



**PRISCILA PEREIRA BOTREL**

**MICROPROPAGAÇÃO, TEOR E COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA VOLÁTIL DE *Hyptis marrubioides* Epl.  
E ATIVIDADE INSETICIDA**

**LAVRAS – MG  
2012**

**PRISCILA PEREIRA BOTREL**

**MICROPROPAGAÇÃO, TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA VOLÁTIL  
DE *Hyptis marrubioides* Epl. E ATIVIDADE INSETICIDA**

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 obtenção do título de Doutor.

Orientador

PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Coorientadores

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Dr. Felipe Campos Figueiredo

**LAVRAS - MG  
2012**

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

Botrel, Priscila Pereira.

Micropropagação, teor e composição química volátil de *Hyptis marruboides* Epl. e atividade inseticida / Priscila Pereira Botrel. –  
Lavras : UFLA, 2012.

118 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Bibliografia.

1. Hortelã-do-campo. 2. Crescimento *in vitro*. 3. Subcultivos. 4. Óleos essenciais. 5. Formigas cortadeiras. 6. Inseticida natural. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.898

**PRISCILA PEREIRA BOTREL**

**MICROPROPAGAÇÃO, TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA VOLÁTIL  
DE *Hyptis marrubioides* Epl. E ATIVIDADE INSETICIDA**

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

APROVADA em 29 de fevereiro de 2012

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA
Dra. Juliana de Fátima Sales	IF Goiano
Dr. Geraldo Andrade Carvalho	UFLA
Dr. Cleiton Antônio Nunes	UFLA

PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2012**

*A Deus, que sempre iluminou meus caminhos e minha vida agradeço pela  
realização deste trabalho.*

*Aos meus pais, Sirlei Mendes Botrel e Maria Aparecida Pereira Botrel pelo  
amor incondicional e pela forte presença em todos os momentos de  
minha vida.*

*Ao meu marido Felipe, pelo amor, incentivo e exemplo como profissional.*

*A minha irmã Patrícia, pelo carinho e amizade de sempre.*

*Aos meus afilhados Riquelme e Heitor.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e por me proporcionar a oportunidade de aprender e ensinar.

Aos meus pais Sirlei Mendes Botrel e Maria Aparecia Pereira Botrel pelo amor e força em todos os momentos, a eles serei eternamente grata.

A minha irmã Patrícia Pereira Botrel, pelo amor e exemplo profissional. Apesar da distância, sinto que está sempre perto de mim, torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu marido Felipe Campos Figueiredo, pelo amor, incentivo e ajuda nos experimentos, tenho certeza que sem ele tudo seria mais difícil.

Em deferência à Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Agricultura (DAG), assim como CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao Prof. José Eduardo Brasil, meu orientador, pela amizade, orientação, compreensão e exemplo profissional. Sou imensamente grata pelos ensinamentos e pela oportunidade de ter trabalhado em sua equipe de trabalho.

A minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Suzan Kelly Vilela Bertolucci pelos ensinamentos, amizade, realização das análises de composição química dos óleos essenciais e disponibilidade para ajudar a realizar este trabalho.

Ao Prof. Geraldo Andrade Carvalho, do Departamento de Entomologia da UFLA, pela amizade, incentivo e orientação dos trabalhos realizados no Laboratório de Estudos de Seletividade.

Ao Prof. Cleiton Antônio Nunes, do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, pela contribuição neste trabalho através da realização das análises de agrupamento dos componentes químicos.

Ao Prof. Pedro Henrique Ferri da UFG, Departamento de Química, pela contribuição nas análises de composição química dos óleos essenciais.

Aos profissionais: técnicos e funcionários, Evaldo, Luizinho, Dico e Paulinho, por terem sido muito importantes para a realização deste trabalho, agradeço pela ajuda e amizade.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Cultura de tecidos e Plantas Mediciniais da UFLA, em especial à Mariane, pela ajuda na condução dos experimentos e amizade. Aos colegas do Laboratório de Estudos de Seletividade da Entomologia: Olinto e Rodrigo.

A minha sogra Graça e meu sogro Pereira, muito obrigado pelo carinho e amizade.

Aos meus cunhados, Aline e Marcelino, pela amizade e força.

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

Muito Obrigada!

## RESUMO GERAL

Na primeira parte do projeto o objetivo foi avaliar fatores que influenciam o crescimento *in vitro* de *Hyptis marruboides* através da cultura nodal, onde foram conduzidos quatro experimentos. No primeiro, foram avaliados quatro volumes de meio de cultura (10, 20, 30 e 40 mL); no segundo a orientação do explante (vertical e horizontal); no terceiro, quatro posições do segmento nodal no explante (1º, 2º, 3º e 4º segmentos nodais) e posição apical. No quarto experimento, avaliou-se a taxa de multiplicação *in vitro* em função da origem do explante. Após 40 a 45 dias foram avaliados o comprimento da brotação (CB), comprimento da raiz (CR), biomassa seca da parte aérea (BSPA) e da raiz (BSR), número de brotações (NB) e de nós (NN). O crescimento *in vitro* de *H. marruboides* foi superior utilizando-se 40 mL de meio de cultura e segmentos nodais inoculados em posição horizontal com 2 pares de gemas. Posições mais próximas ao ápice do explante apresentaram comprimento superior do maior broto, maiores acúmulos de biomassa seca da parte aérea e da raiz e comprimento da raiz. A maior taxa de multiplicação (4,06) foi obtida no terceiro subcultivo com a utilização de gemas apicais como fonte de explantes. Nesta primeira parte do projeto, plantas de *H. marruboides* cultivadas *in vivo* e *in vitro* foram analisadas para determinação dos compostos do óleo essencial através de HS – GC/MS. A cultura nodal mostrou-se um método eficiente para propagação clonal de *H. marruboides*, pois não interferiu na composição química da fração volátil. Na segunda parte do projeto foi estudado o teor e a composição química do óleo volátil em folhas e inflorescências frescas de *H. marruboides* coletadas em diferentes localidades do Sul de Minas Gerais. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e analisado por CG-EM. Foram realizadas análises de componentes principais (PCA) e de agrupamento hierárquico (HCA). O local de coleta influenciou no teor de óleo essencial de folhas e inflorescências de hortelã-do-campo. O maior teor de óleo essencial foi mensurado nas folhas de *H. marruboides* provenientes do município de Luminárias (0,14%). Os principais constituintes químicos identificados nos acessos foram a  $\alpha$ -tujona (6,72-19,3%), a  $\beta$ -tujona (8,40-24,20%), a *cis*-pinocanfona (2,68-5,71%),  $\alpha$ -copaeno (4,43-9,25%),  $\beta$ -cariofileno (7,24-11,49%) e o  $\gamma$ -muuroleno (6,73-12,02%). De acordo com as análises de PCA e HCA foi possível concluir que há um grande polimorfismo químico entre as amostras dos óleos essenciais. Na terceira parte do projeto foi conduzido um bioensaio com o objetivo de realizar a caracterização química e avaliar a atividade inseticida do óleo essencial de *H. marruboides* e de uma mistura isomérica comercial de  $\alpha$ + $\beta$ -tujona sobre *Atta sexdens rubropilosa*. Os constituintes majoritários presentes no óleo essencial foram:  $\beta$ -tujona (40,8%),  $\alpha$ -tujona (16,1%) e sabineno (15,9%), seguidos pelos constituintes 10S,11S-himachala-3(12),4-dieno (4,4%), *cis*-pinocanfona (4,0%) e  $\beta$ -cariofileno (3,9%).

A aplicação tópica do óleo essencial das inflorescências de *H. marruboides* na dose de 28,5% de  $\alpha + \beta$ -tujona indicou efetiva toxicidade em formigas cortadeiras. Essa dose de  $\alpha + \beta$ -tujona do óleo apresentou uma  $TL_{50}$  estimada de 3,06 dias.

Palavras-chave: Planta Medicinal. Crescimento *in vitro*. População de plantas.  
Formigas cortadeiras.

## GENERAL ABSTRACT

The objective of the project (first part) was to evaluate factors influencing in vitro growth of *Hyptis marrubioides* through nodal culture, where four experiments were conducted. At first, were analyzed four culture medium volumes (10, 20, 30 and 40 mL); in the second the explant orientation (vertical and horizontal); in the third, four nodal segment positions in the explant (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> nodal segments) and apical position. In the fourth experiment was evaluated the in vitro multiplication rate according to the explant origin. After 40 to 45 days were evaluated the sprout length (SL), root length (RL), dry matter shoot (DMS) and root (DMR), shoots number (SN) and nodes (NN). The growth in vitro of *H. marrubioides* was higher using 40 mL of culture medium and nodal segments inoculated in a horizontal position with 2 pairs of gems. Positions near to the explant apex presented highest length of the greater shoot, higher accumulation of dry matter from shoot and root and root length. The highest multiplication rate (4.06) was obtained in the third subculture with the use of apex gems as explant source. In this first part of the project, plants of *H. marrubioides* grown in vivo and in vitro were analyzed for the essential compounds determination of the essential oil through HS - GC/MS. The nodal culture shown an efficient method for clonal propagation of *H. marrubioides*, therefore did not affect the chemical composition of the volatile fraction. In the second part of the project was study the content and chemical composition of volatile oil in fresh leaves and inflorescences of *H. marrubioides* collected in different places in southern of Minas Gerais. The essential oil was extracted by hydrodistillation and analyzed by GC-ME. There were carried out principal components analyses (PCA) and hierarchical clustering (HCA). The collection site influenced the essential oil content of leaves and inflorescences of mint leaves. The highest essential oil content was measured in the leaves of *H. marrubioides* from the municipality of Luminárias (0.14%). The main chemical constituents identified in access were  $\alpha$ -thujone (6.72- 19.3%), the  $\beta$ -thujone (8.40-24.20%), cis-pinocamphone (2.68-5.71%),  $\alpha$ -copaene (4.43-9.25%),  $\beta$ -caryophyllene (7.24-11.49%) and the  $\gamma$ -muurolene (6.73-12.02%). According to the PCA and HCA analysis was possible conclude that there is a large chemical polymorphism among the essential oils samples. In the third part of the project was conducted a bioassay with the objective to perform the chemical characterization and evaluate essential oil insecticidal activity of *H. marrubioides* and an isomeric mixture commercial of  $\alpha$  +  $\beta$ -thujone on *Atta sexdens rubropilosa*. The major constituents present in the essential oil were  $\beta$ -thujone (40.8%),  $\alpha$ -thujone (16.1%) and sabinene (15.9%), followed by the constituent 10S, 11S-himachala-3(12), 4-diene (4.4%), cis-pinocamphone (4.0%) and  $\beta$ -caryophyllene (3.9%). Topical application of essential oil from *H. marrubioides* inflorescences at a dose 28.5% of  $\alpha$  +  $\beta$ -thujone showed effective

toxicity in cutter ants. This dose  $\alpha + \beta$ -thujone of the oil had a TL<sub>50</sub> estimated of 3.06 days.

