias da consciência. Sendo a presença ou ausência deste princípio vital o responsável pela vida ou pela morte, respectivamente, e seu desequilíbrio gera o que chamamos de doença.

A homeopatia se fundamenta em quatro princípios: semelhança ou similitude, doses mínimas e dinamizadas, utilização de um único preparado por vez e experimentação em indivíduos saudáveis. As substâncias homeopáticas curam sintomas (sintomas não se curam) que são capazes de produzir em indivíduos saudáveis, sendo os sintomas de doença (patogênesias), quando experimentadas isoladamente e em doses diluídas e dinamizadas (ANDRADE et al., 2001;

CASALI et al., 2006; VITHOULKAS, 1980). Está um pouco confuso esse último período.

O conjunto “Diluição + Sucussão” é chamado de “Dinamização”. A dinamização é a técnica de adicionar energia cinética às diluições, agitando-as, por meio da sucussão, movimento ascendente e descendente que permite ao líquido o movimento em espiral. Contudo, a dinamização suscita energia das substâncias, por meio de diluições, seguidas de sucussões. Mediante técnicas homeopáticas, essas substâncias tornam-se potentes e ativas (BARBOSA NETO, 2011; VITHOULKAS, 1980).

A preparação homeopática obedece normas precisas e definidas pela Farmacopeia Homeopática elaborada a partir das orientações de Hahnemann em 1810, na primeira edição do Organon (HAHNEMANN, 2001). Desde então, o fundador da Homeopatia e seus seguidores médicos ou farmacêuticos foram aperfeiçoando a técnica de “Dinamização”. Atualmente, existem as farmacopeias homeopáticas – manuais com a sistematização do preparo (BARBOSA NETO, 2011). No Brasil, há a Farmacopeia Homeopática Brasileira oficializada em 1977 e atualizada em 2002 com a publicação da segunda edição (CASALI et al., 2006).

Dentre as técnicas descritas no Organon e nas Farmacopeias, a escala de diluição mais utilizada, é a centesimal hahnemaniana (CH), em que, para cada gota da tintura-mãe, solução precursora dos preparados homeopáticos, são adicionadas 99 gotas de álcool, geralmente na concentração de 70%, ou seja, sempre diluída 1:99 vezes. Os preparados homeopáticos são feitos a partir de substâncias naturais provenientes dos reinos animal, mineral e vegetal ou de tecidos doentes (CASALI et al., 2006).

De acordo com Casali et al. (2006), a homeopatia sendo eficiente, não tóxica, de fácil elaboração, sem efeito colateral, fica na marginalidade da pesquisa, pois vai de encontro aos interesses econômicos das grandes empresas.

Um avanço para os estudos da homeopatia em sistemas agrícolas foi a inclusão dessa prática na Instrução Normativa nº 7 publicada no Diário Oficial da União (17/05/99), que dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais, oficializando assim a homeopatia como insumo permitido na agropecuária orgânica (BRASIL, 1999).

Casali, Castro e Andrade (2003) descrevem que os preparados homeopáticos quando aplicados visando equilíbrio ou ordem de situações de estresse em plantas, sua mobilidade permite responder com muita intensidade por meio de sua autorregulação que movimentará o metabolismo secundário ou até primário. Sendo de grande importância em plantas medicinais quando se objetiva aumentar a quantidade de metabólitos secundários e seu rendimento. Onde só é lugar, nada mais.

O uso de preparados homeopáticos na agricultura são incipientes, porém são relativamente comum nos países como Inglaterra, Itália e Cuba. No Brasil, têm-se o uso da homeopatia em plantas com resultados positivos no aumento da resistência a parasitas e doenças, melhoria de condições debilitadas, florescimento, quebra de dormência de sementes e produção de mudas saudáveis (ANDRADE et al., 2001; BOFF, 2009; CARVALHO et al., 2003, 2004).

Pesquisas com homeopatia em plantas são fundamentais, e não apresentam as dificuldades dos estudos em humanos, como o efeito placebo, problemas éticos e pode-se usar um pequeno grupo amostral. Ainda há a possibilidade de usar modelos agrônômicos controlados (luz, temperatura, umidades, etc) sem a interferência subjetiva do pesquisador e/ou do “pesquisado”, com sentimentos e ideias a respeito do processo de cura-doença (BETTI; BORGHINI; NANI, 2003).

A homeopatia aplicada às plantas permite o controle de pragas e doenças causadas por vírus, fungos e bactérias, além de incrementar a produção de biomassa, e segundo Rossi (2005), esta característica torna a homeopatia uma

opção ecológica para uso no campo, totalmente de acordo com as bases da Agroecologia e da Sustentabilidade.

Andrade et al. (2001) comprovaram que diversas soluções homeopáticas interferem na produção de cumarinas em chambá (*Justicia pectoralis*) quando o conteúdo de cumarina aumentou nas plantas tratadas com *Justicia* 3CH (54,35%), *Ácido Húmico* 3CH (55,10%), *Phosphorus* 3CH (40,49%), *Sulphur* 3CH (52,91%) e *Arnica montana* 3CH (42,16%), em comparação à testemunha (etanol 70% 3CH).

Carvalho (2001) verificou o efeito de *Natrum muriaticum* 2CH (cloreto de sódio) tanto em plantas de artemisia (*Tanacetum parthenium*) consideradas saudáveis, nas quais aumentou o teor de prolina nas folhas, quanto em plantas submetidas à deficiência hídrica, nas quais causou redução imediata desse teor.

A homeopatia *Phosphorus* é recomendada nos casos de excesso de transpiração por intolerância ao calor da espécie ou da variedade. Plantas exigentes, quando não adubadas adequadamente, respondem a *Phosphorus* com crescimento idêntico ao das plantas adubadas, estimulando o crescimento (RESENDE, 2009).

Faltam pesquisas com a homeopatia *Phosphorus*, para sua indicação e dinamização, sendo que de forma empírica, há a indicação de *Phosphorus* (4CH), para solos com deficiência em fósforo, principalmente os muito argilosos onde o fósforo fica adsorvido ao solo; para locais onde foram utilizados muitos agrotóxicos organofosforados como, por exemplo, os venenos para controle da formiga (mirex, aldrim, etc) e para plantas que receberam doses maciças de agrotóxicos organofosforados (GRUPO DE ESTUDOS DE HOMEOPATIA NA AGRICULTURA ALTERNATIVA - UEM; CENTRO DE APOIO AO PEQUENO AGRICULTOR - CAPA, 2004).

## 2.5 Produção de constituintes voláteis na cultura *in vitro*

A pesquisa e desenvolvimento da biotecnologia para a produção de metabólitos secundários têm recebido um grande impulso a partir de respostas muito positivas das células vegetais e tecidos cultivados *in vitro*. Argumentos em prol das culturas *in vitro* salientam as vantagens, ao longo dos anos, pela disponibilidade de material vegetal, de isolamento do processo e magnitude de reações químicas no crescimento controlado (BERTOLI et al., 2004).

Atualmente, poucas culturas produzem compostos secundários em quantidades úteis comercialmente, sendo necessários mais estudos visando à otimização deste processo de produção, bem como para a quantificação e a extração desses produtos (BUFFA FILHO et al., 2002; RAO; RAVISHANKAR, 2002; ZHOU; WU, 2006).

A produção de células e tecidos vegetais por meio de cultura de calos, raízes, plântulas, células em suspensão, fusão de protoplasto, etc. é estabelecida a partir dos objetivos que se pretende alcançar, sendo utilizados elicitores para a modulação da produção de metabólitos secundários (ANGELINI et al., 2003; BERTOLI et al., 2004; LUCCHESINI et al., 2009; RAO; RAVISHANKAR, 2002).

Para a micropropagação *in vitro* de plantas utilizam-se duas estratégias: a regeneração de calos, que gera alta porcentagem de variação somaclonal, não sendo ideal para a multiplicação clonal em larga escala e a multiplicação de brotos, utilizada na propagação clonal de diversas espécies em grande escala (PEREIRA et al., 2006).

No cultivo *in vitro*, os meios de cultura são constituídos de soluções salinas e açúcares, não sendo puramente nutritivos, mas influenciam o crescimento celular e a morfogênese pelas propriedades osmóticas (GEORGE, 1996).



Existem várias formulações de meios básicos no cultivo *in vitro*, mas o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com suas modificações e diluições, é o mais utilizado com sucesso para diversas espécies. Porém, para as espécies lenhosas, entretanto, tem-se utilizado o meio MS com ¼ de força (concentração de sais) e o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), do inglês “Wood Plant Medium” (BURDYN et al., 2006; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GUTIÉRREZ et al., 2011). O meio WPM contém 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de maior quantidade de potássio e íons sulfato, sendo amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (PASQUAL, 2001).

Entre os reguladores de crescimento utilizados *in vitro* existem as auxinas e as citocininas. As auxinas são hormônios vegetais produzidos principalmente nas regiões apicais que, transportados para outros locais da planta, participam do seu crescimento e diferenciação. As auxinas mais usadas são AIA (IAA = ácido indol-3-acético), AIB (IBA = ácido indol-3-butírico), ANA (NAA = Ácido naftalenoacético), 2,4-D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e picloran. O regulador de crescimento AIB (ácido indol-3-butírico) é muito eficaz para o enraizamento (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies. Induzem a divisão celular, a proliferação e a morfogênese da parte aérea. As citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina (CIN), benzilaminopurina (BAP ou BA), zeatina (Zea), isopentenil adenina (2ip) e tidiazuron (TDZ). O BAP é muito eficaz em cultura de ápices caulinares de espécies herbáceas e lenhosas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

As citocininas sintéticas, como o TDZ, são estáveis, mais resistentes às oxidases, além de terem eficiente resposta na cultura *in vitro* (MOK; MOK, 2001).

O uso de elicitores, como os reguladores de crescimento na produção de metabolismo secundários/especiais, na cultura *in vitro* têm-se mostrado como um recurso promissor (ANGELINI et al., 2003; BERTOLI et al., 2004; EILERT; GIBRALTARSKAYA; BOHLMAM, 1995; LUCCHESINI et al., 2009; PALAZÓN et al., 1995).

No contexto da produção *in vitro* de componentes voláteis de brotos de *Agastache rugosa* (Lamiaceae) quando comparados com a planta matriz, evidenciou-se maior produção de *in vitro* com os reguladores TDZ/Picloran para  $\alpha$ -pineno (0 – 25,9%) e com TDZ/AIA para limoneno (3,7 – 20,2%), regulador e planta matriz, respectivamente (ZIELINSKA et al., 2011).

Plantas de *Lantana camara* L cultivadas *in vitro*, apresentaram aumento na produção de mirceno e  $\alpha$ -felandreno com BA ( $0,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), *trans*-cariofileno e  $\beta$ -gurjuneno com TDZ ( $0,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e redução de  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno com IAA ( $0,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), quando comparadas com a planta matriz (AFFONSO et al., 2007).

Para a indústria farmacêutica, temos os metabólitos de alto valor e interesse medicinal produzidos na cultura *in vitro*, destacando-se a vinblastina (*Catharanthus roseus*) e taxol (*Taxus* sp.) (RAO; RAVISHANKAR, 2002).

## 2.6 Metabolismo secundário

Os óleos essenciais são umas das classes químicas mais abundantes nas plantas e sua aplicação biológica destaca-se pela função antimicrobiana, importante para a sobrevivência da planta contra as contaminações bacteriana e fúngica (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; DEWICK, 2002), além da sua ação insetisida, anticancerígena e antioxidante, como atuação no sistema nervoso central (SIMÕES et al., 2010).

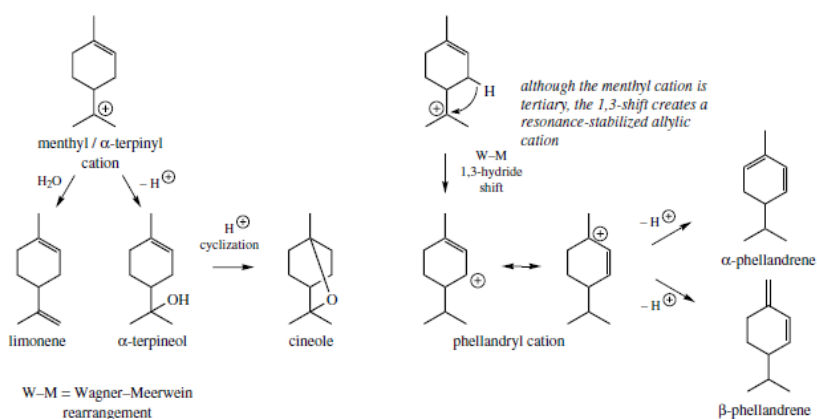


Figura 2 Carbocátion precursor dos monoterpênos. Fonte: Dewick (2002).

Os óleos voláteis ou essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Quimicamente, os óleos essenciais ou os compostos voláteis orgânicos (COV) são constituídos de derivados fenilpropanoides, na minoria, ou de terpenoides, majoritariamente. Os fenilpropanoides são formados a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico (SIMÕES et al., 2010).

Para os COV formados por terpenos, são descritas duas vias metabólicas que conduzem à terpenoides, a via do mevalonato e recentemente a mevalonato-independente, via do 5-fosfato-1-Deoxi-D-Xilulose (Via DXPS). As estruturas são racionalizadas por meio do uso extensivo de mecanismos carbocátion e subsequentes rearranjos do tipo Wagner-Meerwein (DEWICK, 2002).

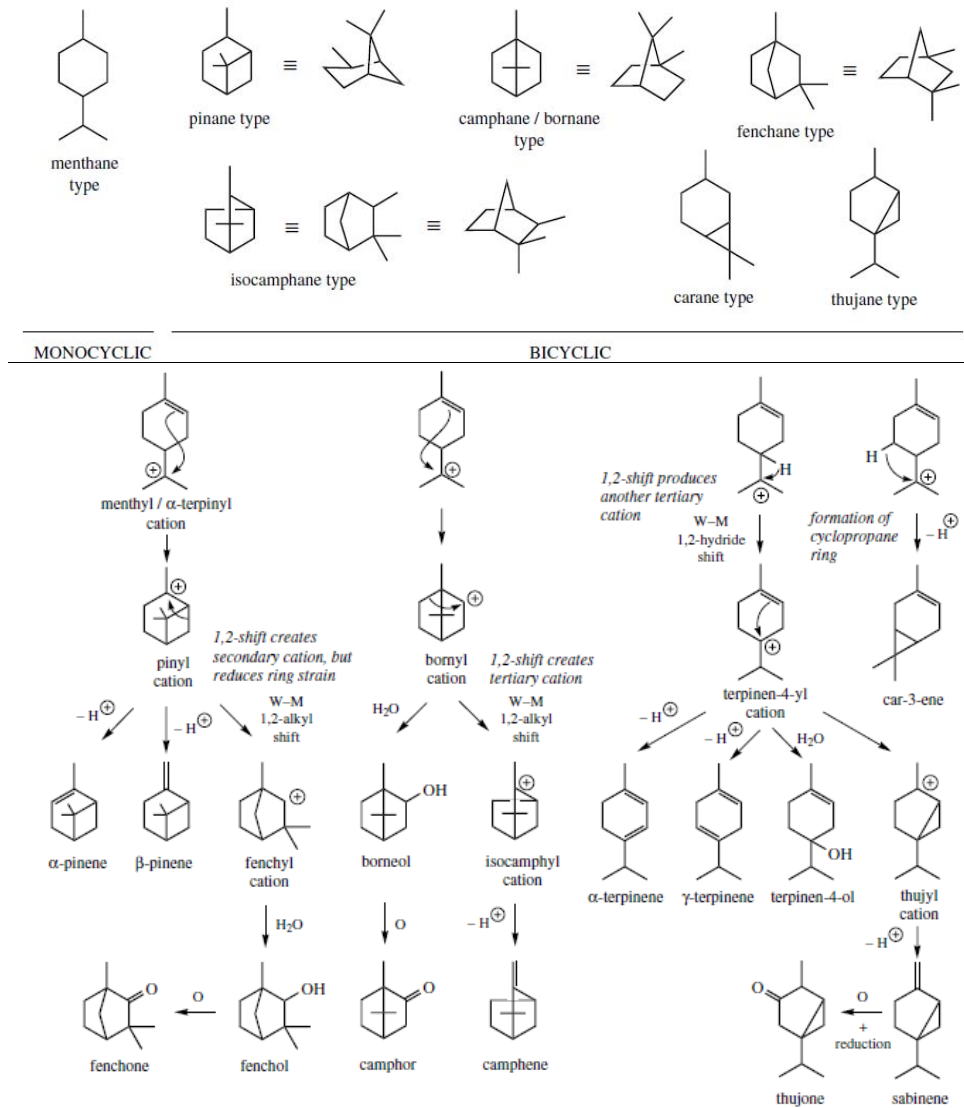


Figura 3 Principais anéis dos monoterpenos e rota metabólica a partir do cátion mentil  $\alpha$ -terpinil. Fonte: Dewick (2002)

Os Terpenoides podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isoprenoides incorporados. Sendo os principais constituintes dos COV, os monoterpenos (C10; 2 isoprenos) (Figura 2), sesquiterpenos (C15; 3

isoprenos) e diterpenos (C<sub>20</sub>; 4 isoprenos). A maioria dos terpenoides é formada nos cloroplastos pela via do 5-fosfato-1-Deoxi-D-Xilulose (Via DXPS) (DEWICK, 2002).

Para a formação dos monoterpenos, as enzimas monoterpeno ciclases produzem monoterpenos cíclicos (monocíclicos e bicíclicos) por meio de um mecanismo de múltiplas etapas que envolvem um intermediário universal, o cátion mentil/ $\alpha$ -terpinil o qual pode ser transformado em diversos compostos classificados como pinanos, fenchanos, boranos, tujanos e caranos de acordo com seu esqueleto molecular (Figura 3) (DEWICK, 2002).

De acordo com Karp e Croteau (1992), temos formação do mirtenol a partir do  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, como a formação do transpinocarveol e  $\alpha$ -terpineol a partir do  $\beta$ -pineno (Figura 4).

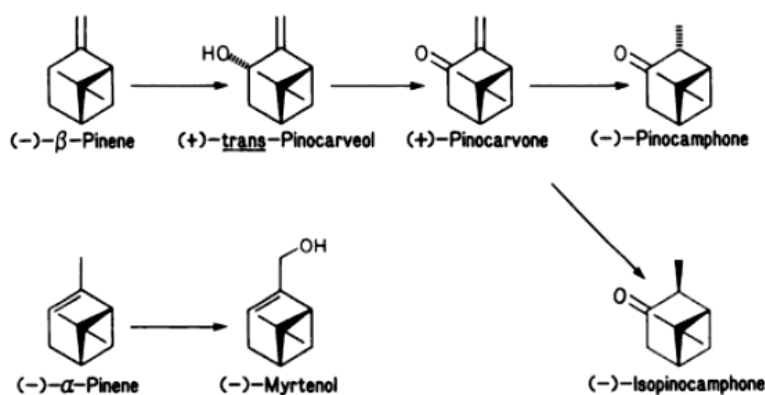


Figura 4 Proposição de rotas metabólicas para o pineno em plantas de *Hyssopus officinalis* (KARP, CROTEAU, 1992).

A formação dos sesquiterpenos se dá pela ação da enzima prenil transferase e tem como precursor fundamental o farnesil difosfato (FPP), a partir do geranyl difosfato (GPP). Com isso, a partir do cátion FPP temos a formação

dos cátions fundamentais dos sesquiterpenos, como podemos verificar na Figura 5 (DEWICK, 2002).

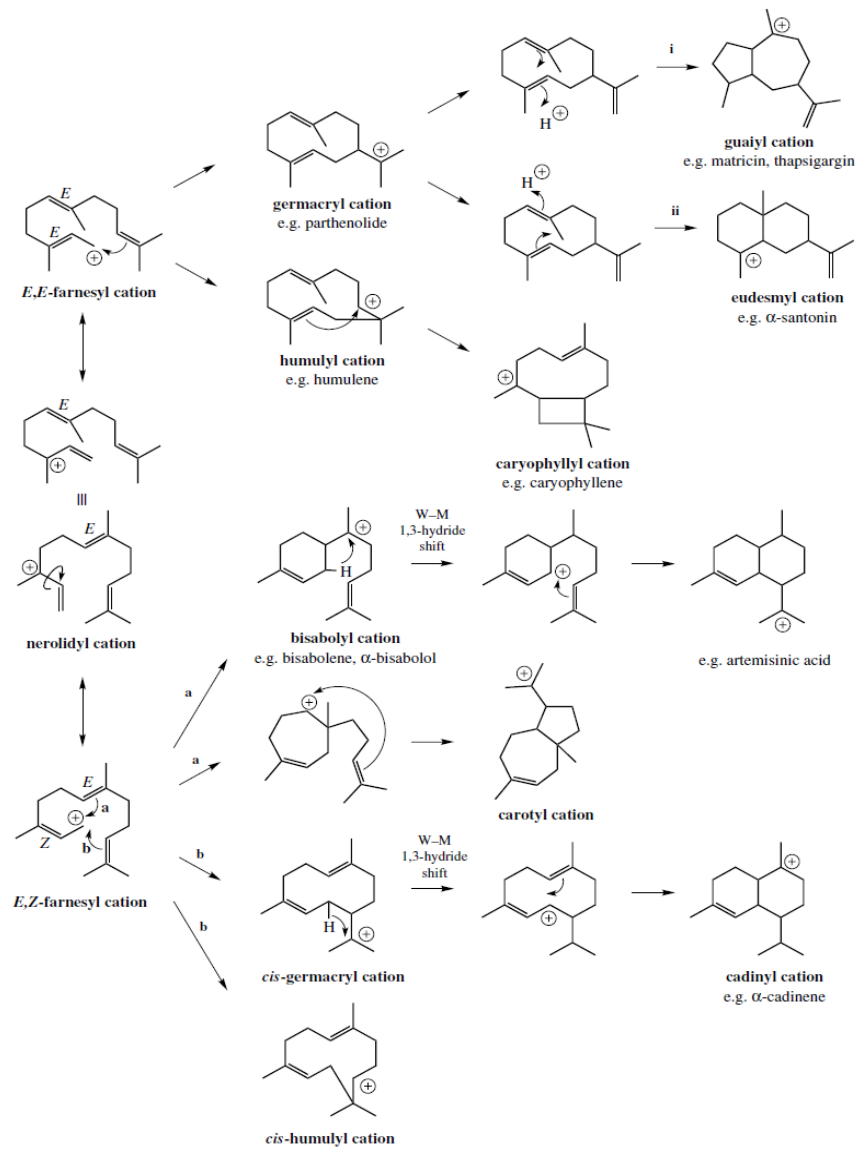


Figura 5 Rota metabólica a partir do cátion FPP. Fonte: Dewick (2002)

## REFERÊNCIAS

- ABENA, A. A. et al. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, n. 3, p. 231-236, 2003.
- AFFONSO, V. R. et al. Solid phase microextraction (SPME) analysis of volatile compounds produced by *in vitro* shoots of *Lantana camara* L. under the Influence of auxins and cytokinins. **Journal of Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 18, n. 8, p. 1504-1508, Aug. 2007.
- ALVES, M. N. **Alcalóides tropânicos em Brugmansia suaveolens (Willd.) Sweet (Solanaceae)**. 2003. 121 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- ANDRADE, F. M. C. et al. Efeito de homeopatas no crescimento e na produção de cumarina em chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 1, p. 19-28, out. 2001.
- ANGELINI, L. G. et al. Agronomic potential of *Reseda luteola* L. as new crop for natural dyes in textiles production. **Industrial Crops and Products**, London, v. 17, n. 2, p. 199-207, Apr. 2003.
- ARAÚJO, E. N. et al. Produção do pimentão adubado com esterco bovino e biofertilizante. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 5, p. 466-470, 2007.
- BARBOSA NETO, R. M. **Bases da homeopatia**. Disponível em: <<http://www.ruymadsen.com.br/basesdahomeopatia.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2011.
- BERTOLI, A. et al. Volatile constituents of micropropagated plants of *Bupleurum fruticosum* L. **Plant Science**, Shannon, v. 167, p. 807-810, 2004.

BETTI, L.; BORGHINI, F.; NANI, D. Plant models for fundamental research in homeopathy. **Homeopathy**, Cleveland, v. 92, n. 1, p. 129-130, Feb. 2003.

BLUM, L. E. B. et al. Produção de moranga e pepino em solo com incorporação de cama aviária e casca de pinus. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 627-631, out./dez. 2003.

BOFF, P. Saúde vegetal e a contribuição da homeopatia na transição ecológica da agricultura. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 3963-3966, 2009.

BRANT, R. S. et al. Produção de biomassa e teor do óleo essencial de cidrão em função da adubação orgânica. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 111-114, jan./fev. 2010.

BRASIL. **Decreto nº 5813**, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2006b. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm)>. Acesso em: 12 nov. 2011.

BRASIL. Instrução Normativa nº 7, de 17 de maio de 1999. Dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 99, n. 94, p. 11-14, 19 maio 1999. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS, série B**: textos básicos de saúde. Brasília, 2006a. 92 p.

BUFFA FILHO, W. et al. Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus ilicifolia*. **Eclética Química**, Araraquara, v. 27, n. 1, p. 403-416, 2002. Número especial.



BURDYN, L. et al. Direct shoot regeneration from leaf and internode explants of *Aloysia polystachya* [Gris.] Mold. (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 42, p. 235-239, May/June 2006.

CACERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections 2: evaluation of antifungal activity of seven American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 40, n. 3, p. 30-41, June 1993.

CARDOSO, J. C. W. **Níveis de luz e homeopatia sobre caracteres morfofisiológicos e óleo essencial e atividade fungitóxica do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Gilles & Hook.) Tronc.** 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

CARVALHO, L. M. **Diponibilidade de água, irradiância e homeopatia no crescimento e teor de partenolídeo em artemísia.** 2001. 139 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

CARVALHO, L. M. et al. Efeito da homeopatia na recuperação de plantas de artemísia [*Tanacetum parthenicum* (L.) Schultz- Bip] submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 2, p. 20-27, fev. 2004.

\_\_\_\_\_. Efeito de potências decimais da homeopatia de *Arnica montana* sobre plantas de artemísia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 1, p. 46-50, out. 2003.

CASALI, V. W. D.; CASTRO, D. M.; ANDRADE, F. M. C. Pesquisa sobre homeopatia em plantas. In: SEMINÁRIO SOBRE HOMEOPATIA NA PRODUÇÃO ORGÂNICA, 6., 2003, Piracicaba. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 16-25.

CASALI, V. W. D. et al. **Homeopatia bases e princípios.** Viçosa, MG: UFV, 2006. 149 p.

CASTRO, A. H. F. et al. Influence of photoperiod on the accumulation of allantoin in comfrey plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 49-54, 2001.

CORRÊA, R. M. et al. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.