Keywords: Medicinal Plant. *In vitro* growth. Plant population. Cutter ants.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 Introdução geral</b> .....	14
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Descrição botânica do gênero <i>Hyptis</i></b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Micropropagação em plantas medicinais</b> .....	18
<b>2.2.1</b>	<b>Fatores que influenciam o crescimento <i>in vitro</i> de explantes</b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Óleos essenciais e variabilidade genética</b> .....	21
<b>2.4</b>	<b>Importância do estudo de populações de plantas medicinais nativas: acessos</b> .....	23
<b>2.5</b>	<b>Atividade inseticida de óleos essenciais sobre formigas</b> .....	25
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
	<b>CAPÍTULO 2 Cultura nodal e análises de constituintes voláteis por HS-CG/EM em plântulas de hortelã-do-campo (<i>Hyptis marrubiioides</i> EPL.)</b> .....	34
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
<b>2.1</b>	<b>Fase de estabelecimento</b> .....	39
<b>2.3</b>	<b>Análise estatística</b> .....	43
<b>2.4</b>	<b>Análise da fração volátil por HS-CG/EM</b> .....	43
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>3.1</b>	<b>Fase de estabelecimento</b> .....	45
<b>3.2</b>	<b>Análise da fração volátil por HS-CG/EM</b> .....	58
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63

	<b>CAPÍTULO 3 Variabilidade química do óleo essencial de folhas e inflorescências de três acessos de <i>Hyptis marruboides</i> EPL. coletados no sul de Minas Gerais</b> .....	67
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	70
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	73
<b>2.1</b>	<b>Coleta das amostras</b> .....	73
<b>2.2</b>	<b>Análises do solo</b> .....	73
<b>2.3</b>	<b>Extração e análises do óleo essencial</b> .....	74
<b>2.4</b>	<b>Análises estatísticas e multivariada</b> .....	76
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	78
<b>3.1</b>	<b>Análises do solo</b> .....	78
<b>3.2</b>	<b>Análises do óleo essencial</b> .....	78
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	90
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	91
	<b>CAPÍTULO 4 Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de <i>Hyptis marruboides</i> EPL. E DA SUBSTÂNCIA <math>\alpha + \beta</math> tujona sobre <i>Atta sexdens rubropilosa</i> FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)</b> .....	94
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	97
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	99
<b>2.1</b>	<b>Extração do óleo essencial</b> .....	99
<b>2.2</b>	<b>Substâncias de referência</b> .....	99
<b>2.3</b>	<b>Análises cromatográficas</b> .....	100
<b>2.4</b>	<b>Atividade formicida</b> .....	101
<b>2.5</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	102
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	103
<b>3.1</b>	<b>Caracterização química do óleo essencial</b> .....	103
<b>3.2</b>	<b>Atividade formicida</b> .....	106

<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>112</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>117</b>

**CAPÍTULO 1 Introdução geral**

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as famílias vegetais conhecidas e utilizadas popularmente com elevado potencial químico, rica em espécies aromáticas de grande importância econômica (SIMÕES; SPITZER, 2000), encontra-se a família *Lamiaceae* com aproximadamente 264 gêneros descritos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURA - USDA, 2007). *Hyptis marrubioides* Epl. é uma espécie pertencente a esta família, endêmica da região do Cerrado Brasileiro, conhecida popularmente como hortelã-do-campo.

Estudos têm mostrado atividades biológicas importantes no gênero *Hyptis*, tais como atividades antifúngica (OLIVEIRA et al., 2004), antibacteriana (SOUZA et al., 2003) e inseticida (ARAÚJO et al., 2003) dentre outras.

Aos óleos essenciais secretados nesse gênero têm sido atribuídas ações farmacológicas, como anestésico, antiespasmódico e anti-inflamatório (DI STASI et al., 1996).

A propagação de *H. marrubioides* pode ser feita por sementes, que em geral apresenta boa germinação. No entanto, plantas advindas de sementes apresentam grande variabilidade quanto à morfologia e ao teor de metabólitos (PEREIRA et al., 2006).

A micropropagação de plantas medicinais tem se difundido devido à possibilidade de produzir um grande número de plantas homogêneas e com elevada qualidade sanitária, à possibilidade de conservar o germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade, além de auxiliar no melhoramento genético. Dentre as variáveis mais efetivas para o êxito da regeneração *in vitro* estão: a idade, o tipo de explante, o genótipo e o tempo de transferência para outro meio, dentre outros (SABÁ, 2000).

Tendo em vista a necessidade de plantas para estudos químicos e biológicos, torna-se fundamental a utilização de técnicas como a micropropagação, visando à produção de mudas homogêneas e de qualidade de *H. marrubioides*. Além disso, estudar a variabilidade química é fundamental quando se deseja desenvolver estudos de efeitos biológicos, objetivando um padrão químico para essa espécie aliado à seleção de plantas com altos teores de óleo essencial.

Os óleos essenciais são ricos em terpenoides, que podem ser fortemente repelentes às formigas da tribo Attini, conforme demonstrado por Marsaro Júnior et al. (2004). Botrel (2009) verificou que o óleo essencial da espécie *H. marrubioides* apresentou um efeito tóxico sobre a formiga cortadeira (*Atta sexdens rubropilosa* FOREL), mas não inferiu hipóteses relacionadas à ação biológica dessa espécie no controle de insetos e, sugeriu que estudos relacionados ao isolamento de compostos deveriam ser realizados a fim de descobrir a substância ativa responsável pela toxicidade.

Nesse sentido, objetivou-se: 1) avaliar fatores que podem influenciar o crescimento *in vitro* de *H. marrubioides* através da cultura nodal e avaliar a produção de constituintes voláteis em plântulas; 2) avaliar o teor e a composição química de óleo volátil em folhas e inflorescências de *H. marrubioides* coletadas em diferentes localidades do Sul de Minas Gerais; 3) avaliar o efeito do óleo essencial de *H. marrubioides* e de uma mistura isomérica comercial de  $\alpha$ + $\beta$ -tujona sobre a mortalidade de formigas cortadeiras.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Descrição botânica do gênero *Hyptis*

O gênero *Hyptis* apresenta uma grande diversidade morfológica, principalmente na região do Cerrado Brasileiro, com cerca de 300 a 400 espécies (HARLEY, 1988).

Esse gênero se caracteriza por apresentar plantas com inflorescências compostas, com flores dispostas em cima formando panículas congestas, espigas, verticilos ou capítulos, ou dispostas em panículas amplas; as flores geralmente têm cálice 10-nervado com cinco dentes iguais ou desiguais, raramente obsoletos, geralmente acrescentado no fruto, e algumas vezes fortemente curvado ou inflado; corola bilabiada, 4-lobada, lobo superior emarginado, os dois lobos laterais expandidos e o lobo inferior formando um lábio cimbiforme, articulado na base, inicialmente ereto-patente, incluindo as anteras dos quatro estames declinados sob tensão para produzir um mecanismo explosivo de polinização; estigma 2-lobado, estilete ginobásico ou com estilopódio; os frutos são 4 núculas obovoide, algumas vezes achatadas, mucilaginosas ou não; são ervas, arbustos ou raramente árvores, geralmente com caules quadrangulares; folhas opostas, frequentemente portando glândulas com substâncias aromáticas (HARLEY, 1988).

As plantas do gênero *Hyptis* apresentam um aroma característico e são usadas no tratamento de infecções gastrointestinais, câimbras, dores e no tratamento de infecções de pele (CORRÊA, 1931).

*H. marruboides* (Figura 1) é também conhecida como hortelã-do-campo e pertence à família Lamiaceae. Lamiaceae compreende uma família pertencente à Ordem Tubiflorae (Lamiales), abrangendo cerca de 200 gêneros e, aproximadamente 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo.



Figura 1 Aspecto da planta adulta de *Hyptis marrubioides* (A) e detalhe de inflorescências branca (B) e roxa (C)

## 2.2 Micropropagação em plantas medicinais

O emprego de técnicas biotecnológicas se constitui em ferramenta bastante útil para a reprodução de exemplares com propriedades desejáveis (FRANÇA et al., 2001), em que vários problemas em biotecnologia de plantas podem ser resolvidos pela técnica da cultura de tecidos.

Dentre os principais benefícios da micropropagação de plantas podem ser citadas: possibilidade de aumento rápido no número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas, produção de mudas durante todo o ano, mesmo em regiões nas quais a planta não apresenta condições para a propagação sexuada e produção de plantas com elevada qualidade fitossanitária (ECHEVERRIGARAY et al., 2001).

O cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui assim uma alternativa para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal.

Técnicas como micropropagação, culturas de calos, raízes e suspensão celular de plantas medicinais, aromáticas e inseticidas podem ser aplicadas, visando não só a propagação em larga escala de genótipos superiores como a produção de metabólitos secundários (CONCEIÇÃO, 2000). Além disso, podem ser consideradas como ferramentas promissoras para a preservação de recursos genéticos vegetais, bem como para a propagação comercial de plantas medicinais (ABREU, 1998).

González, Andrade e Bertolo (2002) ressaltam a importância do tipo de explante utilizado na micropropagação e sua subsequente manipulação. Dessa forma, a micropropagação pode ser conduzida por multiplicação por meio de proliferação de gemas axilares, multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta e multiplicação via embriogênese somática.

### **2.2.1 Fatores que influenciam o crescimento *in vitro* de explantes**

Na micropropagação de uma espécie, o primeiro passo é o estabelecimento *in vitro* de plantas, o que se inicia com a seleção dos explantes mais adequados. Estudos referentes à propagação clonal *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (ginseng brasileiro) foram conduzidos por Martins e Nicoloso (2004), os quais demonstraram uma elevada contaminação (60%) na fase inicial de cultivo, um bom desenvolvimento de segmentos nodais em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e uma baixa sobrevivência (10%) na fase de aclimatização.

Existem vários fatores que influenciam o crescimento *in vitro* de plantas. Dentre esses fatores podemos citar volumes de meio de cultura, orientação do explante, posição do segmento nodal na plântula e origem do explante.

A quantidade de meio e o tipo de recipientes utilizados são variáveis muito importantes que necessitam de mais atenção. Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que essas variáveis afetam diretamente a área superficial da interface meio-atmosfera, o volume de ar sobre o meio e a profundidade do meio. Carvalho et al. (1995) estudando a influência de fatores físicos no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Poir.), verificaram que 10 mL de meio de cultura por frasco com quatro explantes, proporcionou maior formação de gemas em relação aos volumes de 20 e 30 ml.

Outro fator que influencia sobremaneira o crescimento *in vitro* de explantes é a posição de inoculação. Pereira et al. (2006) ao estudarem segmentos nodais de unha de gato (*Uncaria guianensis*) em duas posições de inoculação (horizontal e vertical), presença e ausência de GA<sub>3</sub>, com 1, 2, e 3 gemas, verificaram que o maior acúmulo de fitomassa seca de brotações, foi obtido com explantes inoculados na horizontal sem GA<sub>3</sub> independente do número de gemas com peso entre 30 e 40 mg.

De acordo com Pierik (1990) é comum os efeitos da posição dos explantes sobre a multiplicação *in vitro*. O uso de segmentos de origem basal e apical pode causar uma fonte de variação na resposta final e, dessa forma, provocar erros na estimativa da multiplicação.

Verificando a regeneração *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims), Crespo et al. (2003) estudaram três tipos de explantes (basal, mediano e apical) e observaram que o explante apical produziu maior número de brotos, nós, raízes e folhas e maior comprimento dos brotos.

Amaral (2007) estudando o efeito de concentrações de ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (benzilaminopurina) e da posição dos explantes na indução de organogênese *in vitro* em segmentos caulinares internodais de alfavaca (*Ocimum selloi*), verificou que o primeiro, segundo e terceiro

segmentos caulinares internodais apresentaram, em meio de cultivo complementado com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, frequência de organogênese de 93,33%, 73,33% e 73,33%.

A determinação da taxa de multiplicação *in vitro* pode depender do tipo de explante e da espécie em estudo. De acordo com Santos et al. (2006), uma maior taxa de multiplicação *in vitro* implica na maior velocidade do processo de micropropagação e na redução da necessidade de constante estabelecimento de novas culturas. Borges et al. (2011) avaliando a taxa de multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* (eucalipto medicinal) observaram que a taxa variou entre subcultivos, apresentando tendência de aumento inicial e posterior queda da maioria dos clones e introduções *in vitro*.

### **2.3 Óleos essenciais e variabilidade genética**

Os óleos essenciais são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário em pequenas quantidades em relação às substâncias produzidas pelo metabolismo primário, sendo responsáveis por funções nem sempre bem definidas. Difundem-se com facilidade a partir da evaporação, constituindo verdadeiro elo entre a fonte produtora e o meio ambiente. Apesar de terem sido considerados por muito tempo mero desvio de funções vitais da planta, os óleos essenciais são fundamentais para a inter-relação dos organismos, promovendo, assim, o equilíbrio entre os reinos vegetal e animal (CRAVEIRO, 1981). Também denominados óleos etéreos ou essências, são misturas complexas e apresentam as características de volatilidade e baixa massa molecular, normalmente sendo líquidos de aparência oleosa, odoríferos, solúveis em solventes orgânicos e com solubilidade limitada em água (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Os óleos essenciais são compostos frequentemente sintetizados e armazenados em estruturas anatômicas chamadas de tricomas glandulares que se projetam da epiderme e agem como advertência sobre a toxicidade do vegetal, repelindo potenciais herbívoros mesmo antes que ataquem (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Como estratégia de proteção, as espécies do gênero *Hyptis* apresentam adaptações como pelos glandulíferos viscosos e pelos tectores, distribuídos nos ramos das inflorescências, para impedir a ação das formigas (BARROSO, 1991; MOTA, 1998), que com muita frequência visitam essas plantas quando floridas.

Monoterpenos ( $C_{10}$ ) e sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) voláteis de forma cíclica e acíclica são os componentes predominantes nos óleos essenciais. As essências possuem, geralmente, odor característico e auxiliam nas interações entre plantas, plantas/insetos e outros organismos, estando esses componentes presentes em quantidades variadas em diversos órgãos vegetais.

Estudos com populações silvestres de plantas aromáticas e medicinais, relacionados ao teor e a composição química e a área de ocorrência têm demonstrado a existência de variação genética entre plantas de diferentes populações (VIEIRA; SIMON, 2000).

Os principais constituintes químicos encontrados por Sales et al. (2007) em *H. marruboides*, ao estudar a variabilidade química presente no óleo essencial desta espécie em duas localidades do Sul de Minas Gerais foram cariofila-4(14),8(15)-dien-5 $\beta$ -ol, eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol, óxido de cariofileno e  $\beta$ -cariofileno.

Diferenças encontradas na variabilidade do teor e da composição química de constituintes majoritários de *Hyptis suaveolens* (erva-canudo) foram atribuídas à origem geográfica das plantas (GRASSI et al., 2005; SIDIBE et al., 2001). Porém, populações naturais de plantas que ocorrem ao longo de um gradiente ambiental variam quanto à constituição genética e atividade fisiológica

e embora pertencendo à mesma espécie, podem responder de modo muito diferente às condições ambientais vigentes (MARTINS et al., 2006).

De acordo com Blank et al. (2006) pesquisas com plantas medicinais ainda estão voltadas, preferencialmente, para o conhecimento de espécies que produzem fitofármacos desejados, ignorando-se os processos genéticos, ambientais e fitotécnicos que influenciam a produção desses compostos químicos.

A variabilidade genética das plantas é expressa através dos chamados quimiotipos (APEL, 2001). Alguns autores utilizam o termo quimiotipo para plantas de mesmo gênero e espécie, com a mesma aparência externa, mas que diferem, às vezes consideravelmente, em sua composição química. Esses quimiotipos usualmente ocorrem naturalmente em plantas silvestres, e podem resultar de polinização cruzada (PRICE; PRICE, 1999; SIMÕES; SPITZER, 2000).

#### **2.4 Importância do estudo de populações de plantas medicinais nativas: acessos**

O gênero *Hyptis* possui cerca de 400 espécies, com ampla distribuição no continente americano (HARLEY, 1988). Esse gênero exibe a maior diversidade morfológica na região do Cerrado Brasileiro. O Cerrado Brasileiro é considerado um 'hotspot' mundial com uma região que concentra alto nível de biodiversidade. 'Hotspot' é, portanto, toda área prioritária para conservação, devido à ameaça de extinção, no mais alto grau, com pelo menos 1500 espécies endêmicas de plantas e que tenha perdido mais de  $\frac{3}{4}$  de sua vegetação original. No ano 2000, existiam listados 25 'hotspots', atualmente ampliados para 34, correspondendo a apenas 2,3% da superfície terrestre, onde se encontram 50% das plantas conhecidas (MYERS, 2000; RHODIN, 2005).

Apesar da crescente procura nos mercados interno e externo por plantas medicinais brasileiras, devido à falta de informações técnicas para os extratores, manejadores e agricultores, a matéria-prima não tem conseguido chegar ao mercado com a qualidade, na quantidade e regularidade necessárias. Além disso, os recursos florestais, em áreas conservadas ou em regeneração, não conseguem suprir a demanda por matéria-prima à medida que as espécies atingem maior importância econômica, com isso corre-se o risco da degradação dos recursos nas áreas naturais ou a ocorrência do seu estreitamento em variabilidade genética (MONTANARI JÚNIOR, 2002).

Pesquisadores da área de conservação de recursos genéticos de plantas medicinais têm enfatizado a necessidade de incrementar as coleções de acessos das espécies mantidas em coleções *ex situ* e da necessidade de uma apropriada representação geográfica dessas espécies em sua área de distribuição (PADULOSI; LEAMAN; QUEK, 2002).

Figueiredo et al. (2004) avaliaram o comportamento de 23 acessos de *Pfaffia glomerata* oriundos de várias regiões do Brasil. Os parâmetros medidos foram o peso da matéria fresca e seca da parte aérea e da raiz, o número de folhas, índice de colheita e teor de  $\beta$ -ecdisona. Os acessos apresentaram diferenças significativas em relação a todas as variáveis analisadas, indicando variabilidade genética na coleção. O teor de  $\beta$ -ecdisona variou entre 0,15 e 0,47%. Três acessos se destacaram em relação ao peso seco de raiz e teor de  $\beta$ -ecdisona para serem usados em projetos de cultivo.

Quatro acessos da espécie *P. glomerata* coletados na vegetação natural do Estado do Paraná também foram estudados por Corrêa Júnior et al. (2003) e Corrêa Júnior, Ming e Cortez (2008), onde um acesso apresentou uma média de produção de  $\beta$ -ecdisona por planta maior (0,38%).

Castro et al. (2008) analisaram o crescimento, o teor e a composição do óleo essencial de nove acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) coletados no

Estado do Tocantins. O teor de óleo obtido do acesso que apresentou a maior produção de biomassa seca foi de 0,43%. Um dos acessos foi superior a todos os demais no acúmulo de massa seca da planta (144,3 g/planta).

Estudos relacionados a características agrônomicas e de variabilidade química de plantas medicinais nativas ainda precisam ser realizados, sendo fundamentais para conservação e caracterização de espécies.

## **2.5 Atividade inseticida de óleos essenciais sobre formigas**

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* estão incluídas entre os principais insetos-praga de cultivos no Brasil (CRUZ et al., 1996). Esses insetos causam desfolha em vários tipos de plantas, como eucalipto, gramíneas e plantas nativas, utilizando as folhas para cultivar o fungo, que é empregado na sua alimentação (ZANUNCIO et al., 2002).

As formigas cortadeiras têm sido controladas, principalmente, utilizando-se inseticidas de origem sintética, os quais agem indiscriminadamente contra todos os insetos, inclusive os benéficos (FERNANDES et al., 2002). Assim, a utilização de produtos naturais de origem vegetal com ação tóxica às formigas e/ou ao fungo simbionte é uma perspectiva na busca de um método eficaz de controle dessa praga.

Os óleos voláteis possuem uma série de ações biológicas (DEY; HARBONE, 1997), sendo essa uma das justificativas para se aprofundar os estudos em óleos no combate de pragas. Compostos orgânicos bioativos produzidos por vegetais incluem repelentes, inibidores de crescimento, esterilizantes e toxinas, que formam uma vasta defesa química contra insetos e microrganismos invasores e apresentam-se como uma estratégia viável para a redução das populações de insetos (CAVALCANTE; MOREIRA; VSCONCELOS, 2006).

Análises de composição química do óleo essencial extraído de inflorescências de genótipo roxo de *Hyptis marruboides*, demonstraram 41,0% de  $\alpha$ -tujona e 15,9% de  $\beta$ -tujona, sendo esses os constituintes majoritários (BOTREL et al., 2009). A tujona, constituinte majoritário do óleo essencial de inflorescências de *H. marruboides* é caracterizada por uma cetona monoterpênica que exhibe propriedades neurotóxicas manifestadas por convulsões tônico-clônicas em animais e humanos (LACHENMEIER, 2010).