COSTA, L. C. B. et al. Tipos e doses de adubação orgânica no crescimento, no rendimento e na composição química do óleo essencial de elixir paregórico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2173-2180, nov. 2008.

CRAVEIRO, A. A. et al. Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 44, n. 5, p. 598-601, Sept. 1981.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. New York: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

DEWICH, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: J. Wiley, 2002. 507 p.

EILERT, U.; GIBRALTARSKAYA, E.; BOHLMAM, J. Elicitor induction of furanocoumarin biosynthetic pathway in cell hydroalc of *Ruta graveolens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, n. 2, p. 155-161, Feb. 1995.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1, the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação**

**genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRUPO DE ESTUDOS DE HOMEOPATIA NA AGRICULTURA ALTERNATIVA; CENTRO DE APOIO AO PEQUENO AGRICULTOR.  
**Homeopatia simples**: alternativa para pequenos agricultores. Maringá, 2004.  
Disponível em;  
<<http://redeagroecologia.cnptia.embrapa.br/biblioteca/manejo/homeopatia/Homeopatia%20simples.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2011.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1999. v. 1, p. 507-515.

GUTIÉRREZ, I. E. M. et al. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 260-265, fev. 2011.

HAHNEMANN, S. **Organon da arte de curar**. São Paulo: Robe, 2001. 248 p.

HIGASHIKAWA, F. S.; SILVA, C. A.; BETTIOL, W. Chemical and physical properties of organic residues. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Campinas, v. 34, n. 5, p. 1743-1752, set./out. 2010.

KARP, F.; CROTEAU, R. Hydroxylation of (-)- $\beta$ -pinene and (-)- $\alpha$ -pinene by a cytochrome P-450 system from hyssop (*Hyssopus officinalis*). In: PETROSKI, R. J.; MCCORMICK, S. P. (Ed.). **Secondary-metabolite biosynthesis and metabolism**. New York: Plenum, 1992. p. 253-260.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1985. 492 p.

LISBOA, C. C. et al. Efeito da homeopatia *Ammonium carbonicum* na minimização da lixiviação de nitrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 317-325, mar./abr. 2007.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

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

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

MING, L. C. Adubação orgânica no cultivo de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. Verbenaceae. In: MING, L. C. et al. (Ed.). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agronômica**. Botucatu: UNESP, 1998. v. 1, p. 165-191.

MOK, D. W. S.; MOK, M. C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 89-118, 2001.

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

PALAZÓN, J. et al. Effects of auxin and phenobarbital on morphogenesis and production of digitoxin in *Digitalis* callus. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 36, n. 2, p. 247-252, 1995.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PEIXOTO, R. T. G. Composto orgânico: aplicações, benefícios e restrições de uso. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 56-64, jul. 2000. Suplemento.

PEREIRA, R. C. A. et al. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento in vitro de *Uncaria guianensis* (AUBLET) Gmelin Rubiaceae (UNHA-DE-GATO). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, ago. 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-70542006000400007&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542006000400007&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 19 abr. 2012.

PINTO, J. E. B. P. et al. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-brasil em função de níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Horticultura**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 210-214, mar./abr. 2007.

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

RESENDE, J. M. (Coord.). **Caderno de homeopatia: instruções práticas** geradas por agricultores sobre o uso da homeopatia no meio rural. Viçosa, MG: UFV, 2009. 50 p.

RICCIARDI, G. A. L. et al. Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gilles & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 21, n. 4, p. 698-703, 2006.

ROSAL, L. F. et al. Produção vegetal e de óleo essencial de boldo pequeno em função de fontes de adubos orgânicos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 5, p. 670-678, set./out. 2011.

ROSSI, F. A agricultura vitalista: a ciência da homeopatia aplicada na agricultura. In: ENCONTRO SOBRE ESTUDOS EM HOMEOPATIA, MEDICINA, VETERINÁRIA, FARMÁCIA, AGRONOMIA, 1., 2008,

Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Centro de Estudos Avançados em Homeopatia, 2008. Disponível em: <[http://www.cesaho.com.br/biblioteca\\_virtual/arquivos/arquivo\\_54\\_cesaho.pdf](http://www.cesaho.com.br/biblioteca_virtual/arquivos/arquivo_54_cesaho.pdf)> Acesso em: 12 dez. 2011.

ROSSI, F. **Aplicação de preparados homeopáticos em morango e alface visando o cultivo em base agroecológica**. 2005. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

SALIMENA, F. R. G. et al. Verbenaceae. In: JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB015126>>. Acesso em: 10 out. 2011.

SALMIEN, J. P. et al. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 864, n. 2, p. 283-291, Dec. 1999.

SANTOS, F. M. Produção de mudas de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. por meio da propagação sexuada e assexuada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 130-136, 2009.

SANTOS, F. M. et al. Characterization of essential oil and effects on growth of *Verbena gratissima* plants treated with homeopathic phosphorus. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 10, p. 1499-1504, Oct. 2011.

SCHEFFER, M. C. Influência da adubação orgânica sobre a biomassa, o rendimento e a composição do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. mil-folhas. In: MING, L. C. (Coord.). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. v. 1, p. 1-22.

SEVERINO, L. S. et al. Mineralização da torta de mamona, esterco bovino e bagaço de cana estimada pela respiração microbiana. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 5, n. 1, 2004. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/500/50050105.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

SILVA, F. G. et al. Influence of manure and fertilizer on *Baccharis trimera* (Less.) DC. growth and essential oil yield. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, Birmingham, v. 12, n. 1/2, p. 24-30, Jan./June 2006.

SILVA, S. M. P.; MORAES, I. F. Agricultura familiar e o programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: como a política pública poderá viabilizar esta cadeia produtiva. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, São Paulo, dez. 2008. Disponível em: <[http://www.dge.apta.sp.gov.br/publicacoes/T&IA2/T&IAv1n2/Artigo\\_Plantas\\_Medicinais\\_7.pdf](http://www.dge.apta.sp.gov.br/publicacoes/T&IA2/T&IAv1n2/Artigo_Plantas_Medicinais_7.pdf)>. Acesso em: 12 fev. 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRS; Florianópolis: UFSC, 2010. 1104 p.

SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 1343-1345, 1986.

SOUZA-BRITO, A. R. M.; SOUZA-BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 39, n. 1, p. 53-67, Mar. 1993.

TRANI, P. E. et al. **Superfosfato simples com esterco animal: um bom fertilizante organomineral**. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_2/organomineral/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_2/organomineral/index.htm)>. Acesso em: 27 out. 2011.

TRANI, P. E.; RAIJ, B. van. Hortaliças. In: RAIJ, B. van et al. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**.

Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 1996. p. 157-164. (Boletim Técnico, 100).

TRIVELLATO, M. D.; FREITAS, B. G. Panorama da agricultura orgânica. In: STRINGHETA, P. C.; MUNIZ, J. N. (Ed.). **Alimentos orgânicos: produção, tecnologia e certificação**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 9-35.

VASCONCELOS, G. B. **Adubação orgânica e biodinâmica na produção de chicória (*Cichorium endivia*) e de beterraba (*Beta vulgaris*), em sucessão**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

VITHOULKAS, G. **Homeopatia ciência e cura**. São Paulo: Cultrix, 1980. 436 p.

ZHOU, L. G.; WU, J. Y. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. **Natural Product Reports**, London, v. 23, n. 5, p. 789-810, Oct. 2006.

ZIELINSKA, S. et al. Influence of plant growth regulators on volatiles produced by *in vitro* grown shoots of *Agastache rugosa* (Fischer & C.A.Meyer) O. Kuntze. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 161-167, Jan. 2011.

ZYGADILLO, J. A. et al. Composition of flower oils of some *Lippia* and *Aloysia* species from Argentina. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 7, n. 6, p. 593-595, Dec. 1995.



**ARTIGO 1****ADUBOS ORGÂNICOS NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÓLEO  
ESSENCIAL DE ALFAZEMA-BRASILEIRA****RESUMO**

*Aloysia gratissima* (Gilles ex Hook) Troncoso, popularmente conhecida como alfazema-brasileira, é uma planta medicinal usada para problemas respiratórios e como aromatizantes de chás e carnes. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes fontes e doses de adubo orgânico no crescimento das plantas de alfazema-brasileira, teor de óleo essencial, rendimento e composição química das plantas cultivadas em ambiente protegido. As plantas foram cultivadas em vasos de 9L nos seguintes ensaios: Ensaio I: controle (solo sem adubação) e quatro tratamentos constituídos de solo + 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 kg m<sup>-2</sup> de esterco bovino; Ensaio II: controle (solo sem adubação) e solo + 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 kg m<sup>-2</sup> de esterco avícola. Os ensaios foram conduzidos em um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e cinco vasos por parcela. As plantas de *A. gratissima* respondem positivamente a fertilização orgânica com esterco bovino e avícola. A biomassa seca da folha (BSF - 72,58g) foi superior com fertilização de 6 kg m<sup>-2</sup> de adubo orgânico avícola e com a dose de 12 kg m<sup>-2</sup> (62,13g) para esterco bovino. A fertilização avícola também proporcionou maior teor de óleo essencial e dobrou os teores do constituinte majoritário *trans*-pinocanfona.

Palavras-chave: *Aloysia gratissima*. *Verbena gratissima*. Esterco bovino. Esterco avícola. Fertilidade do solo. Biofertilizante.

**ORGANIC FERTILIZERS ON GROWTH AND ESSENTIAL OIL  
PRODUCTION BRAZILIAN-LAVENDER**

**ABSTRACT**

*Aloysia gratissima* (Gilles ex Hook) Troncoso popularly known as Brazilian-lavender, is a medicinal plant widely used for respiratory problems and as a flavoring teas and meat. There are few studies in Brazil with this species in order to maximize their cultivation techniques. The objective was to evaluate the effects of different levels of cattle and chicken organic manure on plant growth, besides the yield and chemical characterization of the essential oil of the jurema plants grown in a greenhouse. Two experiments were conducted, the first with cattle manure and the second with chicken manure. Plants were grown in 9L-pots treatments as follows: Assay I: control (Soil without fertilization) and four treatments with soil + 3.0; 6.0; 9.0; 12.0 kg m<sup>-2</sup> cattle manure, respectively; Assay II: control (Soil without fertilization) and four treatments with soil + 1.5; 3.0; 4.5; 6.0 kg m<sup>-2</sup> chicken manure, respectively. Both trials were conducted in a randomized blocks design with four replicates and five pots per plot. Plants *A. gratissima* respond positively for organic fertilization with cattle and chicken manure. The leaf dry biomass (LDB-72.58 g) was higher using 6 kg m<sup>-2</sup> of chicken manure and 12 kg m<sup>-2</sup> for cattle manure (62.13 g). The chicken manure also increased the content of essential oil and doubled the levels major constituent trans-pinocamphone.

Keywords: *Aloysia gratissima*. *Verbena gratissima*. Cattle manure. Chicken manure. Soil fertility. Biofertilizer.

## 1 INTRODUÇÃO

A família Verbenaceae consiste de árvores, arbustos, cipós e plantas aromáticas distribuídas principalmente na América Latina, onde ocorre grande variedade de ecossistemas (MARX et al., 2010), um segundo centro de diversidade da família, existe na África. *Aloysia* é um gênero de arbustos aromáticos compostos por cerca de 40 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais (OLIVEIRA et al., 2005). *Aloysia gratissima* é conhecida pelo seu uso como aromatizantes de chás, carnes, sucos e ambientes, além do uso medicinal para afecções do trato respiratório e ação antimicrobiológica (DUARTE et al., 2005; SCARPA, 2004; SOUZA; WIEST, 2007).

A adubação orgânica tem se destacado na pesquisa de plantas medicinais e aromáticas porque vários estudos demonstraram a importância das práticas agrícolas para a produção de plantas medicinais com maiores teores de óleo essencial e acúmulo de biomassa (BRANT et al., 2010; CHAGAS et al., 2011; CORRÊA et al., 2010; COSTA et al., 2008; ROSAL et al., 2011).

Plantas medicinais e aromáticas, como qualquer outra cultura, dependem do fornecimento adequado de nutrientes para uma produtividade agrícola adequada. Neste sentido, a adubação orgânica é fonte de nutrientes para as plantas que além de permitir suprimento adequado, contribui para a melhoria das qualidades físicas, químicas e biológicas do solo (CORRÊA et al., 2010).

Dentre os resíduos gerados na agropecuária, o esterco bovino é um dos que contém quantidades variáveis de nutrientes e que pode ser usado na agricultura, na substituição ou complementação da adubação química (LARCHER, 2000). O esterco avícola é uma boa fonte de nutrientes, especialmente nitrogênio e quando administrada de forma adequada, pode

fornecer parte ou toda a quantidade de nutriente necessário para a cultura (BLUM et al., 2003).

As respostas ascendentes de crescimento observadas no atual trabalho podem estar relacionadas com as dosagens de esterco aplicadas. Com o aumento das dosagens de esterco, maiores teores de nitrogênio e magnésio (nutrientes que fazem parte da molécula de clorofila) estarão disponíveis e, conseqüentemente, maior atividade fotossintética ocorrerá. O potássio em maior disponibilidade eleva a translocação de açúcares para as regiões de crescimento; o fósforo fornece energia para diversos processos metabólicos ligados ao crescimento das plantas, além de outros nutrientes importantes como os micronutrientes ferro, manganês e cobre que ativam diversas enzimas. Ressalta-se que a dosagem de nutrientes deve ser equilibrada para obter uma produção ótima, sendo que deficiência (lei do mínimo) ou excesso (lei do máximo) de nutrientes acarreta desordens no crescimento das plantas (CORREA et al., 2010).

Quanto ao metabolismo secundário de plantas, temos a conversão de alguns componentes voláteis em outros, no interior das plantas. Como foi proposto em plantas de hissopo (*Hyssopus officinalis* - Lamiaceae) que por reações de oxidação, redução e conjugação, transforma a olefina  $\beta$ -pineno no álcool alílico transpinocarvoila, que converte em pinocarvona, e após em *trans*- e *cis*-pinocanfona (Figura 1). Outra reação direta é a conversão do  $\alpha$ -pineno em mirtenol (Figura 1), sendo citocromo P-450 dependente (KARP; CROTEAU, 1992).

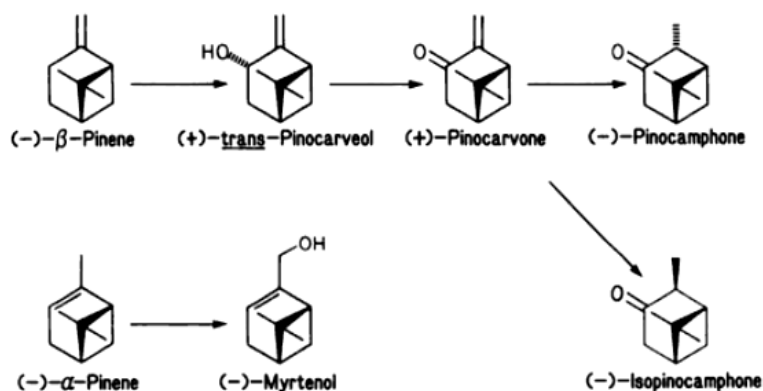


Figura 1 Proposição de rotas metabólicas para o pineno em plantas de *Hyssopus officinalis* (KARP; CROTEAU, 1992).

A utilização de adubos orgânicos pode alterar a produção de biomassa e teor de óleo essencial de espécies medicinais. Até o presente momento, não há uma definição da dose recomendada desses fertilizantes no cultivo de *A. gratissima*, portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes fontes e doses de adubo orgânico no crescimento das plantas de alfazema-brasileira, teor de óleo essencial, rendimento e composição química das plantas cultivadas em ambiente protegido.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Sementes de *Aloysia gratissima* (Gillies ex Hook) Troncoso foram coletadas em março de 2009 de plantas de um jardim clonal situado no Horto medicinal da Universidade Federal de Lavras, UFLA. Exsicatas foram depositadas no Herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA, sob o número de registro 19.810. As sementes foram cultivadas em bandejas de

poliestireno expandido de 72 células, contendo o substrato comercial Plantmax®, por quatro meses (julho a outubro de 2009) em casa de vegetação.

## 2.2 Análise de crescimento

O ensaio foi realizado em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais da UFLA, situados nas coordenadas geográficas 21° 14' S e 45° 00' W, a 918 m de altitude.

Dois ensaios foram conduzidos: o primeiro com esterco bovino e o segundo com esterco avícola. Mudanças de  $12 \pm 2$  cm de altura foram transplantadas em vasos de 9 L contendo substrato. Os tratamentos do Ensaio I foram: controle (solo sem adubação); solo + 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 kg m<sup>-2</sup> de esterco bovino e no Ensaio II: controle (solo sem adubação) e solo + 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 kg m<sup>-2</sup> de esterco avícola.

O solo utilizado, classificado como Latossolo Vermelho Distroférico (LVD), foi coletado da camada de 0 - 20 cm de profundidade, do município de Lavras, MG. Realizaram-se as análises do solo e dos substratos no Laboratório de Análises Química e Física do Solo do Departamento de Ciência do Solo da UFLA. A caracterização química e física das amostras de solo (profundidade de 0 a 20 cm) foi realizada conforme Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (1997) e a caracterização química dos substratos utilizados como adubos foi realizada segundo metodologia de Silva (1999).

Os adubos orgânicos foram provenientes do Departamento de Zootecnia da UFLA. As características físico-químicas do solo e dos adubos orgânicos curtidos utilizados foram determinadas e foram obtidos os seguintes resultados para o solo: pH em água = 7,0; P e K (mg dm<sup>-3</sup>) = 1,8 e 42; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, H+Al (cmol dm<sup>-3</sup>) = 2,5; 0,3; 0,0; 1,1; índice de saturação de bases (%) = 73,2; matéria orgânica (dag kg<sup>-1</sup>) = 1,5; Zn, Fe, Mn e Cu (mg dm<sup>-3</sup>) = 0; 0; 0 e 0,

respectivamente. A composição física do solo foi: areia = 19%; silte = 12%; argila = 69%; classe textural argilosa.

Os adubos orgânicos curtidos, por sua vez, também foram analisados gerando os seguintes valores para o esterco bovino curtido: pH em água = 6,97; matéria orgânica (%) = 61,9; C (total) e N (total) (%) = 31,0 e 2,44; relação C/N = 12,7; N (amoniaco) e N (Nitrato) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) = 226 e 133; P, K,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e S (total) ( $\text{g kg}^{-1}$ ) = 3,77; 2,40; 10,38; 2,30 e 5,1; Cu, Fe, Mn, Zn e B ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) = 76; 44,820; 263; 174 e 33,12, respectivamente. Para o esterco avícola curtido: pH em água = 7,0; matéria orgânica (%) = 90,7; C (total) e N (total) (%) = 45,4 e 4,83; relação C/N = 9,39; N (amoniaco) e N (Nitrato) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) = 469 e 34,0; P, K,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e S (total) ( $\text{g kg}^{-1}$ ) = 4,06; 9,75; 11,8; 2,4 e 3,7; Cu, Fe, Mn, Zn e B ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) = 42; 2,332; 176; 209,2 e 24,2, respectivamente.

As práticas culturais, tais como controle de erva daninha, irrigação, pragas e doenças foram realizadas ao longo do ciclo da cultura. O controle de plantas daninhas foi feito manualmente. A umidade foi mantida conforme a necessidade das plantas. Não houve infecção das plantas com patógenos e pragas.

Após quatro meses de cultivo, procedeu-se à análise biométrica: altura da planta (cm), diâmetro do caule (mm), biomassa seca (g) de folha (BSF) e raiz (BSR) por planta. As plantas foram particionadas em raiz, caule e folha e a secagem foi realizada em estufa de circulação de ar forçada a 40°C até peso constante para a obtenção de biomassa seca, com a qual também foi determinada a relação raiz:parte aérea (R/PA).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e cinco plantas por parcela (unidades experimentais), sendo que cada vaso continha uma planta. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e submetidos à regressão polinomial pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Os dados

obtidos foram analisados pelo software estatístico Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2008).

### 2.3 Extração de óleo essencial

Os óleos essenciais foram extraídos a partir de 100 g de folhas secas de *A. gratissima* por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, durante 90 minutos. Após esse período, o hidrolato foi mantido por 24 h em repouso para decantação do óleo. O teor de óleo foi determinado pela leitura do volume de óleo recolhido no tudo graduado do hidrodestilador (mL 100 g<sup>-1</sup> de folhas secas). O rendimento foi calculado pela expressão: Rendimento (mL planta<sup>-1</sup>) = (teor x biomassa seca das folhas)/ 100.

Para a purificação do óleo essencial recolhido em tubo do tipo Eppendorf foi feita a centrifugação por 10 min a 10.000 rpm. A fase oleosa foi separada com o auxílio de pipeta Pasteur e armazenada em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados, em freezer (-20°C) até as análises.

### 2.4 Análises químicas

Análises da composição química de óleo essencial foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica da Università di Pisa – UNIPI, Pisa, Itália. Realizadas em um cromatógrafo a gás HP-5890 Série II (Hewlett-Packard) com detector de ionização por chama, equipado com duas colunas capilares, uma HP-Wax e HP-5 (ambos 30 m X 0,25 mm X 0,25 µm), trabalhando com aquecimento com temperatura programada: 60°C durante 10 min, elevando-se a 5°C min<sup>-1</sup> até 220°C. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250°C; gás de arraste, nitrogênio (fluxo de 2 mL/ min); detector, dual FID; com uma razão de *split* de 1:30. O volume da amostra injetado foi de 0,5 µL de



óleo com 1 mL de Hexano. As amostras dos óleos foram compostas, misturando as 4 repetições, sendo a injeção em triplicata.

Os óleos também foram analisados por espectrometria de massas, CG-EM, em um cromatógrafo a gás Varian CP3800 equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 m X 0,25 mm X 0,25  $\mu$ m) e acoplado a detector seletivo de massas, Varian Saturno 2000 detector *ion trap*. Condições analíticas foram como se segue: injetor e detector, 220 e 240°C a 3°C, respectivamente, temperatura programada de 60 - 240°C a 3°C; injeção; gás de arraste, hélio a 1 mL /min , 0,2  $\mu$ L (solução de hexano 10%); com uma razão de *split* de 1:30.

#### **2.4.1 Identificação de compostos**

Identificação dos constituintes foi baseada na comparação do tempo de retenção com os de amostras autênticas, comparando os seus índices lineares relativos a uma série de *n*-hidrocarbonetos, complementados por comparação computadorizada da biblioteca do aparelho (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 1998) e também pela utilização de uma biblioteca “homemade” de espectros de massas construída a partir de substâncias puras e componentes de óleos conhecidos, e os dados da literatura (ADAMS, 2007). A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma detector de ionização de chama (FID ou DIC). Além disso, os pesos moleculares de todas as substâncias identificadas foram confirmados por cromatografia de íons, GC-CIMS, utilizando metanol como gás ionizante.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Análise de crescimento**

Diferenças expressivas foram observadas nos dados biométricos das plantas de *A. gratissima* adubadas com distintas concentrações de esterco bovino e avícola. Tal diferença pôde ser observada inclusive no aspecto físico das plantas, sendo que as plantas que não receberam adubação apresentaram um porte menor, com folhas pequenas, delgadas e de coloração verde menos intensa que as adubadas.

Conforme pode ser observado, as fontes (esterco bovino e avícola) e doses de adubo orgânico influenciam a espécie *Aloysia gratissima* no crescimento da planta (Gráficos 1 e 2).

Quando observamos a biomassa seca de folhas (BSF) de *A. gratissima*, observamos com o esterco bovino um aumento linear, com 62,13 g de BSF com a dose máxima de 12 kg m<sup>-2</sup>. Para a biomassa seca da raiz (BSR) diminui até a dose 2,6 kg m<sup>-2</sup> com seu valor atingindo 6,33 g, depois o valor aumenta até a dose máxima, com 36,43 g de raiz seca (Gráfico 1A).

A razão raiz-parte aérea (R/PA), na medida em que se aumenta a dose de esterco bovino diminui até a dose 2,5 kg m<sup>-2</sup>, atingindo uma razão mínima de 0,225, após, com o aumento da dose ocorre o aumento dessa razão até 1,0 com a dose máxima de 12 kg m<sup>-2</sup>. Para a biomassa seca de caule (BSC) temos um comportamento linear, com 26,79 g de caule com a dose máxima estudada (Gráfico 1B).

Na variável diâmetro para as plantas de *A. gratissima*, verifica-se aumento linear em que com a dose de 12 kg m<sup>-2</sup> tem-se 19,71 mm. Para a altura temos uma equação quadrática, com 137,86 cm no ponto máximo de 9,4 kg m<sup>-2</sup> (Gráfico 1C).

Para as plantas de *Aloysia gratissima* adubadas com esterco avícola curtido verificamos um comportamento linear para a biomassa seca de folha (BSF), com 73,58 g de folhas secas na dose de 12 kg m<sup>-2</sup>. Para a biomassa seca

de raiz (BSR), um comportamento quadrático, aumentando até  $5,92 \text{ kg m}^{-2}$ , alcançando  $30,03 \text{ g}$  de raiz seca, depois diminui (Gráfico 2A).

A razão (R/PA) aumentou até  $4,68 \text{ kg m}^{-2}$  alcançando um máximo de  $0,87$  e posteriormente diminuindo para as plantas adubadas com esterco avícola. Crescimento linear observa-se para a biomassa seca de caule (BSC) com  $33,44 \text{ g}$  na dose máxima estudada de  $6 \text{ kg m}^{-2}$  (Gráfico 2B).

Quando observamos a biomassa seca total (biomassa de folhas, caule e raiz), ocorre um comportamento quadrático para os dois tipos de esterco. Para o adubo bovino a BST diminui até  $3,95 \text{ kg m}^{-2}$  atingindo  $65,72 \text{ g}$ , depois o valor aumenta até a dose máxima (Gráfico 3). Entretanto, para o adubo avícola, apresenta um ponto máximo de  $9,68 \text{ kg m}^{-2}$ , com  $119,59 \text{ g}$  (Gráfico 4).