Uma planta ou variedade possui diversos mecanismos para resistir ao ataque de uma praga. Esses meios constituem os tipos de resistência. Painter (1951) propôs a classificação de resistência em três tipos: não preferência para alimentação, oviposição ou abrigo (antixenose); antibiose (efeito adverso da planta sobre o metabolismo do inseto) e tolerância (regeneração ou capacidade de suportar o ataque do inseto).

Uma espécie de eucalipto, *Eucalyptus grandis* foi uma das menos consumidas em testes de preferência pela formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* a diferentes espécies florestais (PERES FILHO; DORVAL; BERTI FILHO, 2002). Os autores, porém, não investigaram as causas da não preferência das formigas por essa espécie de eucalipto.

Os óleos essenciais são ricos em terpenoides que podem ser fortemente repelentes às formigas da tribo Attini, conforme demonstrado por Marsaro Júnior et al. (2004). Esses autores observaram alterações de comportamento em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* quando as formigas foram expostas ao óleo essencial de *Eucalyptus maculata*. Além disso, os extratos hexânicos dessa espécie de eucalipto revelaram alguns terpenoides, especialmente o  $\beta$ -eudesmol, como os responsáveis pelas alterações de comportamento.

Cheng et al. (2008) ao estudarem a atividade inseticida do óleo essencial e da substância química *trans*-cinamaldeído presente em *Cinnamomum osmophloeum* verificaram que, tanto o óleo essencial quanto a substância

química obtiveram resultados excelentes no controle de formiga de fogo (*Solenopsis invicta*). Os valores de  $TL_{50}$  para as concentrações de 2% de óleo essencial e *trans*- cinamaldeído após período de exposição em frascos abertos foram 105 e 32,2 minutos; e após período de exposição em frascos fechados foram 18,5 e 21,2 minutos, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. 1998. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- AMARAL, C. L. F. et al. Indução de organogênese em alfavaca (*Ocimum selloi* Benth) cultivados *in vitro*. **Diálogos e Ciência**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 12, p. 1-8, dez. 2007.
- APEL, M. A. **Óleos voláteis e espécies da subtribo Eugeniinae (Myrtaceae): composição química e atividades antimicrobiana e antiinflamatória**. 2001. 256 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- ARAÚJO, E. C. C. et al. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 3760-3762, 2003.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil** 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 1991. 326 p.
- BLANK, A. F. et al. Efeitos da adubação química e da calagem na nutrição de melissa e hortelã-pimenta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 195-198, abr./jun. 2006.
- BORGES, S. R. et al. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 2, p. 173-182, 2011.
- BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae) em diferentes genótipos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, p. 164-169, 2009.
- BOTREL, P. P. **Influência de genótipos, ambientes de cultivo e variação sazonal no teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epling e seu efeito sobre formigas saúva-limão**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- CARVALHO, R. et al. Influência de fatores físicos no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Poir). **Ciência e Prática**, Lavras, v. 19, n. 2, p. 158-164, abr./jun. 1995.

CASTRO, H. G. et al. Growth, content and composition of the essential oil of accessions of mentrasto (*Ageratum conyzoides*) collected in the state of Tocantins, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 36-43, 2008.

CAVALCANTE, G. M.; MOREIRA, A. F. C.; VASCONCELOS, S. D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 9-14, jan. 2006.

CHENG, S. S. et al. Termination red imported fire ants using *Cinnamomum osmophloeum* leaf essential oil. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 889-893, 2008.

CONCEIÇÃO, H. E. O. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em tímós (*Derris* sp.)**. 2000. 191 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CORRÊA JÚNIOR, C. **Estudo agrônômico de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen: sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. 2003. 94 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; CORTEZ, D. A. G. Sazonalidade na produção de raízes e teor de  $\beta$ -ecdisona em acessos de fáfia. **Horticultura Brasileira**, Botucatu, v. 26, n. 3, p. 393-397, 2008.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1931.

CRAVEIRO, A. A. **Óleos de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210 p.

CRESPO, L. E. et al. Regeneração *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., 2003, Lavras; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 161.

CRUZ, A. P. et al. Eficiência de iscas granuladas à base de sulfuramida e de clorpirifós no controle de *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), no trópico úmido. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 26, n. 3, p. 145-150, set. 1996.

DEY, P.M.; HARBONE, J. B. **Plant biochemistry**. London: Academic, 1997. 529 p.

DI STASI, L. C. et al. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996.

ECHEVERRIGARAY, S. et al. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 257-276.

FERNANDES, J. B. et al. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1091-1095, 2002.

FIGUEIREDO, L. S. et al. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos dos Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 7, n. 1, p. 67-72, 2004.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001. p. 105-124.

GONZÁLEZ, E. R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A. L. Transformação genética do eucalipto. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 26, p. 18-22, maio/jun. 2002.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDA GONZÁLEZ S, L. S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 183-260.

HARLEY, R. M. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relatives in Brasil. In: WORKSHOP ON NEOTROPICAL DISTRIBUTION PATTERNS, 1., 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 71-80.

MARSARO JÚNIOR, A. L. et al. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, Heidelberg, v. 30, n. 9, p. 1771-1780, Sept. 2004.

MARTINS, C. F.; NICOLOSO, F. T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 53-61, 2004.

MARTINS, F. T. et al. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1203-1209, 2006.

MONTANARI JÚNIOR, I. et al. O espaçamento e sua influência na produção de raízes e teores de  $\beta$ -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17. 2002, Cuiabá. **Resumos...** Cuiabá: SPMB, 2002. (Resumo, 16).

MOTA, A. S. F. **Diferentes estratégias adaptativas de espécies invasoras e do cerrado do gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae)**. 1998. 117 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1998.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 24, p. 853-858, Feb. 2000.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, p. 756-759, 2004.

PADULOSI, S.; LEAMAN, D.; QUEK, P. **Challenges and opportunities in enhancing the conservation and use of medicinal and aromatic plants**. In: JOHNSON, C.; CHLODWIG, F. (Ed.). **Breeding research on aromatic and medicinal plants**. New York: Haworth Herbal, 2002. p. 243-268.

PAINTER, R. H. **Insect resistance in crop plants**. New York: McMillan, 1951. 520 p.

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). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 637-642, jul./ago. 2006.

PERES FILHO, O.; DORVAL, A.; BERTI FILHO, E. Preferência de saúva limão, *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908, para diferentes espécies florestais em condições de laboratório. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12, n. 2, p. 1-8, abr./jun. 2002.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madri: Mundi Prensa, 1990. 326 p.

PRICE S.; PRICE L. **Aromaterapy for health professionals**. New York: Churchill Livingstone, 1999.

RHODIN, A. A. **Conservation international do Brasil**: prioridades de conservação. <<http://conservation.org.br/como/index.php?id=8>>. Acesso em: 12 maio 2005.

SABÁ, R. T. **Propagação *in vitro* e dinâmica do crescimento de células de jaborandi**. 2000. 38 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

SALES, J. F. et al. Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marruboides* Epl. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, n. 6, p. 552-556, Nov./Dec. 2007.

SANTOS, B. R. et al. Micropropagation of "pequiizeiro" (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.

SIDIBE, L. et al. Aromatic plants of Mali (III): Chemical composition of essential oils of two *Hyptis* species: *H. suaveolens* (L.) Poit. and *H. spicigera* Lam. **Journal Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 13, p. 55-57, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. p. 467-496.

SOUZA, L. K. H. et al. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 963-965, Oct. 2003.

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Programa Nacional dos Recursos Genetic. **Rede de informação dos recursos de Germplasm- Recursos nacionais laboratório de Germplasm**. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?2099>>. Acesso em: 26 maio 2007.

VIEIRA, R. F.; SIMON, J. E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, New York, v. 54, p. 207-216, 2000.

ZANUNCIO, J. C. et al. Influência das iscas formicidas Mirex-S e Blitz na paralisação de corte e no controle de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 2, p. 237-242, abr./jun. 2002.

**CAPÍTULO 2** Cultura nodal e análises de constituintes voláteis por HS-CG/EM em plântulas de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides* EPL.)

## RESUMO

Objetivou-se avaliar fatores que influenciam o crescimento *in vitro* através da cultura nodal e a produção de compostos voláteis em plântulas de *Hyptis marrubioides*. Foram conduzidos quatro experimentos em delineamento experimental inteiramente casualizado. No primeiro, foram avaliados quatro volumes de meio de cultura (10, 20, 30 e 40 mL); no segundo a orientação de inoculação do explante (vertical e horizontal); no terceiro, quatro posições do segmento nodal no explante (1º, 2º, 3º e 4º segmentos nodais) e posição apical. No quarto experimento, avaliou-se a taxa de multiplicação *in vitro* em função da origem do explante. Após 40 a 45 dias foram avaliados o comprimento da brotação (CB), comprimento da raiz (CR), biomassa seca da parte aérea (BSPA) e da raiz (BSR), número de brotações (NB) e de nós (NN). A taxa de multiplicação foi decorrente de três subcultivos utilizando como fonte de explantes, segmentos apicais e nodais. O crescimento *in vitro* de *H. marrubioides* foi superior utilizando-se 40 mL de meio de cultura e segmentos nodais inoculados em posição horizontal com 2 pares de gemas. Posições mais próximas ao ápice do explante apresentaram comprimento superior do maior broto, acúmulos de biomassa seca da parte aérea e da raiz e comprimento da raiz. A maior taxa de multiplicação (4,06) foi obtida no terceiro subcultivo com a utilização de gemas apicais como fonte de explantes. Plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro* foram analisadas para determinação dos compostos do óleo essencial. A cultura nodal mostrou-se um método eficiente para propagação clonal de *H. marrubioides*, pois não interferiu na composição química da fração volátil quando comparada com plantas obtidas de cultivos *in vivo*.

Palavras-chave: Planta medicinal. Micropropagação. Segmentos nodais. Segmentos apicais. Subcultivos. Composição química. Fração volátil.

## ABSTRACT

The work was intended to evaluate the factors influencing the *in vitro* growth through nodal culture and volatile compounds production in plantlets of *Hyptis marruboides*. Four experiments were conducted in a completely randomized experimental design. In the first experiment were evaluated four culture medium volumes (10, 20, 30 and 40 mL); in the second one, orientation of explants inoculation (vertical and horizontal), in the third one, four position of nodal segment in the explant (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> nodal segment) and apical position. In the fourth experiment, was evaluated the multiplication rate in vitro in function to explant source. After 40 to 45 days were evaluated the sprout length (SL), root length (RL), dry matter shoot (DMS) and root (DMR), shoots number (SN) and nodes (NN). The multiplicatin rate was determined from three subculture using explants as source, apical and nodal segment. In vitro growth of *H. marruboides* was greater utilizing 40 mL of culture medium and nodal inoculated segments at horizontal position with 2 pairs of gems. Positions near to the explant apex presented highest length of the greater shoot, dry matter accumulation of shoot and root and root length. The highest multiplication rate (4.06) was obtained in the third subculture with the use of apical gems as explants source. Plants grown in vivo and in vitro were analyzed for essential oil compounds. The nodal culture shown to be an efficient method for clonal propagation of *H. marruboides*, therefore did not affect at the chemical composition of the volatile fraction when compared with plants obtained from cultivation in vivo.

Keywords: Medicinal plant. Micropropagation. Nodal segments. Apical segments. Subculture. Chemical composition. Volatile fraction.

## 1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade de plantas no Brasil é bastante relevante para o mundo. Plantas do gênero *Hyptis* são nativas da região do Cerrado brasileiro e estão ameaçadas de extinção. *Hyptis marrubioides* Epl. é também conhecida como hortelã-do-campo e pertence à família *Lamiaceae*. Estudos têm mostrado atividades biológicas importantes relacionadas ao gênero *Hyptis*, tais como atividades antifúngica (OLIVEIRA et al., 2004), antibacteriana (SOUZA et al., 2003) e inseticida (ARAÚJO et al., 2003) dentre outras. Aos óleos essenciais secretados nesse gênero têm sido atribuídas ações farmacológicas, como anestésico, antiespasmódico e anti-inflamatório (DI STASI; LIMA, 2002).

Explantos provenientes de diferentes órgãos respondem grandemente em sua capacidade morfogenética quando um órgão é segmentado (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Para a cultura nodal, os segmentos nodais segmentados são cultivados no meio de proliferação livre de citocinina, onde eles formam raízes e alongamento dos brotos axilares com múltiplos nós.

Tendo em vista a propagação de plantas homogêneas e geneticamente estáveis, os explantes ideais para a regeneração são aqueles contendo gemas pré-existent, como os segmentos nodais e apicais (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008), uma vez que, não sendo necessária a desdiferenciação celular, há uma menor probabilidade de regeneração de plantas com variação somaclonal. A cultura nodal é considerada ideal para reduzir os riscos da irregularidade genética surgida da fase dos calos.

A capacidade morfogenética pode variar dependendo do volume de meio, orientação do explante na inoculação e posição do explante dentro da planta doadora. Por exemplo, a posição do segmento nodal na plântula e volumes de meio de cultura (REIS et al., 2004); orientação do explante (PEREIRA et al., 2006); taxa de multiplicação *in vitro* (FLORES; JOSEILA;

NICOROSO, 2006); efeito da posição (efeito topofísico) no enraizamento, alongamento de brotação e proliferação de brotos (HUNG; TRUEMAN, 2011); efeito da orientação do segmento nodal no desenvolvimento de calos (NAOR; ZIV; ZAHAVI, 2011); idade, posição e orientação do segmento na resposta morfogenética (GARCIA-LUIS et al., 1999; PAPAFOITOU; MARTINI, 2009; RAMAROSANDRATANA; VAN STADEN, 2003; SAINI; JAIWAL, 2002).

Devido à ameaça de extinção e com intuito de obtenção de mudas homogêneas, objetivou-se avaliar diferentes fatores que podem influenciar o crescimento *in vitro* de *H. marrubioides* através da cultura nodal, bem como determinar possíveis diferenças químicas na fração volátil de plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

A exsicata dessa espécie está depositada no herbário da UFLA, sob o código ESAL 13955, coletada em Tiradentes, MG.

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

### 2.1 Fase de estabelecimento

Segmentos apicais e laterais de *H. marruboides* provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação foram estabelecidos *in vitro* em meio MS semissólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), na ausência de regulador de crescimento. Inicialmente os segmentos foram lavados em água corrente por duas horas e posteriormente desinfestados com solução de hipoclorito de sódio a 30% durante 15 minutos. Após a desinfestação o material vegetal foi lavado quatro vezes com água destilada e autoclavada a 121°C sobre pressão de 1 atm, durante 20 minutos. Foram inoculados 50 segmentos apicais e 50 segmentos nodais em tubos de ensaio (22 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura MS.

Avaliou-se a porcentagem de contaminação, oxidação e de segmentos não brotados.

- a) **Experimento 1:** avaliação de diferentes volumes de meio de cultura no crescimento de segmentos nodais *in vitro* de *H. marrubioides*

Segmentos nodais obtidos de plântulas pré-estabelecidas *in vitro* de *H. marrubioides*, foram utilizados como fonte de explantes. Foram inoculados cinco segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento por frasco com capacidade interna de 350 mL. Utilizou-se o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), semissólido, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem.

Os tratamentos constituíram de diferentes volumes de meio de cultura: 10, 20, 30 e 40 mL. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com 25  $\mu$  mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa, temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 horas de luz.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constituído de quatro tratamentos com quatro repetições. Foram utilizados quatro frascos/repetição contendo cinco explantes cada. Após 45 dias, foram avaliados por explante o número médio de nós, comprimento médio da maior brotação, biomassa seca da parte aérea (BSPA) e biomassa seca de raiz (BSR).

- b) **Experimento 2:** avaliação da orientação do segmento nodal e números de gemas no crescimento *in vitro* de *H. marrubioides*

Segmentos nodais de plântulas com 1 e 2 pares de gemas, foram inoculados na posição vertical e horizontal em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), semissólido, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. Foram

utilizados frascos com capacidade interna de 250 mL, contendo 40 mL de meio e quatro explantes por frasco.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 X 2) sendo duas posições de inoculação e dois números de gemas, totalizando quatro tratamentos. Foram utilizadas quatro repetições com cinco frascos cada.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com intensidade luminosa  $25 \mu \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa, temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz. Após 45 dias, foram avaliados número de nós, comprimento da maior brotação (CMB), biomassa seca da parte aérea (BSPA) e biomassa seca de raiz (BSR).

c) **Experimento 3:** avaliação da posição do segmento nodal na plântula no crescimento *in vitro* de *H. marruboides*

Os explantes utilizados foram segmento apical e 1°, 2°, 3° e 4° segmentos nodais contendo duas gemas axilares de plântulas pré-estabelecidas *in vitro*. Esses segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS semissólido, na ausência de regulador de crescimento. Os explantes foram expostos a condições de  $25 \mu \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa, temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos contendo quatro repetições e cinco tubos por repetição. Após 40 dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento médio da maior brotação (CMB), biomassa seca da parte aérea (BSPA), biomassa seca da raiz (BSR), comprimento da raiz (CR) e número de segmentos nodais.

- d) **Experimento 4:** taxa de multiplicação de *H. marrubioides* em função da origem do explante

Para a obtenção da taxa de multiplicação, foram realizados três subcultivos. Os segmentos apicais e nodais foram inoculados em tubos de ensaio contendo 12 mL de meio MS semissólido na ausência de regulador de crescimento. Foi inoculado um explante por tubo de ensaio e estes foram expostos a condições de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa, temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro.

Após 40 dias realizou-se a primeira repicagem (1° subcultivo). Os segmentos obtidos na primeira repicagem foram, então, inoculados em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 40 mL de meio de cultura, com 5 segmentos por frasco. Em cada subcultivo os segmentos apicais e nodais foram mantidos em frascos separados. Em intervalo de 40 dias, o mesmo procedimento foi realizado para segunda repicagem (2° subcultivo) e terceira repicagem (3° subcultivo).

A partir dos dados do número de segmentos apicais e nodais obtidos ao final de cada subcultivo comparando com o número inicial de gemas inoculadas, foram determinadas as taxas de multiplicação.

## 2.2 Enraizamento e aclimatização

Segmentos nodais com tamanho aproximado de 1,5 cm foram inoculados em frascos com 40 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem regulador de crescimento. Após 40 dias, cinquenta plântulas foram retiradas do frasco e cultivadas em substrato comercial Plantmax® para aclimatização em casa de vegetação. Avaliou-se a porcentagem de sobrevivência das plântulas, comprimento e número de raízes/plântula.

### 2.3 Análise estatística

As variáveis analisadas nos experimentos foram submetidas à análise de variância, com auxílio do *software* SISVAR (FERREIRA, 2002). No primeiro experimento as médias foram submetidas à análise de regressão. No segundo e terceiro experimentos as variáveis foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

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

Amostras de folhas de *H. marruboides* foram coletadas do campo (idade de 24 meses), casa de vegetação (idade de 24 meses) e cultivadas *in vitro* em meio MS sem regulador de crescimento (45 dias). As amostras foram secas em estufa com circulação de ar a 39°C.

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA. Para extração da fração volátil de *H. marruboides* empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System* (CTC Analytics AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 100°C durante 30 min, temperatura da seringa a 110°C. Foram empregados 100 mg de folhas secas fragmentadas em tamanho aproximado de 5 mm, que foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica. A fração volátil foi analisada empregando cromatografia em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) e cromatografia em fase gasosa acoplado a um detector de ionização em chama de hidrogênio (CG-DIC).

Nas análises de CG-EM foi utilizado um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent<sup>®</sup> 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent<sup>®</sup> MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com um intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z*. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e a linha de transferência para o MS foram mantidas em 220 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, isotérmico por 1,5 min, seguido por uma rampa de temperatura de 3° C/min até 240 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 270 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As análises quantitativas da fração volátil foram realizadas por CG-DIC empregando o sistema Agilent<sup>®</sup> 7890A acoplado a um detector de ionização de chama de hidrogênio nas mesmas condições operacionais das análises por CG/EM. As concentrações dos constituintes presentes no óleo foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os componentes foram identificados por comparação de seus índices de retenção relativos calculados com índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; BOTREL et al., 2009; DAVIES, 1990), por comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007) e por coinjeção com mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona de referência [Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, pureza declarada de 82,5% (porcentagem de área relativa CG), ~ 70% de  $\alpha$ -tujona e ~ 10% de  $\beta$ -tujona]. Os índices de retenção (IR) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>), injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Fase de estabelecimento

Segmentos apicais e nodais de plantas cultivadas em casa de vegetação foram estabelecidos *in vitro*. Na fase de estabelecimento, a desinfestação com 30% de hipoclorito de sódio por 15 minutos, foi bastante eficiente, quando associada com a lavagem dos tecidos por 30 minutos pelo menos em água corrente antes da realização da assepsia. A contaminação do explante foi de 2 a 4%, uma porcentagem baixa mostrando a eficiência da assepsia (Tabela 1).

Os segmentos nodais obtiveram maior porcentagem de oxidação comparada à utilização de segmentos apicais (Tabela 1). Esse fato pode ser devido o segmento apical ser mais jovem do que o segmento nodal. Esse tipo de escurecimento é consequência da liberação de fenóis no meio de cultura ocorridos no processo de corte do explante (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

Em relação à porcentagem de segmentos não brotados não foi observado diferença entre os tipos de explantes utilizados (Tabela 1).