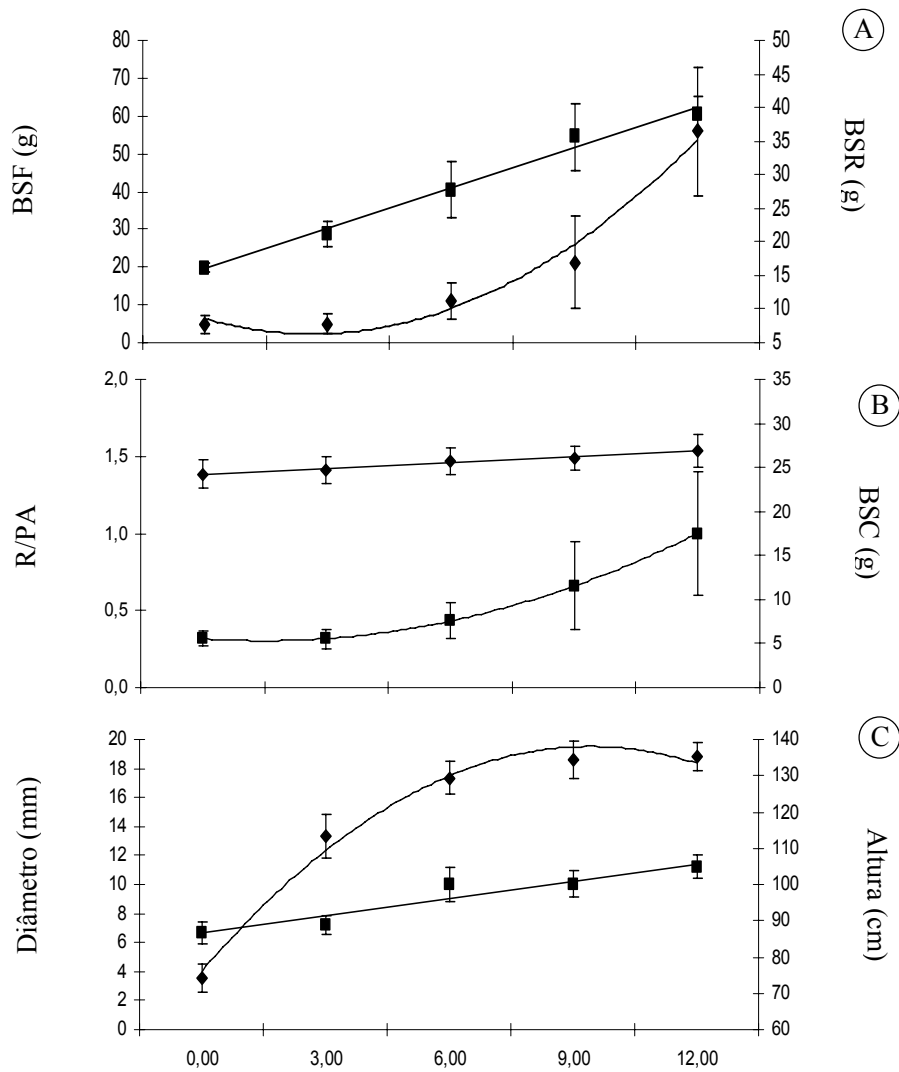
Para o esterco avícola curtido, o diâmetro e a altura apresentaram comportamento quadrático, com o diâmetro aumentou até  $5,08 \text{ kg m}^{-2}$  alcançando  $14,18 \text{ mm}$ , depois diminuindo; com a altura aumentando até a dose de  $5,68 \text{ kg m}^{-2}$  atingindo o máximo de  $165,93 \text{ cm}$ , depois diminui (Gráfico 2C).

Observou-se que a biomassa seca de folha (BSF) e de caule (BSC), tanto para adubação com esterco bovino como para esterco avícola, desenvolveram tendência linear. Já as biomassas secas de raiz (BSR) e altura seguiram tendência quadrática para os dois adubos, e o diâmetro apresentou tendência linear com adubação de esterco bovino e quadrática com adubação de esterco de avícola, sendo que o diâmetro do caule está relacionado à capacidade de transporte da planta (Gráficos 1 e 2).

A resposta linear crescente observada não permite assegurar se o aumento de doses dos adubos proporcionaria benefícios à produção vegetal de *A. gratissima*, não sendo observado ponto de máximo nas doses estudadas para a biomassa de folhas e de caule, sendo então que as doses mais altas utilizadas ( $12 \text{ kg m}^{-2}$  e  $6 \text{ kg m}^{-2}$  para esterco bovino e avícola, respectivamente) foram indicadas para maior produção de biomassa.

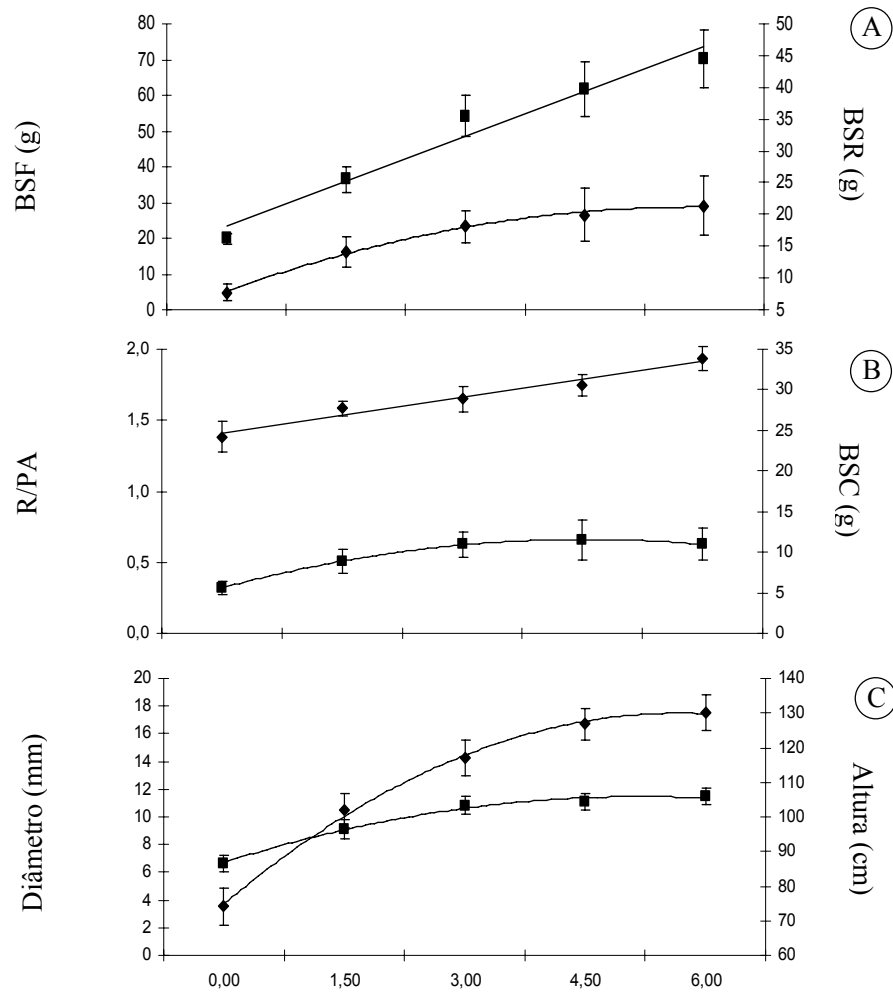
O conhecimento dos níveis adequados de adubação orgânica em cada espécie reduz os custos de produção na adubação, maximizam a colheita e evitam possíveis efeitos fitotóxicos. Plantas de orégano (*Origanum vulgare* L.) cultivadas sob doses de esterco bovino e avícola (10,1 kg m<sup>-2</sup> e 3,86 kg m<sup>-2</sup> para esterco bovino e avícola, respectivamente) atingiram um ponto de máximo, após esse ponto ocorreu a redução de produção de biomassa (folhas e total), provavelmente, pelo excesso de nutrientes disponíveis reduzindo a absorção de nutrientes pelo sistema radicular (CORRÊA et al., 2010).

O solo utilizado no experimento foi o Latossolo Vermelho Escuro típico do Cerrado brasileiro sendo pobre em matéria orgânica e nos elementos N, P e K. Os adubos orgânicos utilizados no presente experimento continham elementos nutricionais para o crescimento das plantas. Assim pode-se inferir que o uso desses esterco proporcionou nutrientes, como nas fórmulas sintéticas equilibradas, como o fósforo (atuante na floração, frutificação, formação de sementes e enraizamento das plantas), potássio (indispensável à perfeita estruturação celular das plantas, que permite aumentar sua capacidade de tolerância à falta de água e resistência às pragas e doenças), aliado ao nitrogênio (responsável pela brotação e formação da estrutura de folhas e caules) (RECH; FRANKE; BARROS, 2006).



■ BSF  $y = 3,56x + 19,41$   $R^2 = 98,8\%$     ◆ BSR  $y = 0,33x^2 - 1,72x + 8,57$   $R^2 = 97,8\%$   
 ■ R/PA  $y = 0,012x^2 - 0,06x + 0,3$   $R^2 = 98,0\%$     ◆ BSC  $y = 0,22x + 24,15$   $R^2 = 97,4\%$   
 ■ Diâmetro  $y = 1,1931x + 5,43$   $R^2 = 90,8\%$     ◆ Altura  $y = -0,7x^2 + 13,15x + 76,10$   $R^2 = 98,7\%$

Gráfico 1 Efeitos de diferentes doses de esterco bovino na biomassa seca de folha (BSF) e raiz (BSR) (A), relação raiz: parte aérea (R/PA) e biomassa seca de caule (BSC) (B), altura e diâmetro de caule (C). \*Teste F ( $p \leq 0,05$ ). UFLA, Lavras, 2012.



#### Doses (kg m<sup>-2</sup>) de esterco Avícola

- BSF  $y = 8,38x + 23,30$   $R^2 = 96,5\%$     ◆ BSR  $y = -0,38x^2 + 4,50x + 7,89$   $R^2 = 99,6\%$   
 ■ R/PA  $y = -0,016x^2 + 0,15x + 0,32$   $R^2 = 99,9\%$     ◆ BSC  $y = 1,47x + 24,62$   $R^2 = 96,7\%$   
 ■ Diam.  $y = -0,18x^2 + 1,83x + 6,71$   $R^2 = 99,0\%$     ◆ Altura  $y = -1,71x^2 + 19,44x + 74,86$   $R^2 = 99,8\%$

Gráfico 2 Efeitos de diferentes doses de esterco avícola na biomassa seca de folha (BSF) e raiz (BSR) (A), relação raiz: parte aérea (R/PA) e biomassa seca de caule (BSC) (B), altura e diâmetro de caule (C). \*Teste F ( $p \leq 0,05$ ). UFLA, Lavras, 2012.

A relação N:P:K dos adubos estudados foi de 2,44:3,77:2,40 para o esterco bovino e 4,83:4,06:9,75 para o adubo avícola, indicando que o adubo avícola foi mais eficiente para as plantas, corroborando com os resultados apresentados, quando se observou as biomassas seca de folha e de caule e a altura das plantas de *A. gratissima* (Gráficos 1 e 2).

Um composto ou adubo orgânico estabilizado deve ter relação C/N igual ou menor que 18, podendo ser aplicado ao solo sem causar qualquer dano às plantas, aumentando a eficiência do uso de nutrientes. No caso do composto ou adubo apresentar relação C/N alta (baixo teor de nitrogênio ou alto teor de carbono), os micro-organismos, para decompor esse resíduo, irão utilizar o nitrogênio do solo, competindo com as plantas, causando deficiência de nitrogênio nas mesmas. Por outro lado, se o composto apresentar relação C/N muito baixa (rico em nitrogênio), haverá rápida perda de nitrogênio, principalmente por volatilização, fazendo com que a planta não o aproveite adequadamente (KIEHL, 1985; PEIXOTO, 2000).

Conforme as análises químicas dos estercos utilizados nesse estudo, observou-se uma relação C/N igual a 12,7 para o esterco bovino e 9,39 para o esterco avícola, estando em conformidade com as prescrições de adubação e correção do solo.

Os adubos orgânicos normalmente são ricos em húmus e modificam as propriedades físicas do solo à medida que são aplicados, promovendo a formação de agregados. Como consequência aumenta a porosidade, a aeração e a capacidade de retenção de água. Paralelamente, aumenta-se a capacidade de troca catiônica (CTC) do meio, ou seja, os nutrientes catiônicos, cálcio (Ca), magnésio (Mg) e potássio (K), anteriormente lixiviados, tornam-se disponíveis para as raízes, em quantidades maiores e por mais tempo. Alguns ácidos orgânicos liberados pelo fertilizante orgânico diminuem a adsorção (imobilização) do fósforo (P). Nessas condições, diminuem também as variações

de pH, tornando mais raras as necessidades de calagem (KIEHL, 1985). O uso de adubos orgânicos propicia também aumento na diversidade de microorganismos úteis, que agem na solubilização de fertilizantes diversos, de maneira a liberar os nutrientes para as plantas (TRANI et al., 2011).

Em relação à biomassa seca de raiz para as plantas de alfazema-brasileira, a adubação bovina foi mais eficiente. O acúmulo de biomassa da raiz na dose máxima de 12 kg m<sup>-2</sup> foi de 36,43 g e o controle (sem esterco) sendo de 7,71 g com um incremento aproximado de cinco vezes e com 5,92 kg m<sup>-2</sup> de adubo avícola (30,03 g) com um incremento de aproximado de quatro vezes em relação ao controle (Gráficos 1 e 2- A).

Corroborando com o presente estudo, um estudo similar com plantas de *Ocimum selloi* sob efeito das doses de adubo orgânico nas mesmas doses de esterco bovino e avícola, observou-se aumento de produção de biomassa de caules, folhas e raiz (COSTA et al., 2008). Aumento na produção de biomassa seca de folhas, ramos e raízes também foi verificado em plantas de *Hyptis suaveolens* com esterco avícola (50 g dm<sup>-3</sup>) (MAIA et al., 2008). Os autores atribuíram esse aumento à crescente disponibilidade e absorção de nutrientes, melhorando assim as condições do solo e conseqüentemente a retenção de água e minerais.

Embora os resultados sejam positivos para plantas de *A. gratissima*, com os tipos e doses estudadas de esterco, há espécies como a *Justicia pectoralis*, em que foi observado que as doses de esterco bovino adicionadas ao solo não proporcionaram aumentos significativos na biomassa seca de plantas (BEZERRA et al., 2006).

Para a relação raiz:parte aérea (R/PA), maiores valores foram obtidos, utilizando-se as maiores doses dos estercos estudados, indicando que as plantas sob o incremento de adubação orgânica alocam os fotossintetizados preferencialmente para o sistema radicular. Verificou-se que a relação R/PA



oscilou de 0,32 a 1,0 para plantas adubadas com esterco bovino e 0,32 a 0,87 para plantas adubadas com esterco avícola (Gráficos 1 e 2 – B).

Em plantas de *Origanum vulgare* L., a relação R/PA não foi alterada significativamente pelas doses de esterco bovino e avícola, ocorrendo distribuição de nutrientes da parte aérea para as raízes com a maior dose utilizada (120 ton/ha) evidenciando maior capacidade de crescimento deste órgão para absorção de nutrientes e consequentemente, produção de biomassa (CORREA et al., 2010).

Entretanto, para plantas de *Ocimum selloi*, a relação R/PA foi maior no tratamento sem adubação, verificando-se diminuição da relação R/PA com o aumento das doses de esterco bovino e avícola, inferindo que com o aumento das doses de adubo orgânico houve direcionamento da distribuição de nutrientes para a parte aérea da planta (COSTA et al., 2008).

Quanto à altura das plantas, o aumento foi observado com o incremento das doses de adubação, atingindo um valor máximo de 137,86 cm com a aplicação de 9,4 kg m<sup>-2</sup> de esterco bovino e 165,93 cm com a dose de 5,68 kg m<sup>-2</sup> de esterco avícola. Houve um incremento de 1,8 vezes na altura das plantas adubadas em relação as não adubadas (Gráficos 1 e 2 - C).

Estudos de doses de esterco bovino e avícola em *Ocimum selloi* também verificaram aumento na altura das plantas com o incremento das doses de adubação (COSTA et al., 2008). Porém, para a espécie *Ocimum basilicum* não foi observado efeito significativo das adubações orgânica e química, na dose utilizada (1,0 kg m<sup>-2</sup> e 1,8 kg.m<sup>-2</sup> de esterco de galinha e bovino, respectivamente) sobre a altura das plantas medicinais (BLANK et al., 2005).

Para o diâmetro do caule de *A. gratissima* houve um aumento ascendente com o aumento da dose de adubos orgânicos utilizadas (Gráficos 1 e 2 - C). O diâmetro do caule é um parâmetro importante para a sustentação da

planta e para não ocorrer o acamamento desta, além da translocação de fotoassimilados.

Há trabalhos na literatura que corroboram com os resultados encontrados com *A. gratissima*. Como plantas de *Ocimum selloi* em que nas doses maiores de esterco bovino e avícola, nas mesmas doses do atual estudo, foi observado maior diâmetro do caule (COSTA et al., 2008). Resposta semelhante foi também observada para o diâmetro do caule de plantas de *Hyptis suaveolens* com 125 g dm<sup>-3</sup> de esterco de curral curtido e 50 g dm<sup>-3</sup> de esterco de aves (MAIA et al., 2008).

Quando observamos a distribuição de biomassa seca nas plantas de *A. gratissima*, para os dois tipos de esterco, avícola e bovino, tivemos uma ordem decrescente para caule, folha e raiz.

Em plantas de *Aloysia gratissima*, a biomassa seca total (BST) foi observada na dose de 12 kg m<sup>-2</sup> para adubo bovino e 9,68 kg m<sup>-2</sup> para adubo avícola, com 123,84 g e 119,59 g, respectivamente (Gráficos 3 e 4). Entretanto, em plantas de *Origanum vulgare* L. foram observadas maior BST (76,82 g) na dosagem de 10,1 kg m<sup>-2</sup> para esterco bovino e 77,31 g de BST na dosagem de 3,86 kg m<sup>-2</sup> de esterco avícola (CORRÊA et al.; 2010).

Costa et al. (2008) estudando plantas de *Ocimum selloi* Benth, relataram maior produção de biomassa seca total (66,3 g) com 9,7 kg m<sup>-2</sup> de esterco bovino e 101,3 g com a dose de 4,3 kg m<sup>-2</sup> de esterco avícola. Inferindo com isso que, nos dois tipos de adubação, a ordem de distribuição dos fotoassimilados seguiu a mesma sequência: maior no caule, seguido de folhas, raiz e inflorescências.

Para plantas de *Hyptis suaveolens*, Maia (2006) relata o efeito das doses de matéria orgânica no aumento de produção de biomassa seca total, atribuindo-se à crescente disponibilidade e à absorção de nutrientes.

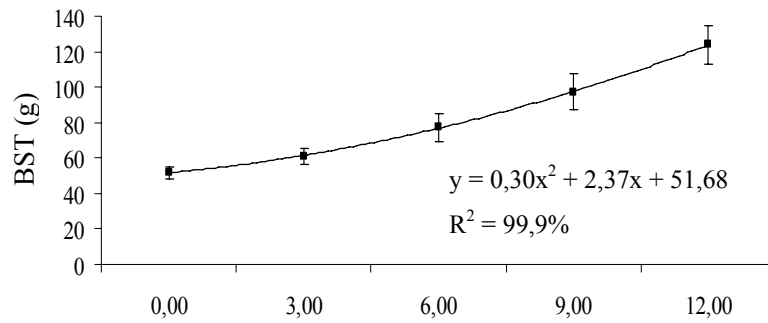


Gráfico 3 Efeitos de diferentes doses de esterco bovino na biomassa seca total (BST) de plantas de *A. gratissima*. \*Teste F ( $p \leq 0,05$ ). UFLA, Lavras, 2012.

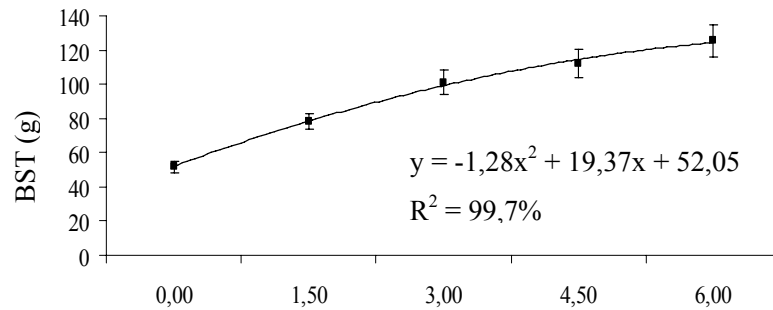


Gráfico 4 Efeitos de diferentes doses de esterco avícola na biomassa seca total (BST) de plantas de *A. gratissima*. \*Teste F ( $p \leq 0,05$ ). UFLA, Lavras, 2012.

### 3.2 Teor e rendimento de óleo essencial

Os esterco bovino e avícola influenciaram o teor e rendimento de óleo essencial de *A. gratissima* numa tendência linear crescente, apenas o rendimento para o esterco bovino apresentou comportamento quadrático (Gráfico 5 e 6).

Na avaliação da produção de óleo essencial extraído da biomassa seca foliar (BSF) das plantas de *A. gratissima*, a adubação orgânica melhorou a eficiência da produção de óleo essencial. O teor de óleo essencial extraído da biomassa seca foliar de *A. gratissima* aumentou com o aumento das doses dos adubos, atingindo os valores máximos de 1,1% com 12,0 kg m<sup>-2</sup> de esterco bovino e 1,32% com 6,0 kg m<sup>-2</sup> de esterco avícola (Gráficos 5 e 6), confirmando que pode haver aumento na produção de óleo essencial por planta com o aumento dos níveis de nutrientes disponíveis no solo. Para o esterco avícola, um rendimento de 0,87 mL planta<sup>-1</sup> na dose de 6,0 kg m<sup>-2</sup>; e para o esterco bovino o ponto mínimo foi na dose de 7,5 kg m<sup>-2</sup>, quando se obteve 0,295 de rendimento do óleo (Gráfico 5 e 6).

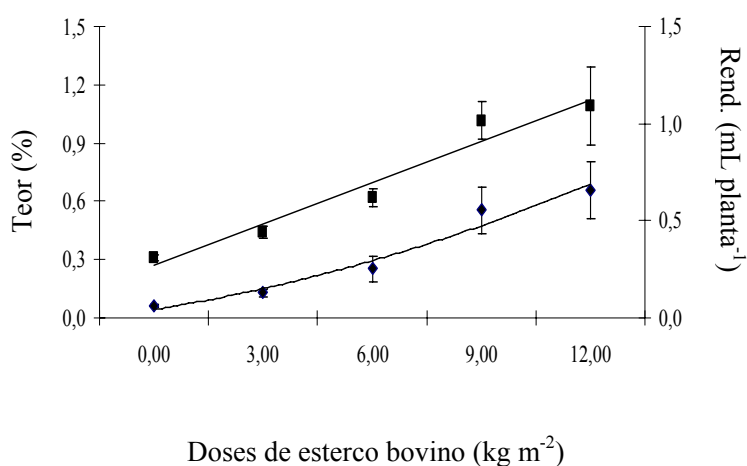
Para plantas de *Mentha arvensis* L a maior produção de biomassa seca de folhas e rendimento de óleo essencial foi observada com a maior dose de adubação orgânica, tanto no plantio (10 kg m<sup>-2</sup>) como em cobertura (7,5 kg m<sup>-2</sup>) (CHAGAS et al., 2011).

A adubação orgânica em plantas *M. arvensis* aplicada em doses crescentes não alterou o teor de óleo essencial, mas o maior acúmulo de BSPA refletiu em maiores rendimentos de óleo essencial (CHAGAS et al., 2011). Assim, mesmo que o teor de óleo essencial tenha diminuído em relação ao aumento da adubação orgânica, o aumento da produção de biomassa seca compensou o menor teor observado.

Para plantas de *O. selloi* observaram efeito significativo das dosagens de adubação orgânica no teor e rendimento de óleos essenciais, evidenciando que

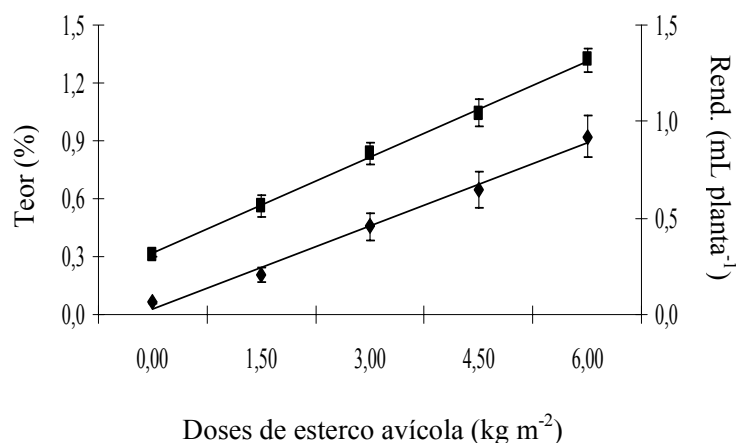
para o esterco bovino houve efeito linear das variáveis com o efeito das doses. A incorporação de 1 kg m<sup>-2</sup> de esterco bovino ao solo proporcionou a elevação do teor de óleo em torno de 0,65% e o rendimento elevou-se em aproximadamente 0,14% (COSTA et al., 2008).

Há estudos que indicam que o uso de esterco bovino diminui o rendimento de óleo essencial, como é o caso de trabalho conduzido com a espécie *Justicia pectoralis* var. *stenophylla* (BEZERRA et al., 2006). Outros trabalhos relatam a não interferência desse tipo de adubação no rendimento de óleo essencial, por exemplo, para a espécie *Cymbopogon citratus* (CARVALHO et al., 2005).



■ Teor  $y = 0,07x + 0,27$   $R^2 = 95,4\%$     ◆ Rend.  $y = 0,002x^2 + 0,03x + 0,04$   $R^2 = 96,4\%$

Gráfico 5 Teor (%) e rendimento (mL planta<sup>-1</sup>) de óleo essencial em plantas de *Aloysia gratissima*, adubadas com diferentes doses de esterco bovino \* Teste F ( $p \leq 0,05$ ). UFLA, Lavras, 2012.



■ Teor  $y = 0,166x + 0,32$   $R^2 = 99,9\%$     ◆ Rendimento  $y = 0,14x + 0,026$   $R^2 = 99,0\%$

Gráfico 6 Teor (%) e rendimento (mL planta<sup>-1</sup>) de óleo essencial em plantas de *Aloysia gratissima*, adubadas com diferentes doses de esterco avícola. \* Teste F ( $p \leq 0,05$ ). UFLA, Lavras, 2012.

### 3.3 Composição química

As análises químicas do óleo essencial indicam a *trans*-pinocanfona (17,4 – 32,5%) como principal constituinte químico volátil de *A. gratissima* independente de ter recebido fertilização ou não (Tabela 1). Outros compostos foram acetato de *trans*-pinocarvoila (9,3 – 16,2%),  $\beta$ -pineno (2,3 – 12,0%), *trans*-pinocarveol (6,4 – 8,9%), óxido de cariofileno (2,0 – 8,6%), mirtenol (5,9 – 7,9%), *cis*-pinocanfona (4,5 – 6,9%), guaiol (1,3-4,7%) e *trans*-verbenol (2,6-3,9%) (Tabela 1).