Tabela 1 Porcentagem de contaminação, oxidação e de segmentos não brotados oriundos de segmentos apicais e nodais de plantas cultivadas em casa de vegetação de *H. marrubioides* na fase de estabelecimento *in vitro*

<b>Tipos de explantes (origem)</b>	<b>Contaminação (%)</b>	<b>Oxidação (%)</b>	<b>Segmentos não brotados (%)</b>
Segmentos apicais	4	6	8
Segmentos nodais	2	30	8

- a) **Experimento 1:** avaliação de diferentes volumes de meio de cultura no crescimento de segmentos nodais *in vitro* de *H. marruboides*

Os tecidos da planta e órgãos crescem *in vitro* no meio artificial, o qual fornece os nutrientes necessários para o crescimento. O crescimento e desenvolvimento do explante são influenciados pela disponibilidade desses componentes no meio nutritivo e do número de explantes inoculados no meio de cultura devido à competição entre eles.

Neste trabalho, pôde-se observar que o maior volume de meio de cultura disponibilizou mais nutriente e diminuiu a competição entre as plântulas. Isso explica a tendência em se obter um maior crescimento *in vitro* à medida que se aumenta a quantidade do meio de cultura.

Observou-se um aumento no número de nós e comprimento do maior broto à medida que se aumentou os volumes de meio. Valores máximos foram obtidos com a utilização de 40 mL de meio de cultura (4,85 nós por plântula e 8,10 cm de comprimento). A utilização de 10 mL de meio de cultura se mostrou ineficiente para o crescimento *in vitro* de *H. marruboides*, apresentando valores médios mais baixos (2,58 nós por plântula e 2,59 cm de comprimento) (Figura 1).

A quantidade de meio e o tipo de recipiente utilizados no cultivo *in vitro* são variáveis que afetam diretamente a área superficial da interface meio-atmosfera, o volume de ar sobre o meio e a profundidade do meio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Assim, são variáveis que exercem influência direta em parâmetros de crescimento. Para *H. marruboides* pode-se observar diferenças significativas entre os tratamentos, principalmente para a variável comprimento do maior broto com a utilização de volumes de 10 mL com 2,58 cm e 40 mL com 8,10 cm de comprimento (Figura 3).

Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2006) ao estudarem a proliferação de brotos de curauá *in vitro* (*Ananas erectifolius*) e Reis, et al. (2007) estudando a micropropagação de erva cidreira (*Melissa officinalis*) utilizando diferentes volumes de meio de cultura. Nesses trabalhos houve um aumento no número de brotos, número de nós e comprimento do maior broto à medida que se aumentou o volume do meio.

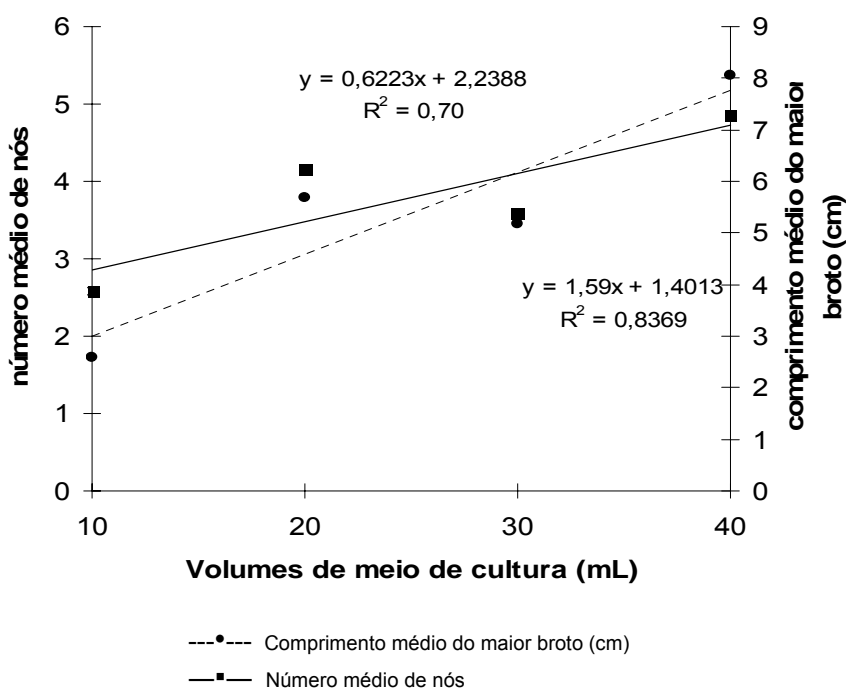


Figura 1 Número de nós por explante e comprimento do maior broto de *Hyptis marruboides* cultivada em diferentes volumes de meio de cultura MS após 45 dias de cultivo

O mesmo comportamento foi observado para a variável biomassa seca da parte aérea (BSPA), onde os melhores incrementos de massa seca foram observados com 40 mL de meio de cultura ( $41,0 \text{ mg plântula}^{-1}$ ) (Figura 2).

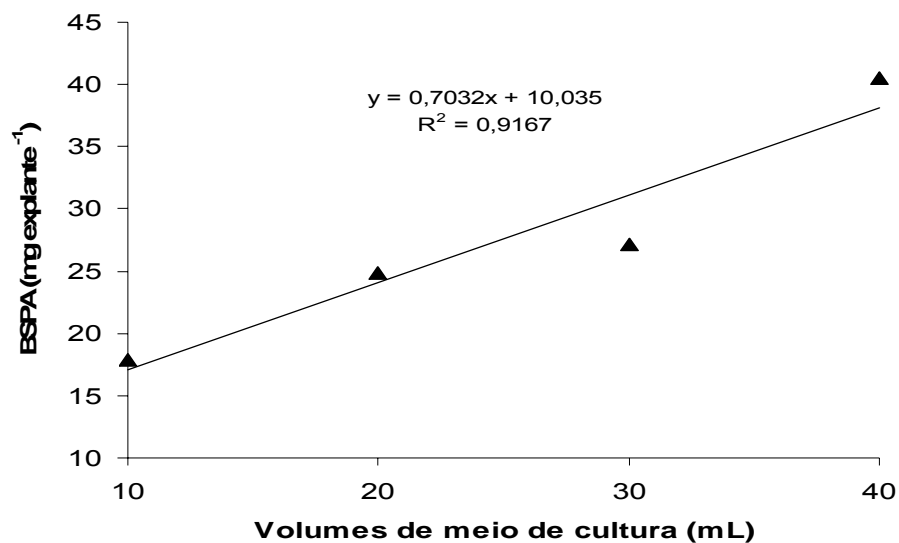


Figura 2 Biomassa seca da parte aérea em mg plântula<sup>-1</sup> (BSPA) de *Hyptis marrubioides* cultivada em diferentes volumes de meio de cultura MS após 45 dias de cultivo

As plântulas cultivadas em diferentes volumes de meio apresentaram crescimento bastante diferenciado. A Figura 3 demonstra as plântulas cultivadas com os diferentes volumes de meio, onde 30 e 40 mL de meio nutritivo, proporcionaram plântulas mais vigorosas com maior número de segmentos nodais para a micropropagação da espécie.

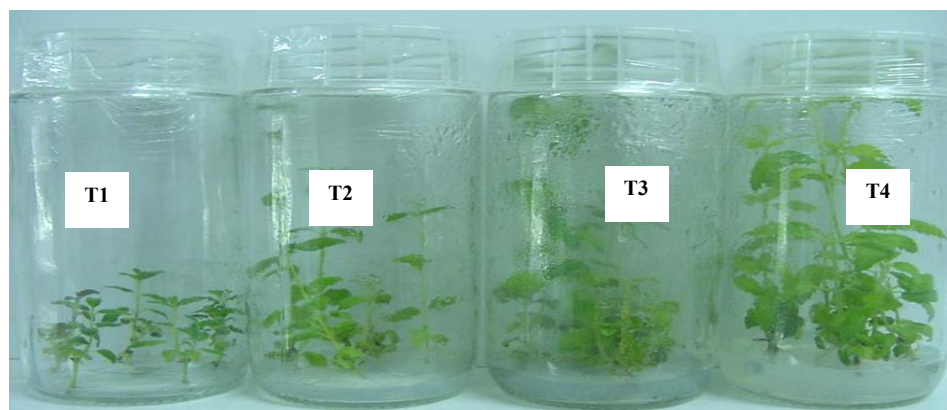


Figura 3 Plântulas de *Hyptis marruboides* após 45 dias de cultivo em diferentes volumes de meio de cultura; T1: 10 mL; T2: 20 mL; T3: 30 mL; T4: 40 mL

Observou-se um aumento no acúmulo de biomassa seca da raiz, à medida que se aumentou os volumes de meio (Figura 4). Valores máximos foram obtidos com a utilização de 40 mL de meio de cultura (5,54 mg explante<sup>-1</sup>). Para cada 10 mL de meio de cultura, houve um acréscimo na biomassa seca da raiz de 1,12 mg explante<sup>-1</sup>.

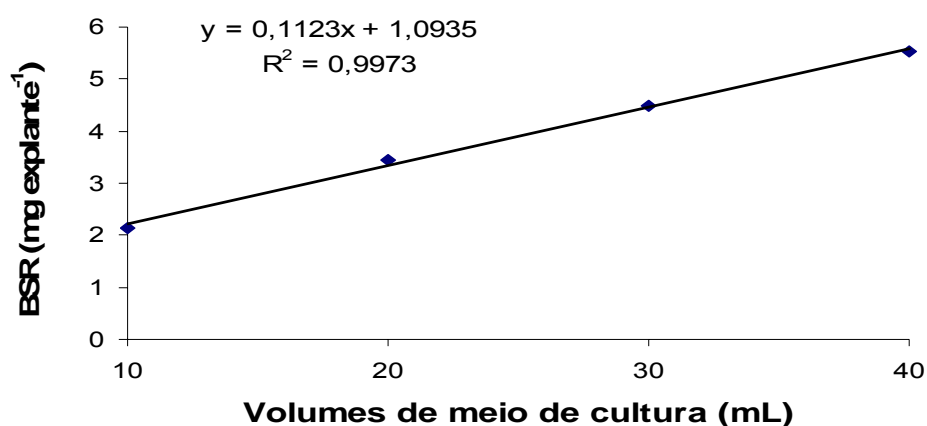


Figura 4 Biomassa seca da raiz em mg explante<sup>-1</sup> (BSR) de *Hyptis marruboides* cultivada em diferentes volumes de meio de cultura MS após 45 dias de cultivo

b) **Experimento 2:** avaliação da orientação do segmento nodal e números de gemas no crescimento *in vitro* de *H. marruboides*

É sabido que a auxina é sintetizada no ápice caulinar e transportada em direção basípeta aos tecidos localizados abaixo do ápice. Esse transporte é denominado transporte polar. O gradiente longitudinal da auxina da parte aérea até a raiz afeta vários processos de desenvolvimento e crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2004). Um desses processos é a inibição do crescimento das gemas axilares. Neste trabalho observou-se que as orientações dos segmentos nodais de *H. marruboides* inoculados no meio de cultura sem regulador de crescimento influenciaram no crescimento das brotações.

A orientação horizontal do segmento nodal no meio de cultura em relação à posição vertical, tanto com uma gema ou duas gemas, induziu maiores crescimento, acúmulo de biomassa seca e número de brotações axilares (Tabela 2).

Avaliando a parte aérea das plântulas a orientação horizontal proporcionou maior comprimento da brotação e, conseqüentemente, maior biomassa seca e número de nós (Tabela 2). A utilização do segmento nodal com duas gemas na posição horizontal emitiu maior número de brotos por segmento nodal. Esse maior número de brotos pode ser explicado pela inibição da dominância apical, pois o transporte polar das auxinas é interrompido na posição horizontal.

O sistema radicular do explante inoculado na posição horizontal proporcionou maior comprimento e biomassa seca da raiz (Tabela 2). Foi observado no nó maior indução do sistema radicular, enquanto que na posição vertical as raízes foram emitidas na parte inferior do explante, onde não havia nó. Isso talvez se deva ao fato de que no nó tenha maior quantidade de células meristemáticas, onde ocorre a síntese de auxina para o enraizamento.

Tabela 2 Biomassa seca da parte aérea (BSPA - mg), e da raiz (BSR – mg), comprimento da brotação (cm), comprimento da raiz (CR), número de brotações (NB) e número de nós (NN) de *Hyptis marruboides* com 45 dias de cultivo, em função da orientação do explante e número de gemas inoculadas

Parâmetros avaliados	1 par de gema		2 pares de gemas	
	Vertical	Horizontal	Vertical	Horizontal
BSPA (mg)	23,84 B	38,51 A	20,78 B	61,09 A
CB (cm)	2,14 B	4,98 A	1,64 B	7,25 A
NB	2,03 B	2,51 A	2,80 B	4,02 A
NN	6,41 B	8,71 A	7,28 B	17,33 A
BSR (mg)	1,54 B	5,22 A	0,94 B	6,49 A
CR (cm)	3,80 B	6,02 A	2,84 B	6,39 A

As médias seguidas da mesma letra, dentro de cada par, na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Pereira et al. (2006) trabalhando com segmentos nodais de unha de gato (*Uncaria guianensis*) em duas posições de inoculação (horizontal e vertical), presença e ausência de GA<sub>3</sub>, com 1, 2, e 3 gemas, verificaram maior acúmulo com explantes inoculados na horizontal sem GA<sub>3</sub> independente do número de gemas com peso entre 30 e 40 mg.

Erig e Schuch (2002) verificaram que os maiores número de brotações, de gemas e taxa de multiplicação foram obtidos com o explante na orientação horizontal para o porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido. Papafotiu e Martini (2009) estudando explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia* usando diferentes posições da folha, orientação e meio suplementado com reguladores de crescimento, observaram que a orientação horizontal do explante proporcionou menor desenvolvimento e proliferação de brotações comparando com a orientação vertical.

A figura 4 demonstra o crescimento e o sistema radicular formado na utilização do segmento nodal inoculado na posição vertical e horizontal. As brotações e as raízes provenientes de explantes inoculados na posição horizontal, tanto com 1 ou 2 pares de gema, proporcionaram maior crescimento das brotações de *H. marruboides*.

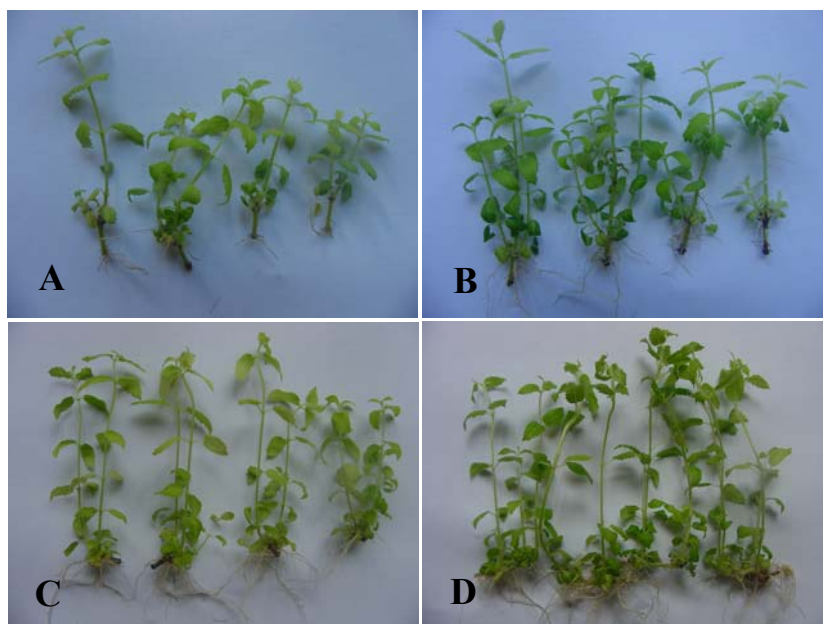


Figura 4 Plântulas de *Hyptis marrubioides* cultivadas na posição vertical com 1 par de gemas (a); posição vertical com 2 pares de gemas (b); posição horizontal com 1 par de gemas (c) e posição horizontal com 2 pares de gemas (d)

- c) **Experimento 3:** avaliação da posição do segmento nodal na plântula no crescimento *in vitro* de *H. marrubioides*

A posição do segmento nodal na plântula demonstrou exercer influência nas variáveis de crescimento analisadas. Alongamento da brotação, comprimento da raiz, biomassa seca da parte aérea e da raiz diferiram entre os segmentos nodais e apicais de *H. marrubioides* quando foram propagados através da cultura nodal. As brotações derivadas do segmento apical e do 1°, 2° e 3° segmentos nodais apresentaram maior comprimento da brotação do que brotos provenientes do 4° segmento nodal na parte basal da plântula (Figura 5 e Tabela 5). No entanto, essa resposta pode ser diferenciada dependendo da espécie em estudo.

Hung e Trueman (2011) demonstraram em plântulas de eucalipto que a maior percentagem de enraizamento e maior comprimento do broto foram obtidos com segmento nodal da parte basal da plântula.

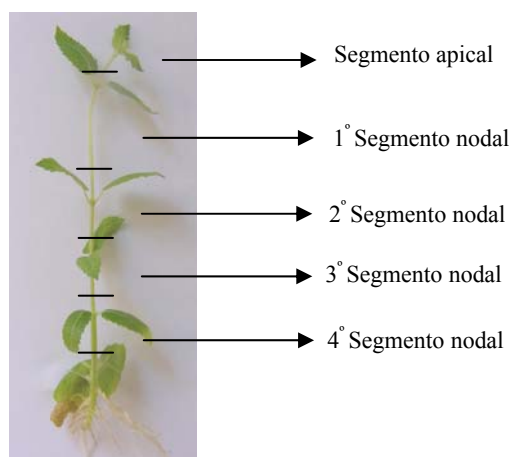


Figura 5 Plântula de *Hyptis marrubioides* demonstrando a posição dos segmentos apical e nodal

Tabela 5 Comprimento médio da maior brotação (CMB - cm), biomassa seca da parte aérea (BSPA - mg), biomassa seca da raiz (BSR - mg), comprimento da raiz (CR - cm) e número de segmentos nodais na brotação de *Hyptis marrubioides* com 40 dias de cultivo, em função da posição do segmento nodal na plântula

Posição do segmento nodal	CMB (cm)	BSPA (mg)	BSR (mg)	CR (cm)	Nº segmentos nodais
Segmento apical	4,75 a	22 a	2,1 a	1,81 a	5,1 b
1º segmento nodal	3,81 a	19 b	0,3 b	0,14 b	6,0 b
2º segmento nodal	4,47 a	19 b	0,5 b	0,21 b	7,2 a
3º segmento nodal	4,29 a	23 a	0,4 b	0,08 b	6,9 a
4º segmento nodal	2,93 b	24 a	0,4 b	0,30 b	6,1 b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Com relação à biomassa seca da parte aérea (BSPA), verificou-se que o segmento apical e os segmentos mais próximos à base apresentaram maiores

acúmulos. Já para o número de segmentos nodais, 2ª e 3ª gemas laterais apresentaram resultados superiores (7,2 e 6,9 nós/explante) (Tabela 5).

Para biomassa seca (BSR) e comprimento de raiz (CR), maiores valores foram observados em plântulas desenvolvidas a partir de segmentos apicais (2,1 mg e 1,81 cm, respectivamente) (Tabela 5). No segmento apical é onde ocorre a síntese das auxinas. Taiz e Zeiger (2004) relatam que há um gradiente de concentração desse fitohormônio no eixo do caule, do ápice para a base devido ao transporte basípeto das auxinas. Essa maior concentração de auxinas no ápice pode ser responsável pelos segmentos apicais de *H. marruboides* terem desenvolvido maior sistema radicular.

Pereira et al. (2005) estudando a influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata, concluíram que microestacas de origem basal proporcionaram resultados superiores aos apicais, especialmente para altura de brotações, taxa de multiplicação e número de brotações secundárias formadas. Em plântulas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) cultivadas *in vitro*, segmentos basais também proporcionaram maior taxa de multiplicação e plântulas maiores em biomassa, altura, número de raízes e brotações (NICOLOSO; ERIG, 2002). Esses resultados são contrários ao observado para espécie *H. marruboides*, onde valores superiores foram encontrados em explantes desenvolvidos principalmente a partir de segmentos apicais, em todos os parâmetros analisados, exceto para número de segmentos nodais.

Reis et al. (2004) não encontraram diferenças no desenvolvimento vegetativo *in vitro* de ipeca (*Psychotria ipecacuanha*) utilizando segmentos nodais obtidos das posições basal, mediana e apical. Esses resultados mostram que existem variações muito grandes entre espécies no que se refere à determinação da posição do segmento nodal que proporciona melhor crescimento *in vitro*.