Alguns compostos importantes estão presentes em pequenas quantidades, tais como: limoneno, 1,8-cineol, linalol, germacreno D e  $\alpha$ -humuleno (Tabela 1). Os pinenos ( $\alpha$  e  $\beta$ ) estão entre os monoterpenos mais comuns produzidos pelas plantas. Estes compostos são tóxicos para os besouros e seus fungos simbiotes patogênicos (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES,

2000). Provavelmente a alta concentração de monoterpenos em *A. gratissima* preservou estas plantas do ataque patogênico. Além disso, linalol e 1,8-cineol emitido por flores de alfazema-brasileira foram úteis como atrativos para os polinizadores, incluindo as abelhas, mariposas e morcegos.

Entre os compostos identificados no óleo essencial de *A. gratissima* (Tabela 1),  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, 1,8-cineol, limoneno, p-cimeno, linalol e germacreno-D foram relatados anteriormente como possuindo atividade antimicrobiana (DUARTE et al., 2005; LEITE et al., 2007). Os compostos 1,8-cineol e cânfora atuam como protetor foliar impedindo a alimentação de herbívoros de grande porte, como lebres e cervos. Além disso, eles podem fornecer uma vantagem competitiva para as diversas espécies de angiospermas como agentes alelopáticos que inibem a germinação de sementes de outras espécies (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). Assim, o presente estudo com óleo essencial de *A. gratissima* evidenciou uma provável ação como agente alelopático, como  $\alpha$  - e  $\beta$ -pineno, 1,8-cineol, limoneno, óxido de cariofileno e cânfora (BARATELLI, 2006).

Tabela 1 Porcentagem da área relativa da composição química dos compostos majoritários<sup>§</sup> do óleo essencial de *A. gratissima* obtidos pelas diferentes fontes e doses de adubos orgânicos, em comparação com o controle (média de três repetições). UFLA, Lavras, 2012.

| Monoterpeno                      | IR*  | Controle    | Adubo bovino (kg m <sup>-2</sup> ) |             |             |             | Adubo avícola (kg m <sup>-2</sup> ) |             |             |             |
|----------------------------------|------|-------------|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                  |      |             | 3,0                                | 6,0         | 9,0         | 12,0        | 1,5                                 | 3,0         | 4,5         | 6,0         |
| $\alpha$ -Pineno                 | 939  | 0,8 ± 0,07  | 0,2 ± 0,01                         | 0,3 ± 0,05  | 0,7 ± 0,04  | 1,2 ± 0,07  | 1,0 ± 0,01                          | 0,5 ± 0,01  | 1,3 ± 0,41  | 1,1 ± 0,14  |
| $\beta$ -Pineno                  | 980  | 6,0 ± 0,58  | 2,3 ± 0,38                         | 3,2 ± 1,73  | 6,5 ± 0,55  | 8,7 ± 0,51  | 7,7 ± 0,05                          | 5,2 ± 0,89  | 12,0 ± 1,83 | 10,9 ± 1,44 |
| <i>p</i> -Cimeno                 | 1022 | 0,3 ± 0,01  | -                                  | -           | 0,2 ± 0,01  | 1,6 ± 0,09  | 0,3 ± 0,01                          | 0,1 ± 0,01  | 0,6 ± 0,06  | 0,2 ± 0,01  |
| Limoneno                         | 1031 | 0,8 ± 0,07  | 0,2 ± 0,04                         | 0,5 ± 0,06  | 0,7 ± 0,02  | -           | 1,1 ± 0,01                          | 0,5 ± 0,09  | 1,1 ± 0,14  | 1,2 ± 0,16  |
| <b>Monoterpeno Oxigenado</b>     |      |             |                                    |             |             |             |                                     |             |             |             |
| 1,8-Cineol                       | 1033 | 0,7 ± 0,03  | 0,3 ± 0,04                         | 0,5 ± 0,12  | 0,9 ± 0,03  | 1,0 ± 0,04  | 0,9 ± 0,01                          | 0,6 ± 0,03  | 1,4 ± 0,19  | 0,9 ± 0,11  |
| <i>cis</i> -Sabineno hidratado   | 1068 | 0,5 ± 0,01  | 0,2 ± 0,01                         | 0,3 ± 0,01  | 0,5 ± 0,02  | 0,5 ± 0,01  | 0,5 ± 0,02                          | 0,2 ± 0,01  | 0,5 ± 0,03  | 0,4 ± 0,06  |
| <i>cis</i> -Linalol oxido        | 1074 | 0,3 ± 0,02  | -                                  | 0,2 ± 0,02  | 0,4 ± 0,03  | 0,3 ± 0,02  | 0,3 ± 0,02                          | 0,2 ± 0,01  | 0,3 ± 0,07  | 0,2 ± 0,01  |
| Oxido de <i>trans</i> -Linalool  | 1088 | 0,3 ± 0,02  | 0,2 ± 0,01                         | 0,2 ± 0,03  | 0,5 ± 0,03  | 0,4 ± 0,02  | 0,4 ± 0,03                          | 0,2 ± 0,01  | 0,4 ± 0,10  | 0,2 ± 0,01  |
| <i>trans</i> -Sabinene hidratado | 1097 | 1,7 ± 0,13  | -                                  | 2,8 ± 0,01  | 1,9 ± 0,05  | 1,5 ± 0,05  | 1,5 ± 0,05                          | 2,5 ± 0,01  | 3,1 ± 0,21  | 3,4 ± 0,01  |
| Linalol                          | 1098 | 1,8 ± 0,06  | 2,8 ± 0,39                         | 2,8 ± 0,40  | 2,5 ± 0,14  | 2,0 ± 0,06  | 1,9 ± 0,10                          | 2,1 ± 0,01  | -           | 3,9 ± 0,10  |
| Nonanal                          | 1098 | 0,7 ± 0,01  | 0,3 ± 0,12                         | 0,4 ± 0,01  | 0,5 ± 0,07  | 0,4 ± 0,01  | 0,6 ± 0,04                          | 0,4 ± 0,01  | 0,6 ± 0,07  | -           |
| $\beta$ -Tujona ( <i>trans</i> ) | 1114 | 0,5 ± 0,00  | 0,3 ± 0,01                         | 0,3 ± 0,01  | 0,5 ± 0,03  | 0,4 ± 0,01  | 0,4 ± 0,01                          | 0,3 ± 0,04  | 0,4 ± 0,01  | 0,3 ± 0,01  |
| $\alpha$ -Canfolenol             | 1125 | 0,4 ± 0,01  | 0,2 ± 0,01                         | 0,3 ± 0,05  | 0,2 ± 0,01  | 0,3 ± 0,02  | 0,3 ± 0,01                          | 0,3 ± 0,05  | 0,4 ± 0,02  | 0,2 ± 0,01  |
| <i>trans</i> -Pinocarveol        | 1139 | 8,2 ± 0,30  | 7,2 ± 0,54                         | 7,0 ± 1,00  | 8,2 ± 0,38  | 7,7 ± 0,28  | 7,8 ± 0,34                          | 6,4 ± 0,02  | 8,9 ± 0,38  | 8,9 ± 0,41  |
| <i>trans-p</i> -Ment-2-en-1-ol   | 1140 | 1,0 ± 0,10  | 1,1 ± 0,13                         | 1,1 ± 0,05  | 0,7 ± 0,31  | 0,6 ± 0,38  | 0,6 ± 0,29                          | 0,7 ± 0,00  | -           | 0,3 ± 0,10  |
| <i>cis</i> -Verbenol             | 1140 | -           | -                                  | -           | -           | -           | -                                   | -           | 3,4 ± 0,15  | 3,2 ± 0,00  |
| <i>trans</i> -Verbenol           | 1144 | 3,9 ± 0,04  | 3,3 ± 0,25                         | 2,8 ± 0,04  | 3,7 ± 0,30  | 3,4 ± 0,02  | 3,3 ± 0,05                          | 2,6 ± 0,18  | 3,4 ± 0,01  | 2,9 ± 0,08  |
| <i>trans</i> -Pinocanfona        | 1160 | 17,4 ± 1,15 | 21,3 ± 1,18                        | 22,5 ± 4,58 | 22,6 ± 0,59 | 21,5 ± 0,70 | 21,4 ± 1,96                         | 24,7 ± 1,55 | 26,2 ± 5,52 | 32,5 ± 2,02 |
| Pinocarvona                      | 1162 | 2,7 ± 0,42  | -                                  | -           | -           | -           | 1,8 ± 2,43                          | -           | 5,2 ± 0,01  | 2,0 ± 1,45  |
| <i>cis</i> -Pinocanfona          | 1173 | 4,6 ± 0,13  | 4,5 ± 0,64                         | 5,4 ± 0,94  | 5,8 ± 0,53  | 5,7 ± 0,20  | 5,7 ± 0,05                          | 5,5 ± 0,36  | 6,9 ± 0,68  | 5,5 ± 4,25  |
| 4-Terpineol                      | 1177 | 0,3 ± 0,21  | 0,6 ± 0,00                         | 0,5 ± 0,01  | 0,5 ± 0,21  | 0,5 ± 0,01  | 0,3 ± 0,03                          | 0,9 ± 0,01  | 0,9 ± 0,01  | 0,3 ± 0,08  |



“Tabela 1, continuação”

|                                       |      |             |             |             |             |            |             |             |             |             |
|---------------------------------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>p</i> -Cimen-8-ol                  | 1183 | 0,6 ± 0,03  | 0,6 ± 0,02  | 0,4 ± 0,07  | 0,6 ± 0,05  | 0,6 ± 0,02 | 0,4 ± 0,04  | 0,4 ± 0,01  | 0,3 ± 0,02  | 0,5 ± 0,07  |
| <i>α</i> -Terpineol                   | 1189 | 0,3 ± 0,02  | 0,4 ± 0,01  | 0,3 ± 0,01  | 0,4 ± 0,02  | 0,4 ± 0,01 | 0,3 ± 0,01  | 0,4 ± 0,01  | 0,3 ± 0,04  | 0,4 ± 0,01  |
| Mirtenol                              | 1193 | 6,5 ± 0,23  | 7,9 ± 0,10  | 6,4 ± 0,24  | 6,3 ± 0,25  | 5,9 ± 0,13 | 6,1 ± 0,04  | 6,4 ± 0,40  | 6,9 ± 0,89  | 6,1 ± 0,34  |
| Verbenona                             | 1204 | 0,7 ± 0,03  | 0,6 ± 0,03  | 0,5 ± 0,10  | 0,7 ± 0,03  | 0,6 ± 0,02 | 0,5 ± 0,01  | 0,4 ± 0,07  | 0,5 ± 0,03  | 0,5 ± 0,06  |
| <i>trans</i> -Carveol                 | 1217 | 0,8 ± 0,02  | 0,9 ± 0,03  | 0,7 ± 0,04  | 0,8 ± 0,03  | 0,7 ± 0,02 | 0,6 ± 0,01  | 0,6 ± 0,08  | 0,6 ± 0,09  | 0,5 ± 0,12  |
| Carvona                               | 1242 | 0,7 ± 0,01  | 0,7 ± 0,09  | 0,7 ± 0,07  | 0,8 ± 0,01  | 0,7 ± 0,02 | 0,7 ± 0,01  | 0,6 ± 0,01  | 0,6 ± 0,03  | 0,5 ± 0,01  |
| Acetato de Isobornila                 | 1285 | 1,4 ± 0,04  | 1,3 ± 0,05  | 1,4 ± 0,18  | 1,4 ± 0,08  | 1,3 ± 0,14 | 1,4 ± 0,05  | 1,3 ± 0,17  | 1,1 ± 0,12  | 0,9 ± 0,05  |
| Acetato de <i>trans</i> -pinocarvoila | 1297 | 10,6 ± 0,22 | 16,2 ± 1,21 | 14,4 ± 2,75 | 10,6 ± 0,47 | 9,3 ± 2,28 | 11,4 ± 0,10 | 14,9 ± 1,67 | 10,8 ± 0,52 | 11,5 ± 0,19 |
| <b>Sesquiterpeno</b>                  |      |             |             |             |             |            |             |             |             |             |
| <i>β</i> -Cariofileno                 | 1418 | 0,9 ± 0,01  | 1,6 ± 0,50  | 1,7 ± 0,44  | 1,1 ± 0,06  | 1,3 ± 0,04 | 1,1 ± 0,01  | 2,1 ± 0,33  | 1,2 ± 0,03  | 1,2 ± 0,09  |
| <i>α</i> -Humuleno                    | 1454 | 0,3 ± 0,02  | 0,5 ± 0,15  | 0,5 ± 0,16  | 0,3 ± 0,02  | 0,3 ± 0,02 | 0,3 ± 0,01  | 0,6 ± 0,08  | 0,3 ± 0,01  | 0,3 ± 0,01  |
| Alloaromadendreno                     | 1461 | 0,2 ± 0,02  | 0,2 ± 0,00  | 0,2 ± 0,08  | 0,2 ± 0,01  | 0,2 ± 0,02 | 0,2 ± 0,00  | 0,3 ± 0,04  | 0,1 ± 0,00  | -           |
| Germacreno D                          | 1480 | 0,2 ± 0,04  | 0,4 ± 0,25  | 0,4 ± 0,12  | 0,4 ± 0,03  | 0,6 ± 0,06 | 0,2 ± 0,03  | 0,4 ± 0,01  | 0,5 ± 0,11  | 0,4 ± 0,01  |
| <b>Sesquiterpeno Oxigenado</b>        |      |             |             |             |             |            |             |             |             |             |
| <i>trans</i> - <i>γ</i> -Cadineno     | 1515 | 0,5 ± 0,07  | 0,5 ± 0,06  | 0,5 ± 0,17  | 0,4 ± 0,03  | 0,4 ± 0,04 | 0,4 ± 0,04  | 0,4 ± 0,16  | 0,2 ± 0,03  | 0,2 ± 0,01  |
| Elemol                                | 1549 | 0,6 ± 0,04  | 0,5 ± 0,03  | 0,6 ± 0,13  | 0,4 ± 0,10  | 0,4 ± 0,10 | 0,2 ± 0,21  | 0,4 ± 0,01  | 0,2 ± 0,04  | -           |
| Germacreno B                          | 1556 | 0,5 ± 0,03  | 0,4 ± 0,11  | 0,5 ± 0,08  | 0,8 ± 0,05  | 1,0 ± 0,08 | 0,4 ± 0,14  | 0,4 ± 0,12  | 0,4 ± 0,09  | 0,7 ± 0,12  |
| Espatulenol                           | 1576 | 1,8 ± 0,13  | 2,5 ± 0,54  | 2,4 ± 0,46  | 1,6 ± 0,11  | 1,7 ± 0,10 | 1,5 ± 0,02  | 2,1 ± 0,15  | 0,9 ± 0,08  | 0,9 ± 0,33  |
| Oxido de cariofileno                  | 1581 | 6,5 ± 0,11  | 8,6 ± 1,49  | 7,9 ± 1,73  | 4,8 ± 0,11  | 5,2 ± 0,15 | 5,7 ± 0,02  | 6,8 ± 0,07  | 2,7 ± 0,23  | 2,0 ± 0,77  |
| Guaiol                                | 1595 | 2,6 ± 0,17  | 4,2 ± 0,95  | 4,7 ± 1,07  | 2,4 ± 0,15  | 2,3 ± 0,14 | 2,4 ± 0,03  | 4,1 ± 0,13  | 1,3 ± 0,15  | 1,5 ± 0,62  |
| Oxido de Humuleno II                  | 1606 | 1,8 ± 0,07  | 2,4 ± 0,16  | 2,2 ± 0,15  | 1,5 ± 0,23  | 1,6 ± 0,39 | 1,6 ± 0,28  | 1,7 ± 0,19  | 0,6 ± 0,22  | 0,8 ± 0,01  |
| T-cadinol (epi- <i>α</i> -cadinol)    | 1640 | 0,5 ± 0,11  | 0,5 ± 0,03  | 0,5 ± 0,15  | 0,5 ± 0,07  | 0,5 ± 0,10 | 0,4 ± 0,05  | 0,6 ± 0,01  | 0,2 ± 0,06  | -           |
| <i>α</i> -Eudesmol                    | 1652 | 0,4 ± 0,08  | 0,3 ± 0,00  | 0,3 ± 0,14  | 0,4 ± 0,01  | 0,3 ± 0,04 | 0,3 ± 0,01  | 0,3 ± 0,01  | -           | -           |
| <i>α</i> -Cadinol                     | 1653 | 0,8 ± 0,17  | 1,1 ± 0,14  | 0,8 ± 0,22  | 0,7 ± 0,03  | 0,6 ± 0,09 | 0,5 ± 0,05  | 0,7 ± 0,17  | 0,2 ± 0,04  | 0,4 ± 0,00  |
| Bulnesol                              | 1666 | 0,9 ± 0,09  | 1,2 ± 0,18  | 1,4 ± 0,37  | 0,8 ± 0,05  | 0,8 ± 0,06 | 0,7 ± 0,01  | 1,1 ± 0,28  | 0,3 ± 0,04  | 0,6 ± 0,00  |
| Compostos identificados**             |      | 95,3        | 97,9        | 96,0        | 97,7        | 96,6       | 97,2        | 98,6        | 99,7        | 97,3        |

\* IR = Índice de retenção em coluna DB-5. \*\* Média de três injeções ± desvio padrão. § compostos listados na tabela foram os acima de 0,2%.

A mesma espécie nas mesmas condições de latitude, altitude e temperatura, no entanto cultivada com substrato comercial (Plantmax® Hortaliças) com adição de homeopatia *Phosphorus* produziram resultados semelhantes: *trans*-pinocanfona (28,7-34,0%), acetato de *trans*-pinocarvoila (10,1 e 13,4% para 6CH e 12CH, respectivamente),  $\beta$ -pineno (8,5 e 14,9%, para 9CH e 15CH, respectivamente), *trans*-pinocarveol (7,4 e 8,8% para 5CH e 12CH, respectivamente) e *cis*-pinocanfona (6,5 e 7,4 % de 27CH e 30CH, respectivamente) (SANTOS et al., 2011).

Em trabalhos anteriores com *Aloysia gratissima* colhidos em São Paulo (Brasil) evidenciam a variação quanti-qualitativa química da espécie, nos compostos isopinocanfona (25,4%), limoneno (15,1%), guaiol (12,7%) e acetato de *cis*-pinocarvoila (8,3%) como principais compostos (TROVATI, 2009). Estes resultados foram, em contraste com o nosso trabalho, pois o percentual de limoneno no óleo essencial de *A. gratissima* foi muito baixa (0,2 para 1,2%) (Tabela 1).

Os compostos linalol (1,8 – 3,9%) e carvona (0,5 – 0,8%), presentes na espécie *A. gratissima* não sofrem drástica variação no seu percentual, exceto o linalol que está ausente na adubação com 4,5 kg m<sup>-2</sup> de esterco avícola (Tabela 1).

Todavia, o linalol é empregado em perfumaria em substituição aos óleos de bergamota (*Citrus bergamia*) e de lavanda (*Lavandula officinalis*) (MERCK, 1996). A carvona é importante agente antimicrobiano contra bactérias e fungos patogênicos, sendo empregada na indústria de alimentos e produtos antissépticos. Além da sua atividade inseticida, atuando contra moscas das frutas, larvas de insetos, inclusive sobre *Aedes aegypti* (CARVALHO; FONSECA, 2006).

Outros trabalhos com plantas de *A. gratissima*, no noroeste da Argentina, sem qualquer tratamento de agroquímicos, mostraram a presença de

1,8-cineol (45.5%), sabineno (8,3%),  $\alpha$ -pineno (3,1%),  $\alpha$ -humuleno (2,1%) e espathulenol (8,7%) no óleo essencial (DAMBOLENA et al., 2010). Santos et al. (2011) observaram uma quantidade muito baixa de 1,8-cineol (0,3-1,4%) e sabineno (0,1-0,3%), após tratamentos com a homeopatia *Phosphorus* (9CH). Essas variações na composição do óleo essencial e porcentagem de cada composto parecem estar associadas com a ontogenia da população de plantas e com a origem geográfica do material vegetal, conforme trabalhos anteriores da espécie (DAMBOLENA et al., 2010; LEITE et al., 2007).

No presente estudo com plantas de alfazema-brasileira, as doses de 4,5 e 6 kg m<sup>-2</sup> de adubo avícola proporcionaram maior quantidade de monoterpenos (total), 68,5 e 73,2 respectivamente, em relação ao controle (Gráfico 7).

Em trabalhos anteriores, o óleo essencial de plantas de *V. gratissima* tratadas com homeopatia *Phosphorus* (dinamização 5CH) é composto, majoritariamente, por monoterpenos totais (76,3%), enquanto o óleo essencial de dinamização 27CH apresentou maior concentração de sesquiterpenos totais (38,1%) (SANTOS et al., 2011).

O consumo de plantas ricas em monoterpenos está sendo estimulado pela provável capacidade destes compostos em prevenirem o câncer. Entretanto, a atividade antitumoral dos monoterpenos pode ser tanto pela habilidade em prevenir a formação ou progressão do câncer como pela capacidade de regressão de tumores malignos já desenvolvidos (CROWELL, 1999).

Diante disso, a espécie *A. gratissima* poderia ser incluída na dieta como alternativa para uma dieta com efeito antioxidante, pela presença majoritária de monoterpenos (Gráfico 5).

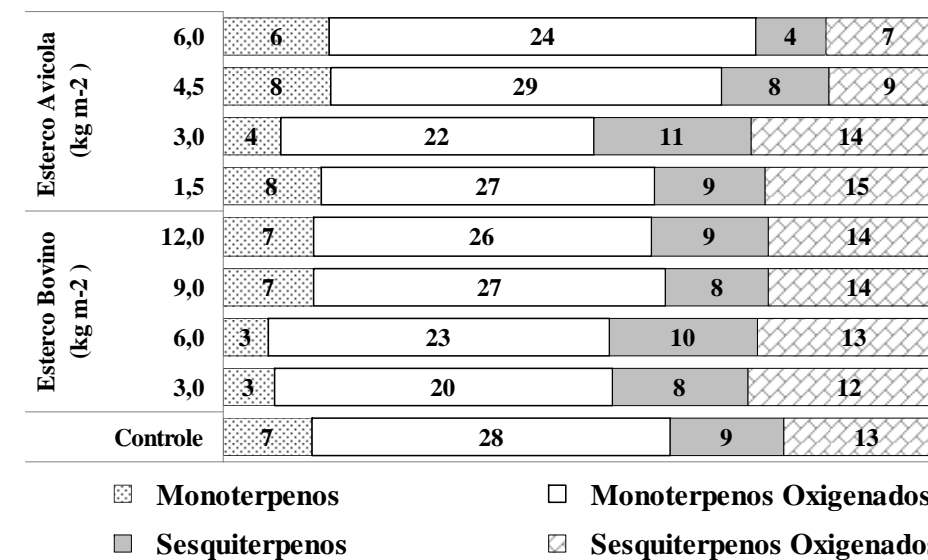


Gráfico 7 Porcentagem de compostos no óleo essencial de plantas de *A. gratissima* cultivadas com diferentes doses de esterco orgânico bovino e avícola - hidrocarbonetos monoterpênicos; monoterpênicos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados. UFLA, Lavras, 2012.

Conforme relatos da literatura, temos que os monoterpênicos alqueno  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno são precursores de alguns compostos voláteis, como a transpinocanfona, pinocarvona, mirtenol, verbenol e verbenona (KARP; CROTEAU, 1992; LINDMARK-HENRIKSSON, 2003).

Em plantas de *Hyssopus officinalis* têm-se caracterizado a formação a partir do  $\beta$ -pineno, de *trans*-pinocarvoila, pinocarvona e *trans* e *cis*-pinocanfona. Como a partir do  $\alpha$ -pineno, temos a formação de mirtenol (KARP; CROTEAU, 1992).

Além da síntese de compostos voláteis pelas plantas, temos a biotransformação dos compostos voláteis como pinenos e limoneno por vários micro-organismo, sendo de importância fundamental para as indústrias de solventes, de alimentos, de perfumes, etc.

O metabolismo microbiano de pinenos geralmente leva a diversas rotas de degradação e, conseqüentemente, a uma ampla variedade de produtos com diferentes concentrações. Com isso, temos a biotransformação na conífera *Picea abies* do  $\alpha$ -pineno em mirtenol, verbenol, verbenona,  $\alpha$ -terpineol, sobrerol e pinocarvol (LINDMARK-HENRIKSSON, 2003).

Entretanto, para a espécie *A. gratissima* podemos inferir que, provavelmente o baixo  $\alpha$ -pineno, pode estar envolvido com a produção de mirtenol, verbenol, verbenona e  $\alpha$ -terpineol.

Com isso, observamos a produção desses compostos para a espécie *A. gratissima* sendo influenciada pela adubação orgânica, quanto às doses e aos tipos de adubo bovino ou avícola (Gráfico 8).

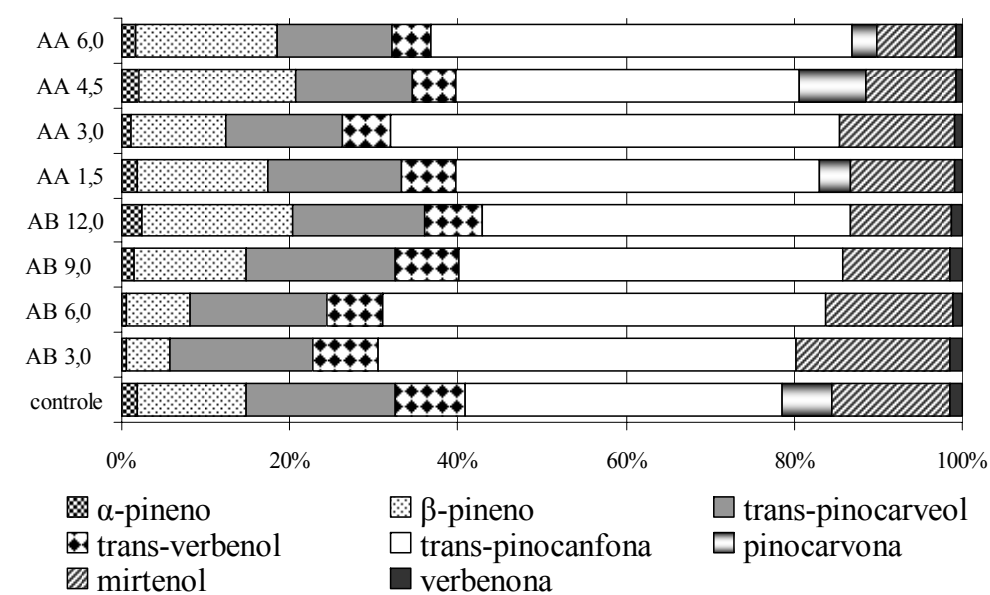


Gráfico 8 Percentagem de monoterpenos advindos da rota metabólica do  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno em plantas de *A. gratissima* cultivadas com diferentes doses de esterco orgânico bovino (AB) e avícola (AA). UFLA, Lavras, 2012.

As plantas de *A. gratissima* responderam a todas as doses de esterco, tanto no crescimento vegetativo, como na composição do óleo essencial, que revelou um bom equilíbrio entre a nutrição, o crescimento e a defesa da planta. O uso de esterco pode interferir com o metabolismo primário e secundário, mostrando que as plantas tratadas com esterco permaneceram saudáveis, sem ataque de pragas e doenças para as plantas *A. gratissima*, em contraste com as plantas sem adubo que eram pequenas e sem força, com folhas verdes opacas e delgadas.

#### **4 CONCLUSÕES**

As plantas de *A. gratissima* respondem positivamente à fertilização orgânica com esterco bovino e avícola. Não foi possível definir uma dose, já que para ambos fertilizantes orgânicos as doses máximas indicaram o menor acúmulo de BSF. Entretanto, o ganho de BSF (72,58 g) foi superior com fertilização de 6 kg m<sup>-2</sup> de adubo orgânico avícola e com a dose de 12 kg m<sup>-2</sup> (62,13g) de esterco bovino.

A fertilização avícola também proporcionou maior teor de óleo essencial e dobrou os teores do constituinte majoritário *trans*-pinocanfona.

**REFERÊNCIAS**

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.
- BARATELLI, T. G. **Estudo das propriedades alelopáticas vegetais: investigação de substâncias aleloquímicas em *Terminalia catappa* L.** (Combretaceae). Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, 2006. 185 p.
- BEZERRA, A. M. E. et al. Rendimento de biomassa, óleo essencial, teores de fósforo e potássio de chambá em resposta à adubação orgânica e mineral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 37, n. 2, p. 124-129, 2006.
- BLANK, A. F. et al. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo de manjerição cv. Genovese. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 2, p. 175-180, 2005.
- BLUM, L. E. B. et al. Produção de moranga e pepino em solo com incorporação de cama aviária e casca de pinus. **Horticultura Brasileira**, Pelotas, v. 21, n. 4, p. 627-631, out./dez. 2003.
- BRANT, R. S. et al. Produção de biomassa e teor do óleo essencial de cidrão em função da adubação orgânica. **Horticultura Brasileira**, Pelotas, v. 28, n. 1, p. 111-114, 2010.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Natural products. In: \_\_\_\_\_. **Biochemistry & molecular biology of plants**. New York: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.
- CARVALHO, C. M. et al. Rendimento da produção de óleo essencial de capim-santo submetido a diferentes tipos de adubação. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 5, n. 2, p. 456-461, 2005.

CARVALHO, C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Carvone: why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, London, v. 95, p. 413-422, 2006.

CHAGAS, J. H. et al. Produção da hortelã-japonesa em função da adubação orgânica no plantio e em cobertura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 412-417, jul./set. 2011.

CORRÊA, R. M. et al. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.

COSTA, L. C. B. et al. Tipos e doses de adubação orgânica no crescimento, no rendimento e na composição química do óleo essencial de elixir paregórico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2173-2180, dez. 2008.

CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 3, p. 775-778, 1999. Supplement.

DAMBOLENA, J. S. et al. Aromatic plants of northwest Argentina: constituents of the essential oils of aerial parts of seven Verbenaceae: *Lantana* and *Aloysia*. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 22, n. 4, p. 289-293, 2010.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, p. 305-311, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.



KARP, F.; CROTEAU, R. Hydroxylation of (-)- $\beta$ -pinene and (-)- $\alpha$ -pinene by a cytochrome P-450 system from hyssop (*Hyssopus officinalis*). In: PETROSKI, R. J.; MCCORMICK, S. P. (Ed.). **Secondary-metabolite biosynthesis and metabolism**. New York: Plenum, 1992. p. 253-260.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1985. 492 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531 p.

LEITE, M. et al. Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 43, n. 1, p. 121-126, 2007.

LINDMARK-HENRIKSSON, M. **Biotransformations of turpentine constituents: oxygenation and esterification**. 2003. 67 p. Thesis (Doctoral in Organic Chemistry) - Mid Sweden University, Stockholm, 2003.

MAIA, S. S. S. et al. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo do bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) POIT.) (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 3, n. 4, p. 327-331, 2008.

MARX, H. E. et al. A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 97, n. 10, p. 1647-1663, 2010.

MERCK index. 12<sup>th</sup> ed. Whitehouse Station: Merck, 1996. 939 p.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Standard reference database 1: standard reference data program**. Gaithersburg, 1998. 65 p.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Kauranes, phenylethanoids and flavones from *Aloysia virgata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1191-1193, Nov. 2005.

PEIXOTO, R. T. G. Composto orgânico: aplicações, benefícios e restrições de uso. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 56-64, jul. 2000. Suplemento.

RECH, E. G.; FRANKE, L. B.; BARROS, I. B. I. Adubação orgânica e mineral na produção de sementes de abobrinha. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 110-116, mar./abr. 2006.

ROSAL, L. F. et al. Produção vegetal e de óleo essencial de boldo pequeno em função de fontes de adubos orgânicos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 5, p. 670-678, 2011.

SANTOS, F. M. et al. Characterization of essential oil and effects on growth of *Verbena gratissima* plants treated with homeopathic *phosphorus*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 10, p. 1499-1504, out. 2011.

SCARPA, G. F. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 91, n. 1, p. 115-135, Jan. 2004.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 370 p.

SOUZA, A. A.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva santa) usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul - Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 23-29, 2007.

TRANI, P. E. et al. **Superfosfato simples com esterco animal**: um bom fertilizante organomineral. Disponível em:

[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_2/organomineral/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_2/organomineral/index.htm)>. Acesso em: 27 out. 2011.

TROVATI, G. Essential oil composition of *Aloysia gratissima* from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 21, n. 4, p. 325-326, July/Aug. 2009.

## ARTIGO 2

**Characterization of Essential Oil and Effects on Growth of *Verbena gratissima* Plants Treated with Homeopathic Phosphorus**

**Fúlvia M. Santos<sup>a,c</sup>, Lucila E. F. Monfort<sup>a</sup>, Daniel M. Castro<sup>b</sup>, José E. B. P. Pinto<sup>a</sup>, Michele Leonardi<sup>c</sup> and Luisa Pistelli<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Department of Agriculture, Federal University of Lavras, P.O Box 037, Lavras/ MG, BR 37200-000, Brazil

<sup>b</sup>Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, UFRB, Cruz das Almas – BA, BR 44380-000, Brazil

<sup>c</sup>Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, University of Pisa, UNIPI, Pisa. IT 56126, Italy. fulvia.maria@gmail.com

**Received: May 26<sup>th</sup>, 2011; Accepted: June 30<sup>th</sup>, 2011**

**Abstract:** Plant models offer a method to examine the efficacy of homeopathic solutions. Homeopathic *Phosphorus* (P) dynamizations were evaluated on the linear growth and on the dry biomass of *Verbena gratissima*, a plant native to Brazil. The yields and chemical characterization of the essential oil are also given. Plants exhibited phenotypic plasticity after the homeopathic *Phosphorus* treatments. The dynamization 9CH, particularly, interfered with plant growth, height and diameter of stems and on total dry mass. The same dynamization 9CH treatment showed the highest yield of essential oil. The essential oil composition of *V. gratissima* varied according to the different dynamization used. Homeopathic *Phosphorus* provided the greatest amount of  $\beta$ -pinene, *trans*-pinocarveol, *trans*-pinocamphone and *trans*-pinocarvyl acetate in comparison with controls.

**Keywords:** *Aloysia gratissima*, Brazilian-lavander, ultra-high dilutions, agro-homeopathy, CG-MS, dendrogram, terpenes.

---

Artigo publicado na revista NPC - Natural Product Communications 2011, Vol. 6, No. 0, p. 1499 – 1504.

*Verbena gratissima* (Gillies ex Hook) Troncoso (*Aloysia gratissima*) is a perennial shrub used in folk medicine for the treatment of bronchial infections, lung diseases, and bladder disorders. It is also used as an antimicrobial agent and as flavoring for infusions and meat [1,2].

Chemical fertilizers and pesticides have low energy and high chemical composition. When an organism is influenced by such low energy, its own internal energy is unbalanced and can cause outbreaks of symptoms. On the contrary the homeopathic medicine is highly energetic and "beings treated by homeopathy are less vulnerable to disease" [3]. Because of the extreme dilutions used, the environmental impact is low and such treatments are well suited to the holistic approach of sustainable agriculture [4].

Experiments with plants are possible without the disadvantages of clinical trials (such as placebo effect, ethical difficulties, duration of experiments and high costs). Moreover, plant-based bioassays rely on a very cheap and almost inexhaustible source of biological material. This is a very important feature because it allows a large number of experimental repetitions to be performed, and is useful for overcoming the problem of irreproducibility so often reported in homeopathic literature [4].

The main part of the treatments uses highly diluted remedies, sometimes beyond the Avogadro-number border. So, scientific studies started to confirm the effects of high dilutions in homeopathic therapy [5].

Experimental works with the use of homeopathy in plants are rare. More studies are present in the literature about the use of homeopathic *Phosphorus* 3CH, which increased the content of coumarin in *Justicia pectoralis* Jacq plants up to 40.5% [6]. This is in agreement with the hypothesis that homeopathy interferes significantly with the metabolism of plant defense.

The element *phosphorus* (P) is essential for plant growth and development and the Brazilian soil is poor in this element. The term P refers to the chemical

itself, while *Phosphorus* refers to homeopathy, being a Greek term, where *Phospho* means light and *phorus* translates as 'to carry', so *Phosphorus* means "the light carrier". The homeopathic remedy *Phosphorus* covers many symptoms, because it was prescribed for hypersensitive organisms in plants with light sensitivity and as a defense against different attacks [7,8].

Homeopathic *Phosphorus* is recommended in cases of excessive sweating for heat intolerance of plant species or varieties. When demanding plants are not adequately fertilized, they do not respond to growth. If *Phosphorus* is used, the plant growth is identical to the fertilized ones [9].

The objective of this study was to investigate the response of *V. gratissima* to *Phosphorus* in terms of balance between growth and production of terpenes and pathogenesis. According to the observed results, *V. gratissima* is sensitive to energy homeopathic *Phosphorus*, both in growth and in production of biomass (Table 1).

The height of *V. gratissima* plants was significantly higher than the controls for dynamizations of the homeopathic *Phosphorus* 9CH, 21CH and 27CH (143.5, 139.9 and 145.7 cm, respectively) (Table 1).

Regarding the diameter of the stems, almost all the dynamizations tested (6CH, 9CH, 18CH, 21CH, 27CH, 30CH and for the control ethanol 70°GL) significantly increased the width of the stems, ranging between 10.8 mm and 11.9 mm (Table 1). Since the diameter of the stems is correlated directly with the capacity for transporting water and carbohydrates [10] and indirectly with the capacity for storing these metabolites [11], these homeopathic *Phosphorus* dynamizations positively influenced plant growth.

Growth is influenced by the quality and quantity of light, which interferes with the photosynthetic process, causing variations in plant biomass. In this study, even in a greenhouse, the use of homeopathic *Phosphorus* in dynamizations 6CH, 9CH and 27CH probably interfered with the photosynthetic

process and considerably increased the total biomass of plants (110.1, 116.0, 111.6 g, respectively) in comparison with the two controls that had not been subjected to the stimulus of the energy normally used for homeopathic solutions.

Brazilian-lavender is influenced by dynamizations in different vegetative parts. About the root biomass, a large number of dynamizations studied influenced the weight, such as 5CH, 6CH, 9CH, 18CH, 27CH, 30CH and control with ethanol 70°GL, where the values ranged between 30.0g and 33.5 g (Table 1). Dynamization *Phosphorus* 9CH evidenced the highest dry weight of leaves (Table 1). This result is desirable in biological agriculture of medicinal plants, since the elaboration of dynamization 9CH is simple and easy to use for a rational cultivation of *V. gratissima*.

Only the control with water showed the highest value for the root: shoot ratio (0.59) (Table 1). This may be indicative of specialization to different environments. In general, more shaded environments gave a higher allocation to leaves. The homeopathic *Phosphorus* dynamization did not influence this parameter for *V. gratissima* plants.

The increased biomass of shoots (leaves and stems) was achieved at the expense of the root biomass, so the use of homeopathic *Phosphorus* apparently provided a physiological balance of *V. gratissima* plants, which, despite the growth under greenhouse conditions, is more evident in the dynamizations 6CH, 9CH and 27CH (77.7, 83.4, 81.0 g, respectively) (Table 1). Among the physiological aspects, the leaf weight ratio represents the ability of translocation of assimilates from shoots to the rest of the plant. So, if this ratio is higher than in the controls, more efficient translocation occurs and favors the increase in stem diameter. Regarding the leaf weight ratio, the effects of 9CH, 12CH, 15CH, 18CH and 27CH (0.59, 0.58, 0.59, 0.60, 0.56, respectively) were similar and significantly higher than that produced by other dynamizations (Table 1). For the variables of content and yield of oil, only dynamization 9CH presented

higher values. This is in agreement with the results of growth and biomass, where bigger plants with a greater mass produce larger quantities of essential oil of Brazilian-lavander (Table 1).

The homeopathic solutions caused positive and negative variations in the linear growth and production of biomass of *V. gratissima* plants, when compared with controls. This behavior is typical in homeopathy and the same substances can switch from positive to negative effects, according to the stimulation, the solution used, the dynamization and the affinity to the organism, known as “the wave phenomenon”, common in Nature in the electromagnetic spectrum, in the tides, and in many other examples [12].

Regarding the evaluation of the essential oil production in *Verbena gratissima*, the yields ranged between 0.30 to 0.72%, and the major production was shown by dynamization 9CH, which demonstrated the best efficiency of essential oil production (mL/dry weight plant) (35.17) (Table 1).

The effects of homeopathy were observed in basil plants (*Ocimum basilicum* L.) in which the content of essential oil (yield %) in plants treated separately with homeopathic *Sulphur* 30CH (1.1%), *Calcarea carbonica* 30CH (1.1%), *Carbo vegetalis* 30CH (1.3%), and *Phosphorus* 30CH (0.7%) was lower than in the control treated with distilled water (1.7%) [13]. As with *O. basilicum* plants, *V. gratissima* was also not influenced by homeopathic *Phosphorus* 30CH, since this gave a low yield of essential oil in comparison with *Phosphorus* 9CH dynamization (Table 1).

Lemon grass (*C. citratus*) plants, after the use of ISO 12C (isoterapic of lemongrass), produced the highest yield (2.1%) of essential oil from the leaves, while treatment with homeopathic *Sulphur* 200C resulted in the smallest one (1.3%). This work showed that the use of homeopathic ISO in the lower dynamization (ISO12C) was better than the use of dynamization (ISO 200C) to produce good amounts of essential oil (2.1 and 1.5%, respectively) [12].



**Table 1:** Effects of different dynamizations *Phosphorus* together with two controls (distilled water and ethanol 70° GL) on the linear growth, the production of biomass and essential oil yield and efficiency in *Verbena gratissima* plants.

|                  | Height<br>(cm) | Diameter<br>of stems<br>(mm) | Dry mass (g) |        |        |         | Root:sho<br>ot ratio | Leaf weight<br>ratio | Yield**<br>(%,v/w) | E*     |
|------------------|----------------|------------------------------|--------------|--------|--------|---------|----------------------|----------------------|--------------------|--------|
|                  |                |                              | Shoot        | Leaves | Roots  | Total   |                      |                      |                    |        |
| 5CH              | 130.7 c        | 9.9 b                        | 63.9 d       | 34.5 d | 30.0 a | 93.9 d  | 0.5 b                | 0.5 b                | 0.5 f              | 17.3 e |
| 6CH              | 134.0 b        | 11.9 a                       | 77.7 a       | 41.7 b | 32.4 a | 110.1 a | 0.4 c                | 0.5 b                | 0.6 c              | 25.9 c |
| 9CH              | 143.5 a        | 11.1 a                       | 83.4 a       | 49.1 a | 32.6 a | 116.0 a | 0.4 c                | 0.6 a                | 0.7 a              | 35.2 a |
| 12CH             | 136.2 b        | 10.1 b                       | 73.9 b       | 42.8 b | 27.2 b | 101.1 c | 0.4 c                | 0.6 a                | 0.7 b              | 29.8 b |
| 15CH             | 124.9 c        | 10.3 b                       | 67.9 c       | 39.9 c | 27.2 b | 95.1 d  | 0.4 c                | 0.6 a                | 0.6 e              | 22.5 d |
| 18CH             | 130.3 c        | 10.8 a                       | 75.3 b       | 45.1 b | 30.2 a | 105.4 b | 0.4 c                | 0.6 a                | 0.6 c              | 28.7 b |
| 21CH             | 139.9 a        | 11.6 a                       | 73.7 b       | 39.5 c | 27.8 b | 101.6 c | 0.4 c                | 0.5 b                | 0.6 e              | 22.5 d |
| 24CH             | 120.7 d        | 9.1 c                        | 55.8 e       | 28.2 e | 20.8 c | 76.7 f  | 0.4 c                | 0.5 c                | 0.4 e              | 12.7 f |
| 27CH             | 145.7 a        | 11.2 a                       | 81.0 a       | 45.2 b | 30.7 a | 111.6 a | 0.4 c                | 0.6 a                | 0.3 f              | 13.8 f |
| 30CH             | 129.1 c        | 11.2 a                       | 58.3 e       | 29.8 e | 30.0 a | 88.4 e  | 0.5 b                | 0.5 c                | 0.6 d              | 17.9 e |
| H <sub>2</sub> O | 102.2 e        | 8.4 c                        | 41.7 f       | 19.1 f | 28.0 b | 69.7 f  | 0.6 a                | 0.4 d                | 0.6 e              | 11.1 g |
| Ethanol          | 130.7 c        | 11.4 a                       | 71.8 b       | 36.0 d | 33.5 a | 105.3 b | 0.5 b                | 0.5 c                | 0.7 b              | 24.7 c |
| CV               | 5.22           | 7.53                         | 7.39         | 10.43  | 15.27  | 7.97    | 10.56                | 6.31                 | 3.70               | 10.56  |

Means followed by same letter in vertical, not statistically different among themselves, by Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ). CV = coefficient of variation (%). \* Efficiency = mL·dry weight plant. \*\* Dry mass

*Trans*-pinocamphone was the main compound present in the essential oils of *V. gratissima* after all homeopathic *Phosphorus* treatments, and in the controls ranging from 28.7 to 34.0% (Table 2). Other marker compounds were *trans*-pinocarvyl acetate (10.1 and 13.4% for 6CH and 12CH, respectively),  $\beta$ -pinene (8.5 and 14.9%, for 9CH and 15CH, respectively), *trans*-pinocarveol (7.4 and 8.8% for 5CH and 12CH, respectively) and *cis*-pinocamphone (6.5 and 7.4% for 27CH and 30CH, respectively) (Table 2).

*V. gratissima* (*Aloysia gratissima*) harvested in Sao Paulo (Brazil) showed a phytochemical plasticity since isopinocamphone (25.4%), limonene (15.1%), guaiol (12.7%) and *cis*-pinocarvyl acetate (8.3%) were evidenced as main compounds [14]. These results were in contrast with our work since the percentage of limonene in *V. gratissima* essential oil was too low (from 0.6 to 1.0%) (Table 2).

Plants of Brazilian-lavender from northeast Argentina showed  $\beta$ -elemene (tr to 35.7%), viridiflorol (0.9–33.6%),  $\beta$ -caryophyllene (1.8–28%),  $\alpha$ -thujone (6.8–17.5%), 10-*epi*-cubebol (0.1–13.4%), bicyclogermacrene (3.8–12.8%), (E)-nerolidol (tr to 11.6%), and germacrene D (1.9–10.1%) as the principal constituents of the essential oil [15].

*V. gratissima* plants, grown in northwest Argentina without any agrochemical treatment, showed the presence of 1,8-cineole (45.5%), thymol (17.4%) and sabinene (8.3%) in the essential oil [16]. In our work 1,8-cineole (from 0.5 to 0.9%) and sabinene (from 0.1 to 0.3%) were identified in very low amounts after *V. gratissima* homeopathic *Phosphorus* treatments (Table 2). These variations in essential oil composition and percentage of each compound were associated with the ontogeny of the plant population and with geographical origin of the plant material.

This study demonstrates the ability of homeopathic preparations to positively influence the metabolism of *V. gratissima*, increasing the production

of essential oil in comparison with the two controls, one water without the homeopathic energy and the other with the application of ethanol 70°GL (Table 2).

The quali-quantitative composition of *Ocimum basilicum* essential oil after different homeopathic treatments with *Sulphur*, *Calcarea carbonica*, *Carbo vegetalis*, *Silicea*, *Arsenicum album* and *Phosphorus*, but with the same number of dynamizations (30CH), was not influenced [13].

Our study evidences that *Verbena gratissima* has plasticity physiological behavior since the applications of dynamized homeopathic *Phosphorus* provided variations in growth, dry weigh, yield of essential oil and essential oil quali-quantitative composition (Table 2). In general, results coming from homeopathic treatments are not linearly related with the dynamization applied, according to the data observed in the literature [17].

The classification of the identified compounds in the essential oils of *V. gratissima* based on functional groups is summarized in Figure 1. Oxygenated monoterpenes predominated, representing 60.4-48.8% of the total volatiles, while, oxygenated sesquiterpenes constituted 21.9-14.6% of the oil. The number of indentified compounds ranged from 43.7 (average of three replications) in the control with ethanol 70%, to 31.7 in dynamization 9CH (Table 2). The dynamization *Phosphorus* 9CH showed the highest percentage of oxygenated monoterpenes (60.4%) (Figure 1).

**Table 2:** Chemical composition of *Verbena gratissima* essential oils obtained by homeopathic *Phosphorus* in comparison with two controls (distilled water and ethanol 70° GL) (average of three replications).

|                                 | LRI* | Ethanol     | H <sub>2</sub> O | 5CH        | 6CH        | 9CH         | 12CH       | 15CH       | 18CH       | 21CH       | 24CH       | 27CH       | 30CH        |
|---------------------------------|------|-------------|------------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| <i>α</i> -pinene                | 939  | 0.9 ± 0.01  | 1.0 ± 0.10       | 1.5 ± 0.13 | 1.2 ± 0.19 | 1.5 ± 0.15  | 1.7 ± 0.40 | 0.8 ± 0.07 | 1.2 ± 0.06 | 0.8 ± 0.07 | 1.4 ± 0.07 | 1.1 ± 0.13 | 1.0 ± 0.06  |
| sabinene                        | 976  | 0.2 ± 0.01  | 0.2 ± 0.04       | 0.3 ± 0.01 | 0.2 ± 0.03 | 0.3 ± 0.01  | 0.2 ± 0.08 | 0.2 ± 0.00 | 0.3 ± 0.03 | 0.2 ± 0.05 | 0.3 ± 0.03 | -          | 0.2 ± 0.02  |
| <i>β</i> -pinene                | 980  | 9.6 ± 0.02  | 11.0 ± .90       | 14.8 ± .26 | 12.0 ± .41 | 14.9 ± .29  | 12.6 ± .20 | 8.5 ± 0.28 | 12.1 ± .93 | 9.0 ± 0.50 | 14.5 ± .94 | 8.9 ± 1.03 | 10.7 ± .60  |
| myrcene                         | 991  | 0.1 ± 0.0   | 0.1 ± 0.01       | 0.2 ± 0.02 | 0.1 ± 0.02 | -           | 0.2 ± 0.00 | -          | 0.1 ± 0.04 | -          | 0.1 ± 0.00 | -          | 0.2 ± 0.03  |
| <i>p</i> -cymene                | 1026 | 0.2 ± 0.03  | 0.2 ± 0.04       | 0.2 ± 0.03 | 0.1 ± 0.02 | 0.2 ± 0.01  | 0.2 ± 0.04 | 0.2 ± 0.00 | 0.2 ± 0.01 | 0.1 ± 0.00 | 0.2 ± 0.01 | -          | 0.2 ± 0.03  |
| limonene                        | 1031 | 0.9 ± 0.02  | 0.8 ± 0.07       | 1.0 ± 0.11 | 0.8 ± 0.09 | 1.0 ± 0.12  | 0.9 ± 0.17 | 0.6 ± 0.09 | 0.9 ± 0.03 | 0.6 ± 0.04 | 0.8 ± 0.05 | 0.7 ± 0.06 | 0.8 ± 0.04  |
| 1.8-cineole                     | 1033 | 0.7 ± 0.01  | 0.8 ± 0.08       | 0.9 ± 0.07 | 0.7 ± 0.04 | 0.9 ± 0.06  | 0.9 ± 0.21 | 0.6 ± 0.04 | 0.8 ± 0.01 | 0.7 ± 0.02 | 1.0 ± 0.04 | 0.5 ± 0.07 | 0.7 ± 0.06  |
| <i>cis</i> -sabinene hydrate    | 1068 | 0.3 ± 0.04  | 0.3 ± 0.02       | 0.4 ± 0.02 | 0.3 ± 0.05 | 0.3 ± 0.05  | 0.3 ± 0.03 | 0.3 ± 0.06 | 0.3 ± 0.02 | 0.3 ± 0.04 | 0.4 ± 0.04 | 0.2 ± 0.04 | 0.4 ± 0.03  |
| linalool                        | 1097 | 3.7 ± 0.11  | 4.2 ± 0.07       | 4.1 ± 0.17 | 3.9 ± 0.02 | 4.1 ± 0.20  | 4.6 ± 0.11 | 4.0 ± 0.12 | 4.6 ± 0.18 | 4.1 ± 0.20 | 4.6 ± 0.11 | 4.0 ± 0.18 | 4.0 ± 0.12  |
| <i>α</i> -campholenal           | 1125 | -           | 0.2 ± 0.02       | 0.2 ± 0.00 | 0.1 ± 0.05 | -           | -          | 0.2 ± 0.07 | 0.1 ± 0.00 | 0.1 ± 0.01 | 0.1 ± 0.02 | -          | 0.2 ± 0.00  |
| <i>trans</i> -pinocarveol       | 1139 | 7.7 ± 0.15  | 8.2 ± 0.18       | 7.4 ± 0.19 | 7.8 ± 0.15 | 7.6 ± 0.10  | 8.8 ± 0.20 | 7.9 ± 0.20 | 8.4 ± 0.09 | 8.2 ± 0.15 | 7.9 ± 0.08 | 8.3 ± 0.41 | 8.1 ± 0.09  |
| <i>trans-p</i> -menth-2-en-1-ol | 1140 | 0.3 ± 0.01  | 0.4 ± 0.03       | 0.4 ± 0.08 | 0.3 ± 0.08 | 0.4 ± 0.06  | 0.5 ± 0.03 | 0.3 ± 0.04 | 0.4 ± 0.04 | 0.3 ± 0.06 | 0.5 ± 0.00 | 0.4 ± 0.05 | 0.3 ± 0.03  |
| <i>cis</i> -verbenol            | 1140 | 2.9 ± 0.07  | 2.9 ± 0.02       | 2.5 ± 0.14 | 2.7 ± 0.10 | 2.6 ± 0.08  | 3.0 ± 0.23 | 2.8 ± 0.11 | 2.8 ± 0.15 | 3.0 ± 0.09 | 2.5 ± 0.07 | 3.4 ± 0.08 | 2.8 ± 0.19  |
| <i>trans</i> -pinocamphone      | 1160 | 29.7 ± 0.70 | 31.9 ± .97       | 30.9 ± .02 | 30.5 ± .83 | 32.5 ± 1.22 | 31.8 ± .55 | 28.7 ± .68 | 30.4 ± .46 | 32.0 ± .05 | 34.0 ± .78 | 30.3 ± .28 | 30.7 ± 0.89 |
| pinocarvone                     | 1162 | 0.5 ± 0.00  | 0.6 ± 0.22       | 0.4 ± 0.07 | 0.6 ± 0.08 | -           | -          | 0.5 ± 0.11 | 0.5 ± 0.00 | 0.5 ± 0.06 | 0.5 ± 0.12 | 0.5 ± 0.00 | 0.5 ± 0.06  |
| <i>cis</i> -pinocamphone        | 1173 | 7.1 ± 0.02  | 7.3 ± 0.34       | 7.1 ± 0.24 | 7.0 ± 0.14 | 7.1 ± 0.25  | 6.8 ± 0.22 | 6.8 ± 0.09 | 6.6 ± 0.28 | 7.2 ± 0.44 | 7.5 ± 0.40 | 6.5 ± 0.28 | 7.4 ± 0.27  |
| <i>p</i> -cymen-8-ol            | 1183 | 0.4 ± 0.01  | 0.4 ± 0.06       | 0.3 ± 0.05 | 0.4 ± 0.03 | 0.3 ± 0.06  | 0.5 ± 0.09 | 0.4 ± 0.05 | 0.4 ± 0.07 | 0.4 ± 0.01 | 0.2 ± 0.03 | 0.7 ± 0.12 | 0.4 ± 0.03  |
| <i>α</i> -terpineol             | 1189 | 0.4 ± 0.02  | 0.3 ± 0.02       | 0.3 ± 0.03 | 0.3 ± 0.04 | 0.2 ± 0.06  | 0.3 ± 0.07 | 0.3 ± 0.12 | 0.3 ± 0.06 | 0.4 ± 0.08 | 0.2 ± 0.06 | 0.4 ± 0.14 | 0.4 ± 0.06  |

|                                  |      |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|----------------------------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| myrtenol                         | 1193 | 5.0 ± 0.19  | 5.4 ± 0.16  | 4.8 ± 0.22  | 5.1 ± 0.17  | 4.3 ± 0.11  | 5.0 ± 0.25  | 5.3 ± 0.24  | 5.1 ± 0.07  | 5.5 ± 0.08  | 4.7 ± 0.18  | 5.5 ± 0.17  | 5.6 ± 0.17  |
| verbenone                        | 1204 | 0.4 ± 0.02  | 0.3 ± 0.01  | 0.2 ± 0.05  | 0.4 ± 0.05  | 0.3 ± 0.06  | 0.3 ± 0.06  | 0.3 ± 0.06  | 0.4 ± 0.05  | 0.4 ± 0.03  | 0.2 ± 0.02  | 0.4 ± 0.03  | 0.4 ± 0.08  |
| carveol                          | 1217 | 0.4 ± 0.04  | 0.4 ± 0.01  | 0.3 ± 0.06  | 0.4 ± 0.06  | 0.4 ± 0.09  | 0.4 ± 0.06  | 0.4 ± 0.04  | 0.4 ± 0.06  | 0.5 ± 0.06  | 0.2 ± 0.01  | 0.5 ± 0.14  | 0.3 ± 0.06  |
| carvone                          | 1242 | 0.4 ± 0.05  | 0.4 ± 0.05  | 0.3 ± 0.01  | 0.4 ± 0.04  | 0.3 ± 0.09  | 0.3 ± 0.06  | 0.4 ± 0.06  | 0.4 ± 0.01  | 0.4 ± 0.06  | 0.2 ± 0.02  | 0.3 ± 0.04  | 0.4 ± 0.03  |
| isobornyl acetate                | 1285 | 1.0 ± 0.03  | 1.0 ± 0.01  | 0.9 ± 0.06  | 1.1 ± 0.08  | 0.9 ± 0.10  | 0.9 ± 0.20  | 1.1 ± 0.09  | 1.0 ± 0.05  | 1.1 ± 0.05  | 1.1 ± 0.05  | 1.0 ± 0.13  | 0.9 ± 0.03  |
| <i>trans</i> -pinocarvyl acetate | 1297 | 11.6 ± 0.09 | 12.3 ± 0.24 | 10.9 ± 0.81 | 13.4 ± 1.25 | 10.7 ± 0.81 | 10.1 ± 1.47 | 12.5 ± 0.53 | 11.0 ± 0.17 | 13.1 ± 0.01 | 11.5 ± 0.41 | 11.6 ± 0.48 | 12.1 ± 0.34 |
| β-caryophyllene                  | 1418 | 2.7 ± 0.02  | 1.3 ± 0.05  | 1.6 ± 0.30  | 1.8 ± 0.34  | 1.7 ± 0.22  | 1.6 ± 0.44  | 2.1 ± 0.10  | 1.8 ± 0.06  | 2.0 ± 0.09  | 0.9 ± 0.04  | 2.3 ± 0.18  | 1.9 ± 0.13  |
| α-humulene                       | 1454 | 0.7 ± 0.03  | 0.4 ± 0.06  | 0.5 ± 0.08  | 0.5 ± 0.09  | 0.5 ± 0.12  | 0.4 ± 0.17  | 0.6 ± 0.01  | 0.5 ± 0.01  | 0.6 ± 0.03  | 0.3 ± 0.02  | 0.7 ± 0.12  | 0.5 ± 0.03  |
| alloaroma-dendrene               | 1461 | 0.2 ± 0.03  | 0.1 ± 0.00  | -           | 0.2 ± 0.01  | 0.2 ± 0.00  | 0.2 ± 0.03  | 0.2 ± 0.01  | 0.2 ± 0.03  | 0.2 ± 0.01  | -           | 0.3 ± 0.01  | 0.2 ± 0.01  |
| germacrene D                     | 1480 | 0.6 ± 0.01  | 0.3 ± 0.09  | 0.3 ± 0.12  | 0.3 ± 0.07  | 0.4 ± 0.03  | 0.3 ± 0.09  | 0.5 ± 0.05  | 0.5 ± 0.03  | 0.4 ± 0.04  | 0.1 ± 0.00  | 0.5 ± 0.07  | 0.5 ± 0.06  |
| γ-cadinene                       | 1513 | 0.3 ± 0.01  | 0.2 ± 0.01  | -           | 0.2 ± 0.06  | 0.3 ± 0.00  | 0.2 ± 0.04  | 0.2 ± 0.00  | 0.2 ± 0.00  | 0.1 ± 0.00  | 0.2 ± 0.00  | 0.3 ± 0.00  | -           |
| germacrene B                     | 1556 | 1.6 ± 0.12  | 0.6 ± 0.16  | 0.9 ± 0.28  | 0.9 ± 0.27  | 1.0 ± 0.16  | 1.0 ± 0.37  | 1.3 ± 0.13  | 1.1 ± 0.16  | 0.9 ± 0.08  | 0.4 ± 0.02  | 1.6 ± 0.23  | 1.0 ± 0.11  |
| (+) spathulenol                  | 1576 | 0.9 ± 0.10  | 0.6 ± 0.21  | 0.5 ± 0.21  | 0.7 ± 0.22  | 0.4 ± 0.08  | 0.4 ± 0.19  | 0.8 ± 0.07  | 0.5 ± 0.11  | 0.6 ± 0.09  | 0.2 ± 0.08  | 0.8 ± 0.18  | 0.6 ± 0.07  |
| caryophyllene oxyde              | 1581 | 3.3 ± 0.04  | 2.7 ± 0.78  | 2.6 ± 0.97  | 3.0 ± 0.84  | 2.2 ± 0.33  | 2.6 ± 0.92  | 3.8 ± 0.16  | 2.7 ± 0.38  | 3.3 ± 0.33  | 1.9 ± 0.16  | 3.7 ± 0.58  | 2.9 ± 0.41  |
| guaiol                           | 1595 | 2.4 ± 0.09  | 1.6 ± 0.60  | 1.7 ± 0.63  | 1.4 ± 0.14  | 1.8 ± 0.38  | 1.8 ± 0.79  | 3.3 ± 0.17  | 2.1 ± 0.29  | 1.7 ± 0.19  | 0.9 ± 0.10  | 3.1 ± 0.54  | 1.7 ± 0.21  |
| humulene oxide II                | 1606 | 0.9 ± 0.17  | 0.6 ± 0.20  | 0.5 ± 0.22  | 0.5 ± 0.05  | 0.6 ± 0.00  | 0.7 ± 0.35  | 1.1 ± 0.14  | 0.8 ± 0.13  | 0.7 ± 0.12  | 0.3 ± 0.08  | 0.9 ± 0.40  | 0.6 ± 0.13  |
| bulnesol                         | 1666 | 0.6 ± 0.01  | 0.5 ± 0.40  | 0.4 ± 0.13  | 0.3 ± 0.10  | 0.4 ± 0.12  | 0.4 ± 0.20  | 0.9 ± 0.05  | 0.5 ± 0.12  | 0.4 ± 0.05  | 0.2 ± 0.01  | 0.9 ± 0.21  | 0.4 ± 0.09  |
| Identified components**          |      | 99.9        | 99.9        | 99.9        | 100.0       | 99.9        | 100.0       | 99.9        | 100.0       | 99.9        | 100.0       | 100.0       | 99.9        |

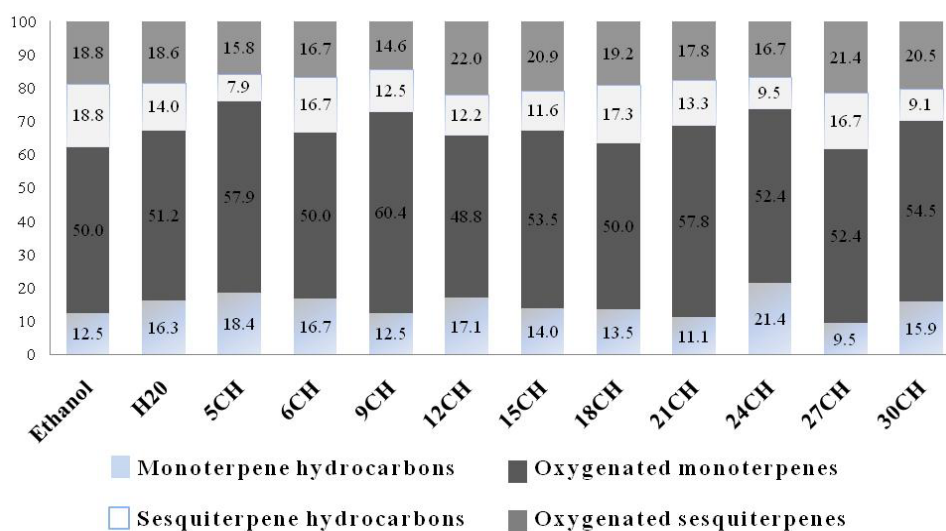
\* LRI = linear retention index, \*\* Average of triplicate replications

According to our results for *V. gratissima*, the essential oil from dynamization 5CH presented more total monoterpenes (76.3%), while the essential oil from dynamization 27CH had a higher concentration of total sesquiterpenes (38.1%) (Figure 1). The pinenes are among the most common monoterpenes produced by plants. These compounds are toxic to bark beetles and their pathogenic fungal symbionts [18]. Probably the high concentration of monoterpenes in *V. gratissima* preserves this plant from pathogenic attack. Moreover, linalool and 1,8-cineole emitted by flowers of Brazilian-lavander were useful as attractants for pollinators, including bees, moths and bats.

Among the identified compounds in *V. gratissima* essential oil (Table 2), 1,8-cineole, limonene, linalool and germacrene-D were reported previously as possessing antimicrobial activity [19]. 1,8-Cineole and camphor act as foliar feeding deterrents to large herbivores such as hares and deer. Also, they may provide a competitive advantage to several angiosperm species as allelopathic agents that inhibit germination of seeds of other species [18]. Thus this work on *V. gratissima* essential oil evidenced a probable action as an allelopathic agent.

Hierarchical cluster analyses (HCA) or a dendrogram is a method in which samples are considered as lying in a n-dimensional space and distances between samples are calculated joining the objects with an agglomerative procedure [20]. This can be applied to create a hierarchy of clusters which groups similar data. As observed in the dendrogram, the composition of the essential oils of twelve samples was divided into three major groups: group A (Ethanol 70°GL; 15CH and 27CH), group B (water and 30CH; 21CH; 6CH and 18CH) and group C (5CH and 24CH; 9CH and 12CH) (Figure 2). More similarity was evidenced in group B, in which water and 30CH showed the shortest distance, followed by the dynamization 21CH. Also group C demonstrated a high hierarchical clustering, while group A had more distance from the others (Figure 2). The similarity observed for the chemical composition

of the essential oil is not necessarily in accordance with the growth data. The water control and dynamization 30CH had similar biomass production and yield of essential oil, but were quite distant for evaluation of plant height and diameter of stems (Table 1, Figure 2).

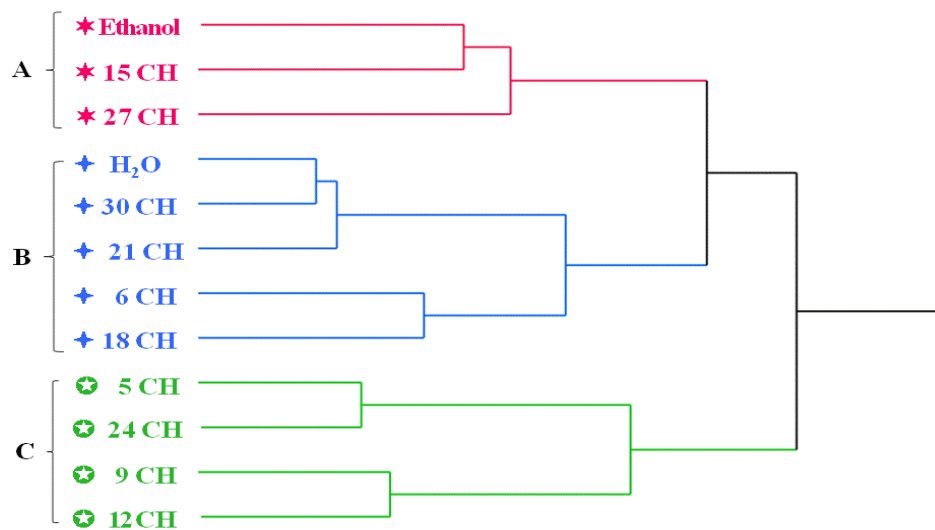


**Figure 1:** Percentage of compounds in essential oil from 10 dynamizations and two controls (ethanol 70°GL and water) of *V. gratissima* – monoterpene hydrocarbons; oxygenated monoterpenes; sesquiterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes.

According to the data obtained from the dendrogram, dynamization *Phosphorus* 9CH and 12CH, and insert group C, showed similarity, not only for the essential oil composition, but also for data obtained for growth, biomass production and oil yield (Table 1, Figure 2). Therefore, they could be used for the same purposes in biological agriculture. This use of multivariate statistical analyses for CG-MS data seems to be very useful to investigate and establish the

natural correlation within complex studies as with the homeopathic treatment of plants, and HCA permitted a clear indication of the proximities between the different dynamization homeopathic treatments.

Therefore, *V. gratissima* responded specifically to homeopathic preparations, both in vegetative growth, and in the composition of the essential oil, which revealed a good balance between the homeopathic energy, the growth and the plant defense. *Phosphorus* in dynamization 9CH, when applied 3 times a week to *V. gratissima* plants, may interfere with primary and secondary metabolism, showing that the plants treated with homeopathic *Phosphorus* remained healthy, without pest attack and diseases.



**Figure 2:** Hierarchical Cluster Analyses obtained from chemical composition of *V. gratissima* essential oils treated with homeopathic *Phosphorus* in comparison with two controls (distilled water and ethanol 70° GL).



## EXPERIMENTAL

**Plant material:** *Verbena gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso seeds, collected in March, 2009 from a sample cultivated in a commercial substrate Plantmax® Hortaliças [voucher specimens were deposited at the Herbarium of the Federal University of Lavras (UFLA) under the register number 19810] were cultivated in a greenhouse for 6 months, from April to October, 2009. After 35 days, the plants were transplanted into 10 L pots with a commercial substrate; each treatment was replicated 10 times. After 30 days of transplantation, in randomized and double-blinded experiments, *V. gratissima* was grown with ten different dynamized homeopathic *Phosphorus*. The homeopathic solutions were applied diluted to 1% in distilled water, in 10 centesimal dynamizations (5CH, 6CH, 9CH, 12CH, 15CH, 18CH, 21CH, 24CH, 27CH and 30CH) in comparison with 2 controls (unsuccussed distilled water and ethanol 70°GL) and administered 100 mL per pot 3 times a week in the morning, for 3 months. The required humidity was maintained.

After 3 months, we evaluated the growth factors: total plant height (shoot, cm), diameter of stem (mm), dry weight of shoot, leaves, root and total (g); root:shoot ratio, leaf weight ratio [leaf weight/ total weight ( $\text{g g}^{-1}$ )] of *V. gratissima* plants. Efficiency of essential oil was calculated using the yield, multiplied by the mean value of the biomass of the dry leaves ( $\text{mL}\cdot\text{plant}$ ). A totally randomized design was adopted for the growth analysis, which included 12 different treatments, 10 pots (experimental units) and 2 plants per repetition. Data were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) and mean values were compared using the Scott-Knott's test ( $P < 0.05$ ).

**Isolation procedures:** The essential oils from dry leaves of *V. gratissima* (100 g) were extracted by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus for 2 h. The

essential oils were isolated by weight difference in a centrifuge (1G for 10 min) and the oily phase was separated with the aid of a Pasteur pipette.

**Gas chromatography–mass spectrometry:** GC–EIMS analyses were performed with a Varian CP-3800 gas chromatograph equipped with a DB-5 capillary column (30 m × 0.25 mm; coating thickness 0.25 μm) and a Varian Saturn 2000 ion trap mass detector. Analytical conditions: injector and transfer line temperatures, 220°C and 240°C, respectively; oven temperature programmed from 60°C to 240°C at 30°C/min; carrier gas, helium at 1 mL/min; injection, 0.2 μL (10% *n*-hexane solution); split ratio, 1:30. Identification of the constituents was based on comparison of the retention times with those of authentic samples, comparing their linear retention indices relative to a series of *n*-hydrocarbons, and on computer matching against commercial (NIST 98 and ADAMS) and home-made library mass spectra built up from pure substances and components of known oils and MS literature data. Moreover, the molecular weights of all the identified substances were confirmed by GC–CIMS, using MeOH as CI ionizing gas. The analyses were performed in triplicate. [21].

**Data analysis:** Data from essential oil composition for all analyzed samples (homeopathic *Phosphorus* in 10 centesimal dynamizations and the 2 controls) were subjected to hierarchical cluster analyses (HCA) (dendrogram) using the Ward's variance minimizing method [22].

**Acknowledgments** - The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig), to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERENCES

- [1] Pinto JEBP, Cardoso JCW, Castro EM, Bertolucci SKV, Melo LA, Dousseau S. (2007) Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-brasil em função de níveis de sombreamento. *Revista Brasileira de Horticultura*, **25**, 210-214.
- [2] Santos FM, Pinto JEBP, Alvarenga AA, Oliveira JA, Oliveira AA, Oliveira LP. (2009) Produção de mudas de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. por meio da propagação sexuada e assexuada. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, **11**, 130-136.
- [3] Brunini CMNO (1993) Idiossincrasia – Leis de cura susceptibilidades noxas – conceito de saúde. In *Homeopatia: princípios. doutrina. farmácia IBEHE*. Brunini C, Sampaio C. (Eds). São Paulo. SP, Mythos, 73 – 82.
- [4] Betti L, Borghini F, Nani D. (2003) Plant models for fundamental research in homeopathy. *Homeopathy*, **92**, 129–130.
- [5] Bastide M. (2006) Teorias interpretativas sobre as ultradiluições e evidências a favor (interpretative theories about ultra-dilutions: supporting Evidence). *Cultura Homeopática*, **16**, 22-30.
- [6] Cavalca PAM, Lolis MIGA, Reis B, Bonato CM. (2010) Homeopathic and larvicide effect of *Eucalyptus cinerea* essential oil against *Aedes aegypti*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **53**, 4, 835-843.
- [7] Voisin H. (1987) Manual de matéria médica homeopática para o clínico homeopata. São Paulo: Ed Andrei.
- [8] Moreno JA. (1999) Homeopatia metafísica. Belo Horizonte: *Hipocratica – Hahnemanniana*, v 5, 67-117.
- [9] Rezende JM. (2009) *Caderno de Homeopatia: Instruções práticas geradas por agricultores sobre o uso da homeopatia no meio rural* 3 Ed. Universidade Federal de Viçosa/ Fitotecnia, Viçosa- MG, 1-51.
- [10] Stuefer JF, Huber H. (1998) Differential effects of light quantity and spectral light quality on growth. morphology and development of two stoloniferous *Potentilla* species. *Oecologia*, **117**, 1-8.

- [11] Lee DW, Oberbauer SF, Krishnapilay B, Mansor M, Mohamad H, Yap SK. (1997). Effects of irradiance and spectral quality on seedling development of two Southeast Asian *Hopea* species. *Oecologia*, **110**, 1-9.
- [12] Castro DM, Casali VWD, Duarte ESM, Armond C, Arruda VM, Almeida AA, Henriques E, Silva CV, Cecon PR. (2003) Conteúdo relativo de óleo essencial na matéria seca de plantas de capim-limão submetidas à soluções homeopáticas. In: Congresso Brasileiro de Olericultura. 43 Recife. PE. *Horticultura Brasileira: Sociedade Brasileira de Olericultura*, **21**, 410-410.
- [13] Almeida MAZ. (2002) *Resposta do manjericão (Ocimum basilicum L.) a aplicações de preparações homeopáticas*. Dissertation (Master). Department of Phytotechnics. *Federal University of Viçosa*, UFV. Viçosa, MG. Brazil.
- [14] Trovati G. (2009) Essential oil composition of *Aloysia gratissima* from Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, **21**, 325-326.
- [15] Ricciardi GAL, van Baren CM, Di Leo Lira P, Ricciardi AIA, Lorenzo D, Dellacassa E, Bandoni AL. (2006) Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina. *Flavour and Fragrance Journal*, **21**, 698–703.
- [16] Dambolena JS, Zunino MP, Lucini EI, Zygodlo JA, Banchio E, Biurrun F, Rotman A, Ahumada O. (2010) Aromatic plants of northwest Argentina. Constituents of the essential oils of aerial parts of seven Verbenaceae: *Lantana* and *Aloysia*. *Journal of Essential Oil Research*, **22**, 289 – 293.
- [17] Andrade FMC, Casali VWD, DeVita B, Cecon PR, Barbosa LCA. (2001) Efeito de homeopatas no crescimento e na produção de cumarina em chamba (*Justicia pectoralis* Jacq.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **4**, 1, 19-28.
- [18] Buchanan B, Gruissem W, Jones R. Eds.(2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists Chapter 24 Natural Products (Secondary Metabolites) 1250 – 1318.

- [19] Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. (2005) Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, 305–311.
- [20] Davis J. (1986) *Statistics and data analysis in geology*. Wiley, New York.
- [21] Adams RP. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois. USA.
- [22] Ward JH. (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* **58**, 236-244.

**ARTIGO 3****INDUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS *in vitro* EM PLANTAS DE  
*Aloysia gratissima*.****RESUMO**

*Aloysia gratissima* (Gillies ex Hook) Troncoso (Verbenaceae) apresenta propriedades medicinais como expectorante, adstringente, estimulantes e tratamento de problemas respiratórios. Este trabalho teve como objetivo o estabelecimento *in vitro* de plântulas de *Aloysia gratissima* e a avaliação dos efeitos de reguladores de crescimento na produção de compostos voláteis *in vitro* usando microextração em fase sólida (SPME). Segmentos nodais provenientes de plantas adultas foram estabelecidos em meio Murashige e Skoog (MS) e Woody Plant Medium (WPM) com duas concentrações de sacarose (5 e 30g). Após as plântulas foram cultivadas em meio suplementado com AIB (0,5 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0,1 e 4 mg L<sup>-1</sup>), TDZ (0,11; 0,33 e 0,55 mg L<sup>-1</sup>). Após 35 dias, as plântulas foram analisadas quanto ao crescimento e produção de compostos voláteis. Conclui-se que para a micropropagação da espécie *Aloysia gratissima*, segmentos nodais no meio WPM com 30g de sacarose produz plântulas mais vigorosas e saudáveis. Para o cultivo *in vitro* o BAP e TDZ produz plântulas com maior biomassa fresca e maior número de brotos. Plântulas cultivadas *in vitro* com diferentes reguladores de crescimento apresentaram aumento na produção de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, p-cimeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e germacreno D e B, quando comparadas com a planta matriz.

Palavras chave: Cultivo *in vitro*. *Verbena gratissima*. Alfazema-brasileira. Elicidores.

**INDUCTION OF VOLATILE COMPOUNDS *in vitro* OF THE PLANTS*****Aloysia gratissima*****ABSTRACT**

*Aloysia gratissima* (Gillies ex Hook) Troncoso (Verbenaceae) has medicinal properties as an expectorant, astringent, stimulant and treatment of respiratory problems. This study aimed to evaluate the effect of concentrations of BAP, IBA and TDZ production of volatile compounds *in vitro* of this species. Nodal segments, from adult plants were grown on Murashige and Skoog (MS) and Woody Plant Medium (WPM) with two sucrose concentrations (5 and 30 g), after determining the best culture medium was supplemented with IBA 0,5 mg L<sup>-1</sup>, BAP 0,1 and 4 mg L<sup>-1</sup>, TDZ 0,11, 0,33 and 0,55 mg L<sup>-1</sup>. After 35 days the plants were analyzed for growth and production of volatile compounds. We conclude that for micropropagation of the species *Aloysia gratissima*, nodal segments with WPM with 30 g of sucrose produces more vigorous and healthy plants. For *culture in vitro* BAP and TDZ producing plants with higher fresh biomass and greater number of shoots. Plantlets grown *in vitro* in different plant growth regulator treatments showed increased production of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, p-cymene,  $\beta$ -caryophyllene, and humulene- $\alpha$  germacrene D and B, when compared with the mother plant.

Keywords: *in vitro* culture, micropropagation, *Verbena gratissima*, elicitors.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

|          |  |
|----------|--|
| AIB= IBA | Ácido indolil-3-butírico                           |
| BAP = BA | N6-benzilaminopurina                               |
| CG-EM    | Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas |
| MS       | Murashige & Skoog Medium                           |
| NaOCl    | Hipoclorito de sódio                               |
| SPME     | Microextração em fase sólida                       |
| TDZ      | Tidiazuron   |
| WPM      | Woody Plant Medium                                 |



## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso (Verbenaceae) apresenta propriedades aromáticas, usada na medicina popular como expectorante, adstringente, estimulantes, além de tratamento de problemas respiratórios, afecções estomacais, além do uso como flavorizante de mate e aromatizante de carnes e saladas (DUARTE et al., 2005; SCARPA, 2004; SOLER; DELLACASSA; MOYNA, 1986; SOUZA; WIEST, 2007).

Para a obtenção de protocolos de propagação e para o cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos faz-se necessário a incorporação de uma fonte de carbono no meio de cultura. A sacarose é amplamente utilizada no cultivo *in vitro*. Entretanto, a concentração ótima de sacarose para a indução de morfogênese ou crescimento difere entre as espécies, como também varia entre genótipos muito próximos (GEORGE, 1993; ROCHA et al., 2007).

Outro fator importante é a escolha adequada do meio de cultura, devido ao importante papel dos componentes minerais no processo de regeneração, sendo os nutrientes essenciais: sais orgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento (MACHADO et al., 2007).

A formulação do meio de cultura é de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento. Os opcionais, tais como aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas, podem ser adicionados ao meio para otimizar determinada resposta no padrão de crescimento (TORRES et al., 2001).

Existem várias formulações de meios básicos no cultivo *in vitro*, mas o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com suas modificações e diluições, é o mais utilizado com sucesso para diversas espécies. Porém, para as espécies lenhosas tem-se utilizado o meio MS com  $\frac{1}{4}$  de força (concentração de sais) e o

meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), do inglês “Wood Plant Medium” (BURDYN et al., 2006; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GUTIÉRREZ et al., 2011). O meio WPM contém 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de maior quantidade de potássio e íons sulfato, sendo amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (PASQUAL, 2001).

Apesar do meio WPM ser indicado para espécies lenhosas, as modificações e diluições feitas no meio MS têm apresentado bons resultados para diversas espécies lenhosas, como as *Pfaffia glomerata* (FLORES et al., 2009), *Lippia junelliana* (mold.) Tronc. (JULIANI JUNIOR et al., 1999). As propagadas com WPM são as *Lippia sidoides* (COSTA et al., 2007), *Ficus carica* L. (FRÁGUAS et al., 2004), dentre outras.

Existem estudos com modificações e diluições feitas no meio MS com bons resultados para diversas espécies lenhosas, como para aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All), o meio MS modificado com a metade dos seus sais foi eficiente na multiplicação da espécie (ANDRADE et al., 2000).

A pesquisa e desenvolvimento da biotecnologia para a produção de metabólitos secundários têm recebido um grande impulso a partir de respostas muito positivas das células vegetais e tecidos cultivados *in vitro*. Argumentos em prol das culturas *in vitro* salientam as vantagens, ao longo dos anos, pela disponibilidade de material vegetal, de isolamento do processo e magnitude de reações químicas no crescimento controlado (BERTOLI et al., 2004).

O cultivo *in vitro* de plantas oferece a possibilidade de obtenção de compostos medicinais em grande escala, bem como garante a conservação sustentável e a utilização racional da biodiversidade (COSTE et al., 2011).

A produção de células e tecidos vegetais por meio de cultura de calos, raízes, plântulas, células em suspensão, fusão de protoplasto, etc. é estabelecida a partir dos objetivos que se pretende alcançar, sendo utilizados elicitores para a

modulação da produção de metabólitos secundários (BERTOLI et al., 2004; LUCCHESINI et al., 2009).

Atualmente, poucas culturas produzem compostos secundários *in vitro* em quantidades úteis comercialmente, sendo necessários mais estudos visando à otimização deste processo de produção, bem como para a quantificação e a extração desses produtos (BUFFA FILHO et al., 2002; RAO; RAVISHANKAR, 2002; ZHOU; WU, 2006).

Para o cultivo *in vitro*, o uso de substâncias que interferem no crescimento celular é amplamente difundido. Dentre essas substâncias, temos o hormônio vegetal, que é um composto orgânico de ocorrência natural, produzido na planta, o qual a baixa concentração promove, inibe ou modifica processos morfológicos e fisiológicos do vegetal. Como o regulador de crescimento que possui as mesmas propriedades, sendo porém, exógeno (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A composição e a concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes para o crescimento e padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultivo *in vitro*, pois funcionam como elicitores na produção de metabólitos secundários. Entre os principais grupos de hormônios vegetais utilizados na cultura de tecidos estão as auxinas (IBA) e as citocininas (TDZ e BAP).

Nesse contexto, temos os elicitores, que são moléculas de origem bióticas (hormônios, fungos, bactérias, oligossacarídeos, dentre outros), ou abióticos (radiação UV, íons de metais pesado, dentre outros), capazes de estimular qualquer resposta de defesa nas plantas (BONALDO et al., 2004).

A produção de metabólitos secundários pela indução com elicitores depende de vários fatores, sendo a resposta de indução restrita a certas vias biossintéticas. Assim, a escolha correta do elicitador é fundamental, e não há regras indicadoras de uma combinação adequada para o sistema célula/elicitador.

Entretanto, a escolha e concentração do elicitador, tempo de exposição, densidade de inóculo e o teor de nutrientes do meio de cultura são fatores importantes a se considerar, quando se busca a otimização da produção de biofármacos por meio dessa abordagem (BONALDO et al., 2004; MARASCHIN; VERPOORTE, 1999).

Assim como, a elicitação de uma cultura celular pode resultar na síntese de novos compostos, algumas vezes não encontrados na planta intacta ou planta matriz, ou no aumento da produção de metabólitos secundários nos cultivos *in vitro* (MARASCHIN; VERPOORTE, 1999).

Uma das estratégias para estudos sobre o controle metabólico de compostos secundários é o uso da regeneração de plântulas *in vitro*, através do cultivo de brotos. Essa capacidade de regeneração tem sido muito valiosa para a biotecnologia vegetal, sendo possível o cultivo de exemplares mais produtivos em meios otimizados para o crescimento e acúmulo de metabólitos secundários, incluindo o desenvolvimento de culturas de células (BARS; REINHARD; ZENK, 1977).

Nesse contexto, tem-se uma provável rota metabólica de produção de metabólitos secundários em plantas de hissopo (*Hyssopus officinalis*) a partir do  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno (Figura 1A) (KARP; CROTEAU, 1992), como temos uma proposta de rota de biotransformação do  $\beta$ -pineno usando suspensão celular de *Picea abies* (Figura 1B) (LINDMARK-HENRIKSSON, 2003).

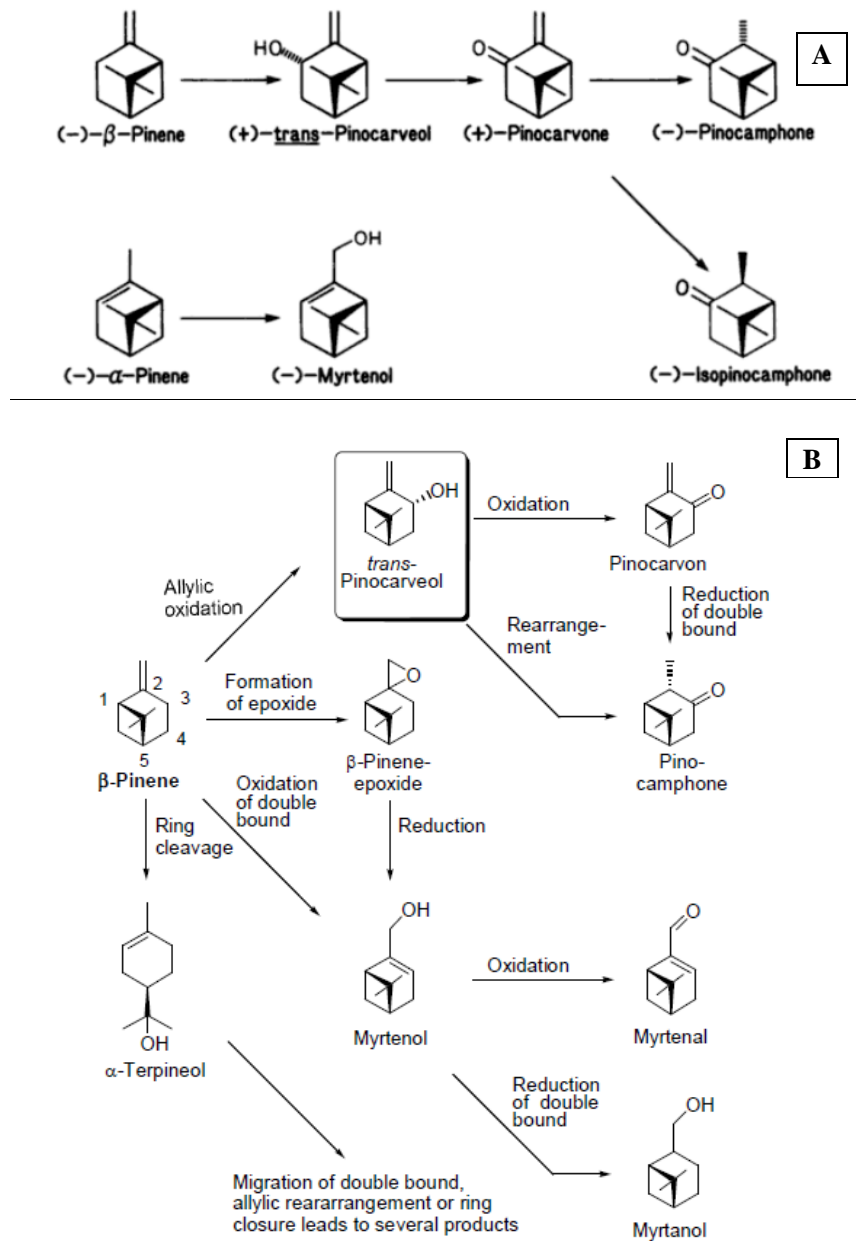


Figura 1 **A.** Proposta de rota de biotransformação em plantas de hissopo (*Hyssopus officinalis*) (KARP; CROTEAU, 1992). **B.** Suspensão celular de *Picea abies* (LINDMARK-HENRIKSSON, 2003).

Objetivou-se o estabelecimento *in vitro* de plântulas de *Aloysia gratissima* e a avaliação dos efeitos de reguladores de crescimento na produção de compostos voláteis *in vitro* usando microextração em fase sólida (SPME) e análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Sementes de *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso foram coletadas em março de 2009 de plantas de um jardim clonal situado no Horto medicinal da UFLA. Exicatas foram depositadas no Herbário ESAL da Universidade Federal de Lavras (UFLA), do Departamento de Biologia sob o número de registro 19.810. O ensaio foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Faculdade de Biologia e Farmácia da Universidade de Pisa (UNIFI), Pisa, Itália.

As sementes foram germinadas em substrato comercial Traysubstrat<sup>®</sup> em casa de vegetação com uma temperatura variando de 12 a 23°C com rega manual. Após dois meses, as plântulas foram transferidas para vaso de 300 mL com substrato comercial Mezzo Medium<sup>®</sup> sendo que no quinto mês após a semeadura, as plântulas foram transferidas para vaso de 500 mL e fertilizadas mensalmente com NPK (1 g L<sup>-1</sup>).

### 2.2 Meio de cultura e fonte de explante

Dois meios de cultura foram testados para o estabelecimento de *A. gratissima*: o MS1/4 de força (Murashige & Skoog, 1962) e o Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd & McCown, 1981), em duas concentrações de sacarose

5 e 30 g L<sup>-1</sup>, acrescido de ágar (6,5 g L<sup>-1</sup>) e pH ajustado para 5,7. Após o preparo, 125 mL de meio de cultura foram distribuídos em frascos plásticos com capacidade de 500 mL, com tampa que permite trocas gasosas, identificados e autoclavados a 121°C por 20 minutos.

Neste estudo, foram testados três tipos de explantes: plântulas de sementes germinadas (de 15 a 20 dias de idade); segmentos nodais e apicais oriundos de brotos axilares de plantas adultas (com sete meses). Após a coleta, a assepsia dos explantes foi realizada por imersão em solução a 1% de hipoclorito de sódio + tween 20 (com pH ajustado para 9) durante 15 min sob agitação. Em capela de fluxo laminar, os explantes foram lavados três vezes (durante 5 min cada lavagem) com água destilada e autoclavada sob agitação manual. Em seguida, os explantes foram cortadas em  $1 \pm 0,5$  cm de comprimento e inoculadas em frascos com meio de cultura.

Após a inoculação, os frascos foram colocados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 23°C, com intensidade luminosa de  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtida com lâmpada branca fluorescente PHILIPS TLD 30W/33 (Eindhoven, Netherland) onde permaneceram por 35 dias.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com esquema fatorial de 2 x 2 x 3 (meio: concentração de sacarose: tipo de explante) com 8 explantes por frascos e 2 frascos como repetição. Para a análise de crescimento, foram avaliados a biomassa seca, altura da parte aérea e comprimento da maior raiz. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% para isto, utilizou-se o software estatístico Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2008).

### 2.3 Reguladores de crescimento

Segmentos nodais oriundos de plantas adultas, com sete meses de idade em casa de vegetação, com tamanho entre 1 e 2 cm foram inoculados em meio WPM acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. Os sete tratamentos constituíram-se de: 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB; 0,1 e 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP; 0,11; 0,33 e 0,55 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, além do controle em meio sem regulador de crescimento. Após adicionados os reguladores de crescimento, o pH do meio foi ajustado para 5,7 e autoclavados a 121°C por 20 minutos.

Para a realização da assepsia dos segmentos nodais, estes foram imersos em solução a 1% de hipoclorito de sódio + tween 20 (pH 9) durante 15 min sob agitação. Em capela de fluxo laminar, os explantes foram lavados três vezes (durante 5 min cada lavagem) com água destilada e autoclavada e mantidos sob agitação manual. Em seguida, os explantes foram cortados em 1 ± 2 cm de comprimento e inoculados em frascos com capacidade de 500 mL contendo 125 mL de meio de cultura, com tampas que permitem trocas gasosas. Após a inoculação, os frascos foram mantidos por 35 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 23°C e com intensidade luminosa de 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtida com lâmpada branca fluorescente PHILIPS TLD 30W/33 (Eindhoven, Netherland).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com sete tratamentos e 8 explantes por frasco e dois frascos como repetição. Para a análise de crescimento foi observado número de par de folhas, altura e biomassa fresca do ramo principal, número de brotações e comprimento da maior raiz. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5%, para isto, utilizou-se o software estatístico Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2008).



## **2.4 Microextração em fase sólida acoplada à cromatografia gasosa (SPME-CG)**

Na extração, empregou-se o método de SPME (Supelco Inc, Bellefont, PA, EUA) com fibra de polidimetilsiloxano de 100 µm para partição dos compostos voláteis presentes na amostra e nas soluções dos padrões. A fibra foi exposta ao *headspace* do frasco de 25 mL, sob agitação forte por 2 min, com estabilização durante 60 min, contendo 0,5 g de plantas inteiras. Após 5 minutos de exposição à fibra, à temperatura ambiente, a seringa foi imediatamente levada ao injetor do cromatógrafo, no qual os compostos voláteis foram dessorvidos a 250°C, por 5 minutos.

A identificação e quantificação dos constituintes voláteis foram feitas no cromatógrafo a gás Varian CP-3800 com detector por ionização em chama, injetor split/splitless e equipado com coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm; espessura do revestimento 0,25 µm). A temperatura de operação do injetor foi de 250°C (BERTOLI et al., 2004).

Para eliminar possíveis resíduos que poderiam interferir nos resultados, foram realizadas análises em branco, em que as fibras foram mantidas por 60 min no injetor aquecido do CG/MS e após esse tempo, o espectro foi verificado para garantir a eliminação de resíduos.

### **2.4.1 Análises químicas**

Análises da composição química de óleo essencial foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica da Università di Pisa – UNIPI, Pisa, Italia. Realizadas em um cromatógrafo a gás HP-5890 Série II (Hewlett-Packard) com detector de ionização por chama, equipado com duas colunas capilares, uma HP-Wax e HP-5 (ambos 30 m X 0,25 mm X 0,25 µm), trabalhando com

aquecimento com temperatura programada: 60°C durante 10 min, elevando-se a 5°C min<sup>-1</sup> até 220°C. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250°C; gás de arraste, nitrogênio (fluxo de 2 mL/min); detector, dual FID; com uma razão de *split* de 1:30. O volume da amostra injetado foi de 0,5 µL de óleo com 1 mL de Hexano. As amostras dos óleos foram compostas, misturando as 4 repetições, sendo a injeção em triplicata.

Os óleos também foram analisados por espectrometria de massas, CG-EM, em um cromatógrafo a gás Varian CP3800 equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm) e acoplado a detector seletivo de massas, Varian Saturno 2000 detector *ion trap*. Condições analíticas foram como se segue: injetor e detector, 220 e 240°C a 3°C, respectivamente, temperatura programada de 60 - 240°C a 3°C; injeção; gás de arraste, hélio a 1 mL/min, 0,2 µL (solução de hexano 10%); com uma razão de *split* de 1:30 (BERTOLI et al., 2004).

#### 2.4.2 Identificação de compostos

A identificação dos constituintes foi baseada na comparação do tempo de retenção com os de amostras autênticas, comparando os seus índices lineares relativos a uma série de *n*-hidrocarbonetos, complementados por comparação computadorizada da biblioteca do aparelho (NIST 98) e também pela utilização de uma biblioteca “homemade” de espectros de massas construída a partir de substâncias puras e componentes de óleos conhecidos, e os dados da literatura (ADAMS 2007). A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma detector de ionização de chama (FID ou DIC). Além disso, os pesos moleculares de todas as substâncias identificadas foram confirmados por cromatografia de íons, GC-CIMS, utilizando metanol como gás ionizante (BERTOLI et al., 2004).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Meio de cultura e fonte de explante

Conforme os resultados obtidos, para a espécie *Aloysia gratissima*, o cultivo *in vitro* é influenciado pelo tipo de meio, quantidade de sacarose e o tipo de explante. Sendo que para os explantes segmento apical e plântulas oriundas da germinação foram observados 100% de perda por oxidação e necrose, independente do meio ou concentração de sacarose utilizada. A percentagem de contaminação foi de 1%, sendo o método de desinfestação com hipoclorito com pH 9 eficiente.

Neste estudo, três tipos de explantes foram testados, plântulas de sementes germinadas em substrato comercial Traysubstrat<sup>®</sup> e explantes de plantas adultas (sete meses), seus segmentos nodais e apicais com  $1 \pm 0,5$  cm, porém só os resultados com os explantes de segmentos nodais da planta adulta foram efetivos, já que as plântulas oxidaram ou necrosaram com facilidade (100%), perdendo as três repetições efetuadas. Resultados não satisfatórios foram obtidos em meio de cultura MS (total da força), onde as plantas que sobreviviam não passavam da segunda transferência para novo meio de cultivo e não eram vigorosas.

O cultivo *in vitro* de plântulas (de 10 a 20 dias) e plantas jovens (não lignificadas) de 1 a 4 meses, de *A. gratissima* não proporcionam o seu desenvolvimento e com frequência oxidam, matando o explante. Quando se faz o cultivo com plantas lignificadas, o tipo de regulador de crescimento influencia o desenvolvimento da mesma.

Já para o segmento nodal foi observado o crescimento vegetativo para todos os meios e concentrações de sacarose testados. Maior crescimento de plantas foi observado com o cultivo em meio WPM com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, no

qual se observou que a biomassa da matéria seca, a altura da parte aérea e o comprimento da raiz apresentaram maiores valores quando comparados aos demais tratamentos (Tabela 1).

Conforme observamos na Tabela 1, a concentração de sacarose influencia o crescimento dos explantes, que com  $30 \text{ g L}^{-1}$  no meio WPM é superior, seguido pelo tratamento com meio MS e  $30 \text{ g L}^{-1}$ . Para a concentração de  $5 \text{ g L}^{-1}$ , independente do tipo de meio de cultivo, foram inferiores. Esses resultados estão de acordo pelo fato da sacarose ser um importante promotor de crescimento e por ser fonte de carboidratos prontamente disponível (ROCHA et al., 2007).

Estudos com bananeira Prata anã (*Musa* sp), evidenciaram que os meios de multiplicação MS, suplementados com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose nas condições de luz natural (0,17 g) e artificial (0,18 g), foram responsáveis pela obtenção dos maiores valores para a variável massa seca total de plantas (ROCHA et al., 2007).

Para plantas de *Lippia nodiflora* (L.) Miq. (Verbenaceae), a propagação de brotos usando explantes axilares no cultivo *in vitro* em meio MS é de grande sucesso (AHMED et al., 2011). Esses resultados corroboram com os do atual estudo para *A. gratissima* em que foi efetiva sua propagação *in vitro*, apenas com explantes axilares.

Para a *Aloysia polystachya* [Gris.] Mold. (Verbenaceae) o meio de cultivo MS 1/4 de força é o mais indicado para a propagação com explantes de folhas e internodos (BURDYN et al., 2006).

Entretanto, para a espécie unha-de-gato (*Uncaria guianensis*), o melhor meio para germinação dos embriões foi 1/4 de MS independente da presença ou não de sacarose (PEREIRA et al., 2006).

Os estudos supracitados evidenciaram que cada espécie responde de forma particular ao tipo de meio e à concentração de sacarose utilizados, sendo necessário a determinação de protocolo de propagação para cada espécie.

Tabela 1 Crescimento vegetativo de plantas de *A. gratissima* oriundos de segmentos nodais inoculados em dois meios de cultura e em duas concentrações de sacarose, após 35 dias de cultivo. UFLA, Lavras, 2012.

| Meios de cultura | [ ] de sacarose (g) | Biomassa da matéria seca (g)* | Altura da parte aérea (cm) | Comprimento da raiz (cm) |
|------------------|---------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| MS1/4            | 30                  | 0,033±0,03 b                  | 1,15±0,60 b                | 1,02±0,36 b              |
|                  | 5                   | 0,017±0,01 c                  | 1,04±0,44 b                | 0,49±0,40 c              |
| WPM              | 30                  | 0,067±0,04 a                  | 3,05±1,00 a                | 1,79±0,69 a              |
|                  | 5                   | 0,010±0,01 c                  | 0,99±0,39 b                | 0,37±0,08 c              |

Letras na coluna não diferem entre si pelo Teste F ( $p \leq 0.05$ ) Scott-Knott. (media  $\pm$  desvio padrão; n = 10 por tratamento). \* Biomassa de plantas inteiras.

### 3.2 Reguladores de crescimento

As respostas dos efeitos do tipo e da concentração de regulador de crescimento no cultivo *in vitro* de *A. gratissima* estão apresentados na Tabela 2.

A biomassa fresca é um parâmetro para avaliar se houve hiperidratação do explante. Observando visualmente e através da biomassa fresca do explante, nos diferentes meios de cultura, não se notou estado hiperídrico. Observou-se aos 35 dias que os melhores resultados foram obtidos com o regulador de crescimento AIB (0,5 mg L<sup>-1</sup>), BA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) e TDZ (0,55 mg L<sup>-1</sup>).

Em relação ao comprimento dos brotos os reguladores de crescimento do grupo da citocinina normalmente inibem o crescimento. No caso de *A. gratissima*, o suplemento do meio de cultura com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP apresentou

maior comprimento (Tabela 2, Figura 2). Com maior comprimento da brotação proporcionou-se maior número de folhas por explante (Tabela 2).

Observando o número de brotos por explante em plantas de *A. gratissima* notou-se que não houve proliferação de múltiplos brotos. Isto pode indicar que as concentrações utilizadas não foram adequadas ou esta espécie cresce por meio de alongamento dos brotos (Tabela 2).

No meio de cultura WPM sem a adição de reguladores de crescimento, o comprimento de raízes obteve maior valor para o meio WPM (2,69 cm) (Tabela 2).

Estudos com pata-de-vaca (*Bauhinia cheilantha*) cultivadas em WPM, os segmentos nodais apresentaram maior capacidade organogênica do que o segmento cotiledonar, o maior número de brotos (4,3 e 2,1) foi obtido com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente; embora, na presença de TDZ foram observadas as menores brotações (GUTIÉRREZ et al., 2011).

Os resultados do estudo supracitado corroboram com os resultados do presente trabalho, em que os reguladores de crescimento BAP (0,1 mg L<sup>-1</sup>) e TDZ (0,11 mg L<sup>-1</sup> e 0,55 mg L<sup>-1</sup>) também proporcionaram maior número de brotos, como que para o TDZ observou-se menor resultado (Tabela 2).

Em plantas de *Lantana camara* L. após 60 dias sob cultivo *in vitro* em MS com adição de 4,4 mmol L<sup>-1</sup> BA, seguidas de 0,44 mmol L<sup>-1</sup> TDZ, apresentaram maior número de ramos e brotos por planta (AFFONSO et al., 2004).

Estudos com segmentos nodais de *Lippia sidoides* Cham cultivadas em meio MS com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP evidenciaram maior acúmulo de matéria fresca nas folhas, como a sua ausência, maior número de brotos (COSTA et al., 2007).

Segmentos nodais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen acesso BRA em meio MS com 1 µM de TDZ, seguido pelo subcultivo dos brotos para meio

isento de citocininas mostrou ser um método viável para a propagação *in vitro* devido à alta taxa de multiplicação e o bom desenvolvimento das plantas (FLORES et al., 2009).

Tabela 2 Efeito dos reguladores de crescimento na biomassa fresca (BF, g); comprimento de brotação (CB, cm); número de par de folha (NPF); número de brotos (NB) e comprimento da raiz (CR, cm) das brotações do segmento nodal de *A. gratissima*. UFLA, Lavras, 2012.

|                             | BF (g) | CB (cm) | NPF    | NB     | CR (cm) |
|-----------------------------|--------|---------|--------|--------|---------|
| Ausência de reguladores     | 0,04 b | 2,18 c  | 2,60 d | 0,00 b | 2,69 a  |
| 0,5 mg L <sup>-1</sup> AIB  | 0,04 a | 3,64 b  | 3,69 b | 0,63 b | 0,24 b  |
| 0,1 mg L <sup>-1</sup> BAP  | 0,05 a | 4,40 a  | 4,56 a | 1,63 a | 0,34 b  |
| 4,0 mg L <sup>-1</sup> BAP  | 0,04 b | 0,84 e  | 2,31 d | 0,00 b | 0,00 b  |
| 0,11 mg L <sup>-1</sup> TDZ | 0,04 b | 1,46 d  | 3,06 c | 1,38 a | 0,00 b  |
| 0,33 mg L <sup>-1</sup> TDZ | 0,03 c | 1,57 d  | 3,69 b | 0,00 b | 0,00 b  |
| 0,55 mg L <sup>-1</sup> TDZ | 0,06 a | 1,99 c  | 3,06 c | 0,88 a | 0,00 b  |

Letras na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste F ( $p \leq 0.05$ ) Scott-Knott. (media  $\pm$  desvio padrão; n = 18 por tratamento)

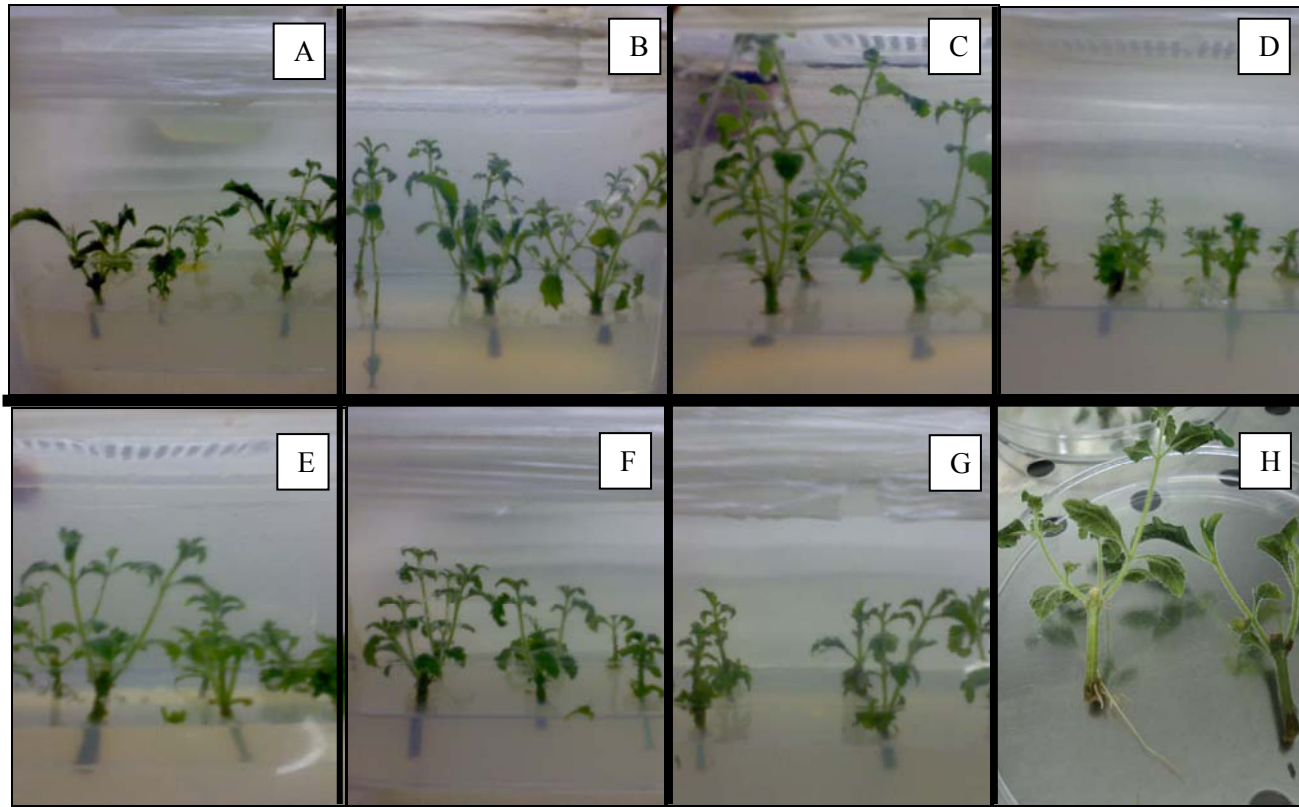


Figura 2 Plantas de *A. gratissima* após 35 dias no cultivo *in vitro* com meio WPM e reguladores de crescimento. **A.** WPM; **B.** 0,5 mg L<sup>-1</sup> AIB; **C.** 0,1 mg L<sup>-1</sup> BAP; **D.** 4 mg L<sup>-1</sup> BAP; **E.** 0,11 mg L<sup>-1</sup> TDZ; **F.** 0,33 mg L<sup>-1</sup> TDZ; **G.** 0,55 mg L<sup>-1</sup> TDZ; **H.** Detalhe da raiz nas plantas em WPM sem regulador de crescimento. UFLA, Lavras, 2012.



### 3.3 Compostos voláteis por SMPE

Os compostos voláteis observados nas folhas da planta matriz e na cultura *in vitro* de plantas de *A. gratissima* evidenciados pela SMPE estão listados quanti-qualitativamente (Tabela 3).

Plantas de *A. gratissima* apresentam grande variação na composição de óleos voláteis, quando comparadas planta matriz e cultivo *in vitro* no meio WPM, na presença e ausência dos reguladores de crescimento (Tabela 3).

Para as plantas de *A. gratissima*, observou-se que o composto com maior percentagem foi o  $\beta$ -pineno (35,6 – 53,4%), tanto na planta matriz como com o uso de reguladores de crescimento, entretanto, o  $\alpha$ -pineno apresentou traços na planta matriz e, no cultivo *in vitro*, variou de 14,3 a 10,1% (Gráfico 1, Tabela 3). Esses monoterpenos são importantes agentes antimicrobianos, intermediários para síntese orgânica, como na indústria química e cosmética, além de agentes anticancerígeno (CROWELL, 1999; DEWICH, 2002, LINDMARK-HENRIKSSON, 2003).

Outro composto em maior quantidade nesse estudo foi o *trans*-pinocanfona, porém com 24,8% na planta matriz e variando de 4,3% (0,33 mg L<sup>-1</sup> de TDZ) a 8,6% (0,1 mg L<sup>-1</sup> de BA) no cultivo *in vitro* (Tabela 3).

Analisando a produção dos compostos *trans*-pinocaveol, *trans*-pinocanfona, *cis*-pinocanfona, acetato de *trans*-verbenol e acetato de *trans*-pinocarvoila, estes corresponderam a 38% dos compostos na planta matriz. No entanto, a média desses compostos no meio de cultura *in vitro* corresponde a 10,76%, representando uma queda de 72% na produção de tais compostos (Tabela 3). Indicando a alteração no metabolismo desses compostos que o cultivo *in vitro* proporcionou.

Em *A. gratissima*, a produção dos compostos  $\alpha$ -pineno e mirtenol é inversamente proporcional, em que na planta matriz temos menor produção de

mirtenol e traços de  $\alpha$ -pineno. Entretanto, com o elicitor TDZ (0,33 mg L<sup>-1</sup>) obteve-se o maior percentual que com os demais tratamentos (Tabela 3). Esses resultados indicaram a possível interconversão do  $\alpha$ -pineno em mirtenol proporcionado pelos reguladores de crescimento, como proposto por Karp & Croteau (1992).

Além disso, a planta matriz de *A. gratissima* produziu os compostos voláteis limoneno (7,7%),  $\alpha$ -tujona (0,2%), linalol (1,5%) e *trans*-verbenol (0,4%), porém não se evidenciaram essas substâncias quando submetidas ao cultivo *in vitro* realizado com o meio WPM e os reguladores de crescimento TDZ, BA e AIB, nas concentrações estudadas. Esses resultados são importantes para a espécie em questão já que  $\alpha$ -tujona é neurotóxica para animais (MILLET et al., 1981), porém o limoneno é um monoterpene importante tanto do ponto de vista metabólico para a planta, como de interesse da indústria química, cosmética, alimentícia, dentre outras (DEWICH, 2002).

Todavia, o limoneno é o precursor da carvona e, por reações sucessivas a partir da pulegona, pode formar mentona, mentol, dentre outros. A interconversão dos componentes de um ou outro é determinada geneticamente e pode ser afetada por fatores agrônômicos (GARLET et al., 2007).

Para a espécie *A. gratissima* quando cultivadas *in vivo* sob tratamento com *Phosphorus* homeopático (centesimal) verificou-se a presença de limoneno (1,0-0,7%) e linalol (4,6-3,7%) (SANTOS et al., 2011), indicando que o cultivo *in vitro* no atual estudo, não proporciona a conversão desses compostos, evidenciando ainda a gama metabólica em produzir certos compostos.

Para a produção dos compostos *trans*-pinocarveol (1,0%), *trans*-pinocanfona (24,8%), *cis*-pinocanfona (4,6%), acetato de *trans*-verbenol (1,7%) e acetato de *trans*-pinocarvoila (5,9%), a planta matriz apresentou maiores valores quando comparada às plantas cultivadas *in vitro* (Tabela 3).

Estudos em suspensão celular de *Picea abies* obtiveram a conversão por reações de oxidação do  $\beta$ -pineno em *trans*-pinocarveol, pinocarvona, mirtenol, mirtenal, como por quebra de anel em  $\alpha$ -terpineol (LINDMARK-HENRIKSSON, 2003). Essas reações deram indícios de que o uso dos reguladores interferiu na composição química das plantas de *A. gratissima*, entretanto, sua produção é sempre maior na planta matriz (Gráfico 1, Tabela 3).

Observou-se que a produção do composto p-cimeno é aumentada mais de seis vezes em plantas de *A. gratissima*, no cultivo *in vitro* com WPM acrescido de BA ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ) quando comparada à planta matriz (Gráfico 1) e para o  $\gamma$ -terpineno não presente na planta matriz, há baixa ou ausência com os elicitores (Tabela 3). Estes dois compostos têm sido relatados na literatura como agente antimicrobiano, principalmente contra *Salmonella enteritidis* (SILVA et al., 2010).

Plantas de *Lantana camara* L. cultivadas em meio MS produziu menos compostos que as plantas doadoras, como, as plântulas cultivadas em MS0, produziu quantidades inferiores de  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, mas produziu mais mirceno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -copaeno, *trans*-cariofileno e  $\beta$ -gurjuneno do que as plantas doadoras (AFFONSO et al., 2007).

Quando o explante foi cultivado *in vitro*, o meio de cultura proporcionou uma maior indução de alguns compostos. As principais mudanças foram observadas com  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno e  $\beta$ -cariofileno. Na planta matriz, a soma desses compostos foi de 46,3% e a soma da média no meio de cultura com reguladores de crescimento foi de 80,79% e sem regulador foi de 81,8% (Tabela 3).

Os compostos voláteis  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, p-cimeno, *trans*-pinocanfona, acetato de *trans*-pinocarvoila,  $\beta$ -cariofileno (=E) são alguns dos compostos com diferenças de produção maiores ou menores com a utilização da

técnica *in vitro* para aumento/diminuição da composição química da espécie *A. gratissima* (Gráfico 1).

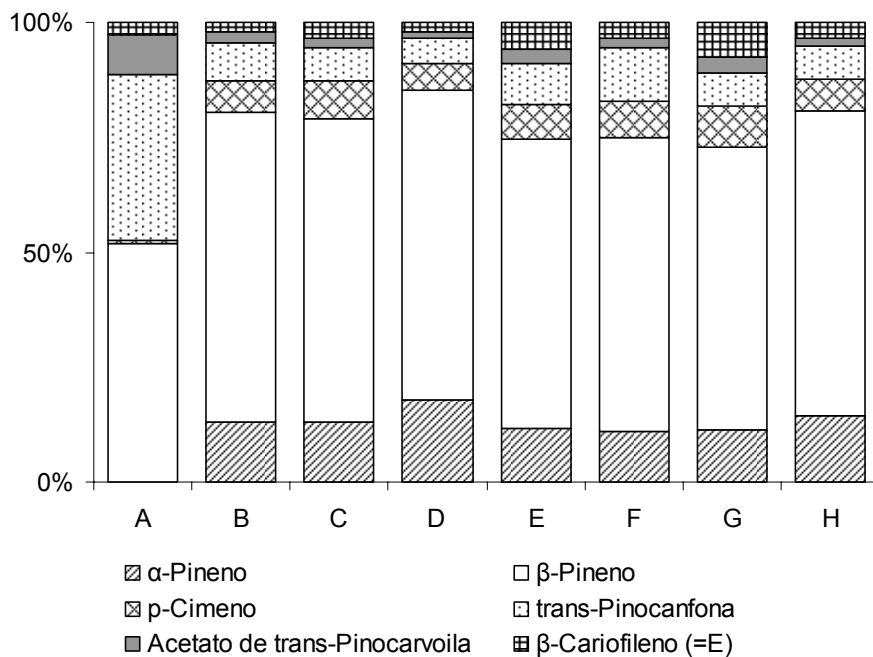


Gráfico 1 Composição (%) de alguns compostos voláteis da parte aérea da planta matriz *Aloysia gratissima* e das plantas *in vitro* cultivadas em diferentes tratamentos após 45 dias. **A.** Planta matriz; **B.** WPM; **C.** 0,11 mg L<sup>-1</sup> TDZ; **D.** 0,33 mg L<sup>-1</sup> TDZ; **E.** 0,55 mg L<sup>-1</sup> TDZ; **F.** 0,1 mg L<sup>-1</sup> BAP; **G.** 4 mg L<sup>-1</sup> BAP; **H.** 0,5 mg L<sup>-1</sup> AIB. UFLA, Lavras, 2012.

Tabela 3 Porcentagem da área relativa da composição química do óleo essencial de *A. gratissima* obtidos pelos diferentes tratamentos *in vitro* e da planta matriz.

| composto                      | LRI <sup>a</sup> | PM   | Cultura <i>in vitro</i> |             |             |             |        |      |            |
|-------------------------------|------------------|------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|--------|------|------------|
|                               |                  |      | WP<br>M                 | TDZ<br>0,11 | TDZ<br>0,33 | TDZ<br>0,55 | BA 0,1 | BA 4 | AIB<br>0,5 |
| <b>Monoterpeno</b>            |                  |      |                         |             |             |             |        |      |            |
| $\alpha$ -tujeno              |                  | -    | 0,8                     | 0,8         | 0,8         | 0,7         | 0,7    | 0,7  | 0,8        |
| $\alpha$ -pineno              | 939              | tr   | 10,1                    | 10,1        | 14,3        | 8,8         | 8,2    | 8,7  | 11,1       |
| Canfeno                       | 953              | -    | 0,4                     | 0,3         | 0,4         | 0,3         | 0,3    | 0,4  | 0,4        |
| Verbeno                       | 968              | 0,3  | 0,5                     | 0,2         | 0,6         | 0,2         | 0,3    | 0,4  | 0,4        |
| Sabineno                      | 976              | 0,8  | -                       | -           | -           | -           | -      | -    | -          |
| $\beta$ -pineno               | 980              | 35,6 | 52,0                    | 50,2        | 53,4        | 47,1        | 47,9   | 46,5 | 51,0       |
| Mirceno                       | 991              | 8,6  | 12,7                    | 12,9        | 12,2        | 11,5        | 12,7   | 11,4 | 12,4       |
| o-cimeno                      | 1022             | -    | 0,3                     | 0,2         | 0,2         | 0,3         | 0,2    | 0,2  | 0,2        |
| p-cimeno                      | 1026             | 0,3  | 5,3                     | 6,3         | 4,6         | 5,9         | 5,9    | 6,9  | 5,4        |
| limoneno                      | 1031             | 7,7  | -                       | -           | -           | -           | -      | -    | -          |
| $\gamma$ -terpineno           | 1062             | -    | 0,1                     | 0,1         |             | 0,1         | 0,1    |      | 0,1        |
| terpinoleno                   | 1088             | -    | 0,4                     | 0,4         | 0,3         | 0,5         | 0,5    | 0,4  | 0,4        |
| $\alpha$ -tujona              | 1102             | 0,2  | -                       | -           | -           | -           | -      | -    | -          |
| <b>Monoterpeno oxigenado</b>  |                  |      |                         |             |             |             |        |      |            |
| 1,8-cineol                    | 1033             | -    | 0,3                     | 0,3         | 0,3         | 0,3         | 0,3    | 0,4  | 0,3        |
| trans-sabineno hidratado      | 1097             | -    | 0,4                     | 0,3         | 0,3         | 0,5         | 0,5    | 0,4  | 0,3        |
| linalol                       | 1098             | 1,5  | -                       | -           | -           | -           | -      | -    | -          |
| trans-pinocarveol             | 1139             | 1,0  | 0,2                     | 0,1         | 0,2         | 0,1         | 0,2    | 0,2  | 0,1        |
| trans-verbenol                | 1144             | 0,4  | -                       | -           | -           | -           | -      | -    | -          |
| trans-pinocanfona             | 1160             | 24,8 | 6,4                     | 5,6         | 4,3         | 6,6         | 8,6    | 5,5  | 5,5        |
| cis-pinocanfona               | 1173             | 4,6  | 2,2                     | 2,2         | 1,3         | 2,1         | 3,4    | 1,9  | 2,1        |
| mirtanol                      | 1193             | 0,9  | 0,1                     | -           | -           | 0,1         | 0,1    | 0,1  | 0,1        |
| Cis-mirtanol                  | 1252             | -    | 0,1                     | -           | -           | 0,2         | 0,1    | 0,1  | -          |
| Acetato de isobornil          | 1285             | 0,7  | 0,3                     | 0,3         | 0,3         | 0,4         | 0,3    | 0,5  | 0,3        |
| Acetato de trans-pinocarvoila | 1297             | 5,9  | 1,8                     | 1,6         | 1,3         | 2,3         | 1,6    | 2,6  | 1,4        |
| Acetato de trans-verbenol     | 1292             | 1,7  | 0,6                     | 0,5         | 0,6         | 0,6         | 0,4    | 0,7  | 0,5        |
| <b>Sesquiterpeno</b>          |                  |      |                         |             |             |             |        |      |            |
| $\alpha$ -copaeno             | 1376             | 0,1  | 0,2                     | 0,3         | 0,2         | 0,4         | 0,3    | 0,3  | 0,3        |
| $\beta$ -elemeno              | 1391             | -    | 0,1                     | 0,2         | 0,1         | 0,3         | 0,2    | 0,2  | 0,2        |

“Tabela 3, continuação”

|                      |      |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\beta$ -cariofileno | 1418 | 1,8   | 1,7   | 2,6   | 1,6   | 4,4   | 2,6   | 5,7   | 2,5   |
| $\gamma$ -elemeno    | 1433 | -     | 0,1   | 0,2   | 0,1   | 0,3   | 0,2   | 0,3   | 0,2   |
| $\alpha$ -humuleno   | 1454 | 0,4   | 0,3   | 0,5   | 0,3   | 0,8   | 0,5   | 1,2   | 0,5   |
| germacreno D         | 1480 | -     | 1,0   | 1,8   | 0,9   | 2,7   | 1,7   | 2,2   | 1,7   |
| biciclogermacreno    | 1494 | -     | 0,2   | 0,2   | 0,5   | 0,2   | 0,2   | 0,2   | 0,4   |
| germacreno B         | 1556 | -     | 0,3   | 0,5   | 0,2   | 0,7   | 0,4   | 0,6   | 0,4   |
| Total de compostos   | 99,9 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |

<sup>a</sup> LRI = índice de retenção linear. PM – planta matriz. \* mg L<sup>-1</sup> \*\* Mais significativos

A classificação química dos compostos voláteis extraídos por SPME nas plantas de *A. gratissima* cultivadas *in vitro* baseadas nos grupos funcionais tem sua maior representação na classe dos monoterpenos, entre 75,3% a 86,7% e a planta matriz com a menor quantidade dessa classe de compostos (54%). Os monoterpenos oxigenados veem em segundo lugar com maior produção na planta matriz (40%), no cultivo *in vitro* variou entre 7,9% a 14,7% (Gráfico 2).

A planta de *A. gratissima* produzindo mais de 90% de monoterpenos totais é ideal para ser incluída na dieta diária, como aromatizante de carnes, nas preparações de infusos e chimarrão, já que é indicativo de prevenção de tumores a alta ingestão de monoterpenos (CROWELL, 1999).

Conforme Crowell (1999), a variedade dietética de monoterpenos demonstrou ser eficaz na quimioprevenção e quimioterapia de tumores. Os monoterpenos possuem características de agente quimiopreventivo ideal, pois, apresenta atividade antitumor eficaz, disponibilidade comercial, baixo custo, biodisponibilidade oral e de baixa toxicidade.

Os sesquiterpenos ocorrem numa produção em torno de 4 a 11% e a planta matriz com uma produção de 3%. Não foi identificado sesquiterpenos oxigenados no cultivo *in vitro* nem na planta matriz (Gráfico 2).

Estudos anteriores com a espécie *Aloysia gratissima* tratadas com homeopatia *Phosphorus* (dinamização 5CH) evidenciaram uma produção de

monoterpenos totais (76,3%) menor que o presente estudo, porém com uma produção de sesquiterpenos totais (38,1%) efetiva, sendo avaliados o óleo essencial por CG-MS (SANTOS et al., 2011).

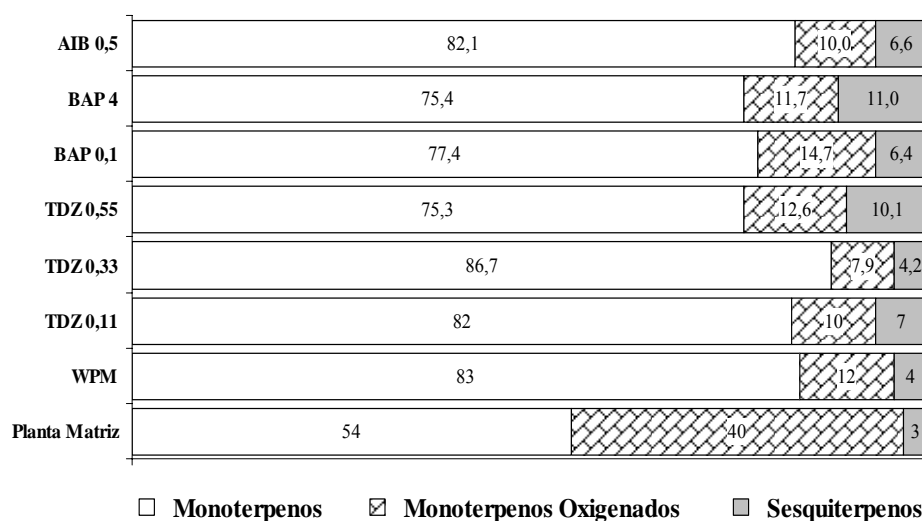


Gráfico 2 Percentagem de compostos em plantas de *A. gratissima* cultivadas *in vitro* com diferentes reguladores de crescimento - hidrocarbonetos monoterpênicos; monoterpênicos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos. UFLA, Lavras, 2012.

#### 4 CONCLUSÕES

Conclui-se que para a micropropagação da espécie *Aloysia gratissima*, segmentos nodais com o meio WPM com 30 g de sacarose produz plantas mais vigorosas e saudáveis. Para o cultivo *in vitro* o BAP e TDZ produzem plantas com maior biomassa fresca e maior número de brotos. Plantas cultivadas *in vitro*, nos diferentes tratamentos, apresentaram aumento na produção de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, p-cimeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e germacreno D e B, quando comparadas com a planta matriz.

**REFERÊNCIAS**

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.
- AFFONSO, V. R. et al. Solid phase microextraction (SPME) analysis of volatile compounds produced by in vitro shoots of *Lantana camara* L. under the influence of auxins and cytokinins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 8, 2007.
- AHMED, A. B. A. et al. Optimized conditions for callus induction, plant regeneration and alkaloids accumulation in stem and shoot tip explants of *Phyllanthus nodiflora*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 9, n. 4, p. 1262-1270, Apr. 2011.
- ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, Jan./Mar. 2000.
- BARS, W.; REINHARD, E.; ZENK, M. H. (Ed.). **Plant tissue culture and its bio-technological application**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. 419 p.
- BERTOLI, A. et al. Volatile constituents of micropropagated plants of *Bupleurum fruticosum* L. **Plant Science**, Shannon, v. 167, p. 807-810, 2004.
- BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, abr. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-41582004000200002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582004000200002&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 17 abr. 2012.



BUFFA FILHO, W. et al. Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus ilicifolia*. **Eclética Química**, Araraquara, v. 27, n. 1, p. 403-416, 2002. Número especial.

BURDYN, L. et al. Direct shoot regeneration from leaf and internode explants of *Aloysia polystachya* [Gris.] Mold. (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 42, p. 235-239, May/June 2006.

COSTA AS et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira** 25, p. 068-072, 2007.

COSTE, C. 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.

CROWELL, P. L. Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes. Symposium on Phytochemicals: Biochemistry and Physiology. **The Journal of Nutrition**, 129, 775S–778S. 1999.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, p. 305-311, 2005.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.

FLORES, R. et al. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.3, p.292-299, 2009.

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L. efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.2, p. 49-55, 2004.

GARLET, T. M. B. et al. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, ago. 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782007000400006&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000400006&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 21 abr. 2012.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the components of culture media**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Exegetics, 1993. 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1999. v. 1, p. 507-515.

GUTIÉRREZ, I. E. M. et al. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 260-265, fev. 2011.

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

KARP, F.; CROTEAU, R. Hydroxylation of (-)- $\beta$ -pinene and (-)- $\alpha$ -pinene by a cytochrome P-450 system from hyssop (*Hyssopus officinalis*). In: PETROSKI, R. J.; MCCORMICK, S. P. (Ed.). **Secondary-metabolite biosynthesis and metabolism**. New York: Plenum, 1992. p. 253-260.

LINDMARK-HENRIKSSON, M. **Biotransformations of turpentine constituents: oxygenation and esterification**. 2003. 67 p. Thesis (Doctoral in Organic Chemistry) - Mid Sweden University, Stockholm, 2003.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

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

MACHADO, M. P. et al. Meios de cultura na micropropagação do porta-enxerto de videira "VR043-43" (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, fev. 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782007000100046&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000100046&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 18 abr. 2012.

MARASCHIN, D. F.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário: otimização da produção de metabólitos secundários em cultura de células vegetais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 24-28, 1999.

MILLET, Y. et al. Toxicity of some essential plant oils: clinical and experimental study. **Clinical Toxicology**, New York, v. 18, n. 12, p. 1485-1498, 1981.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 15, p. 473-497, 1962.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Standard reference database 1**: standard reference data program. Gaithersburg, 1998. 65 p.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

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

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

ROCHA, P. et al. Propagação *in vitro* de bananeira 'Prata anã (AAB)': intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 10-16, 2007.

SANTOS, F. M. et al. Characterization of essential oil and effects on growth of *Verbena gratissima* plants treated with homeopathic *phosphorus*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 10, p. 1499-1504, out. 2011.

SCARPA, G. F. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 91, n. 1, p. 115-135, Jan. 2004.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 30(Supl.1): 136-141, Maio 2010.

SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 1343-1345, Dec. 1986.

SOUZA, A. A.; WIEST, J. M. Atividade antiBacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva santa) usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul - Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 23-29, 2007.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas. Brasília**, n. 24, 2001. 20p. (Circular Técnica).

ZHOU, L. G.; WU, J. Y. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. **Natural Product Reports**, Westerville, v. 23, n. 5, p. 789-810, Sept. 2006.