Outros trabalhos mostram a importância da posição do explante, a orientação e a suplementação ou não de reguladores de crescimento no desenvolvimento e na proliferação de brotações (COSTA et al., 2006; GARCIA-LUIS et al., 1999; HUNG; TRUEMAN, 2011; NAOR; ZIV; ZAHAVI, 2011; PAPAFOITOU; MARTINI, 2009; RAMAROSANDRATANA; STADEN, 2003; SAINI; JAIWAL, 2002).

d) **Experimento 4:** taxa de multiplicação de *H. marruboides* em função da origem do explante

Observando a plântula *in vitro*, após o período de 40 dias, as folhas demonstraram amarelecimento e posterior queda. O desenvolvimento e crescimento dos segmentos de *H. marruboides in vitro* evidenciaram que a plântula inicia a entrada na fase estacionária aos 40 dias de cultivo. Portanto, para essa espécie a melhor época de repicagem é por volta de 30 a 40 dias, antes de entrar na fase estacionária e assim não entrar na fase de senescência. Esse período é importante para determinar a taxa de multiplicação e calcular o número de plântulas que poderão ser obtidas num determinado intervalo de tempo. Conforme Grattapaglia e Machado (1998), o ideal é que um novo subcultivo seja realizado antes do início da fase de senescência.

Na Figura 6 pode ser observado um esquema detalhado do número de explantes obtidos em cada subcultivo do segmento apical e nodal. O maior número de explantes (572) foi obtido a partir de segmentos apicais, onde no 1º, 2º e 3º subcultivos foram repicados apenas segmentos nodais (Figura 6A). Em contrapartida, explantes oriundos de segmentos nodais, apresentaram os menores valores (Figura 6B).

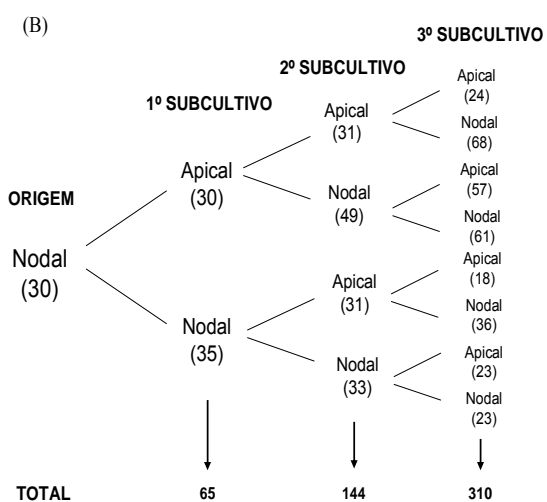
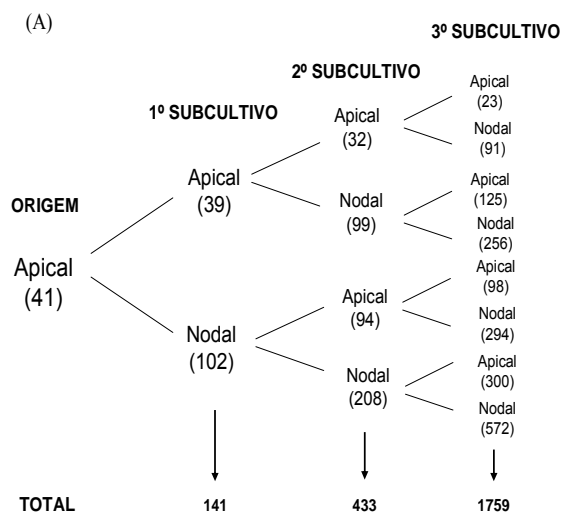


Figura 6 Número final de explantes de *Hyptis marrubioides* oriundos de segmento apical (A) e segmento nodal (B), obtidos em cada subcultivo com intervalo de 40 dias

No final do 1º subcultivo foram obtidos 141 explantes oriundos de segmentos apicais, com uma taxa de multiplicação de 3,44. No 2º subcultivo o número de explantes obtido foi de 433, com uma taxa de multiplicação de 3,07 e no 3º subcultivo esse número passou para 1759 explantes com taxa de multiplicação de 4,06 (aumentando em média 32% com relação à taxa de multiplicação da 2ª repicagem) (Tabela 6).

Já explantes oriundos de segmentos nodais obtiveram-se 65 no 1º subcultivo, com uma taxa de multiplicação de 2,17. No 2º subcultivo, 144 explantes, com uma taxa de multiplicação de 2,22 e no 3º subcultivo 310 explantes com taxa de multiplicação de 2,15. Portanto, a utilização de segmentos nodais como fonte de explantes, mostrou-se menos eficiente para obtenção de maiores taxas de multiplicação em *H. marruboides*.

Tabela 6 Número de plântulas, taxas de multiplicação (TM) de segmentos apicais, nodais e total de explantes de *Hyptis marruboides*, em três subcultivos com intervalo de 40 dias

Origem do explante	Nº inicial gemas	1º		2ª		3º	
		Subcultivo Nº de plântulas	TM	Subcultivo Nº de plântulas	TM	Subcultivo Nº de plântulas	TM
Apicais	41	141	<b>3,44</b>	433	<b>3,07</b>	1759	<b>4,06</b>
Nodais	30	65	<b>2,17</b>	144	<b>2,22</b>	310	<b>2,15</b>
Total	71	206	<b>2,90</b>	577	<b>2,80</b>	2069	<b>3,59</b>

A taxa de multiplicação pode depender do tipo de explante e da espécie em estudo. Neste trabalho com a espécie *H. marruboides* o explante apical evidenciou melhor crescimento e taxa de multiplicação. Na micropropagação de ginseng brasileiro (*Pfaffia tuberosa*), explantes provenientes de segmentos nodais apresentaram uma maior taxa de multiplicação quando comparados com os apicais (FLORES; JOSEILA; NICOROSO, 2006).

Na Tabela 6, também constam os valores das taxas de multiplicação total (segmentos apicais e nodais). É possível observar que após o terceiro subcultivo a taxa de multiplicação média total é de 3,59, ou seja, para cada segmento obtêm-se em média três plântulas e meia. Pode-se estimar assim que, após o período de três subcultivos (120 dias), iniciando com 1000 explantes de plantas elites, obterem-se aproximadamente 96703 plântulas, sem considerar as perdas por contaminação.

Calvete et al. (2009) estudando o desempenho *in vitro* e agrônômico de cultivares de morangueiro em vários subcultivos, concluíram que a maior taxa de multiplicação foi observada durante o 2º e o 3º subcultivos com média de sete a oito propágulos/explante, respectivamente. Para *H. marruboides*, foi observado um aumento na taxa de multiplicação no 3º subcultivo com explantes de origem apical (média de quatro gemas/explante) (Tabela 6).

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

As análises químicas da fração volátil das folhas de *H. marruboides* oriundas de cultivo em campo, casa de vegetação e *in vitro* não indicaram alterações significativas na composição e teores dos constituintes. Foram identificados nas amostras 12 constituintes químicos que representaram mais de 91% do total da composição química da fração volátil (Tabela 7).

Os voláteis emitidos caracterizaram por uma porcentagem de monoterpenos (68,91-73,18%) maior que a de sesquiterpenos (20,12 – 22,78%). No entanto, Botrel et al. (2010) observaram maior porcentagem de sesquiterpenos no campo de 76,34% e casa de vegetação de 92,57% e baixa porcentagem de monoterpenos nos dois materiais (22,86% e 2,35%, respectivamente). Isso pode ser devido à diferença entre as amostras, pois no presente estudo analisou-se as frações voláteis extraídas por ‘*Headspace*’ e no

estudo de Botrel et al. (2010) foi analisado o óleo essencial obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger.

Independente da origem das amostras (campo, casa de vegetação e cultivo *in vitro*) os constituintes majoritários da fração volátil foram  $\alpha$ -tujona (39,51 a 40,00%) e terpinoleno (14,45 a 17,00%).

Neste trabalho foi detectado  $\alpha$ -terpineno (0,65-1,71%) e terpinoleno (14,45-17,00%) e Botrel et al. (2010) não encontraram esses constituintes. No entanto, encontraram terpinen-4-ol (0,00-1,12%) e  $\alpha$ -terpineol (0,71-1,40%).

O  $\alpha$ -copaeno não foi detectado nas amostras da fração volátil oriundas do cultivo *in vitro*. Os demais constituintes apresentaram pequenas variações nos seus teores. Al-Qudah, Shibli e Alali (2011) analisaram o óleo essencial de *Teucrium polium* L. e observaram que *in vitro* o constituinte  $\beta$ -cariofileno foi superior em relação as plantas do campo.

Essa investigação mostra que a micropropagação de *H. marruboides*, através da proliferação da cultura nodal, é um método confiável para multiplicação rápida dessa espécie permitindo a mesma produção da fração volátil de plantas cultivadas no campo ou em ambiente protegido.

Tabelas 7 Constituição química da fração volátil de plantas do campo (24 meses), casa de vegetação (24 meses) e de plântulas (45 dias) de *Hyptis marruboides*

Compostos	IR <sup>a</sup>	Campo	Casa Vegetação	<i>In vitro</i>
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
tuja-2,4-(10)-dieno (M)	964	8,19±0,80	10,08±1,85	11,42±2,69
2,6-dimetil-2-octeno (H)	967	1,01±0,06	1,21±0,13	1,22±0,20
$\alpha$ -terpineno (M)	1015	1,71±0,02	1,35±0,35	0,65±0,13
terpinoleno (M)	1089	15,03±0,56	14,45±0,01	17,00±1,81
$\alpha$ -tujona (M)	1102	39,51±1,23	40,00±0,03	39,65±2,37
$\beta$ -tujona (M)	1120	0,18±0,02	0,17±0,05	0,09±0,02
<i>trans</i> -pinocanfona (M)	1162	3,28±0,01	3,43±0,13	3,15±0,08
$\beta$ -bourboneno (S)	1385	7,72±0,02	6,34±0,38	6,15±0,21
$\alpha$ -copaeno (S)	1394	1,47±0,09	0,94±0,63	nd

“continua”

Tabela 7 “conclusão”

Compostos	IR <sup>a</sup>	Campo	Casa Vegetação	<i>In vitro</i>
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
β-cariofileno (S)	1431	7,37±0,57	7,61±0,79	5,99±1,15
<i>trans</i> -muurolo-4-(14),5-dieno (S)	1495	3,67±0,56	4,72±0,11	4,84±0,87
γ-himachaleno (S)	1498	2,55±0,09	2,20±0,42	3,14±0,28
Monoterpenos totais (%)		68,91	70,69	73,18
Sesquiterpenos totais (%)		22,78	21,81	20,12
<b>Total identificado (%)</b>		<b>91,69</b>	<b>92,50</b>	<b>93,30</b>

<sup>a</sup> Índice de retenção relativo a série n-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em coluna HP-SMS.

nd = não detectado; M = monoterpeno; S = sesquiterpeno; H = hidrocarboneto

### 3.7 Enraizamento e aclimatização

A espécie *H. marruboides* foi eficiente em 100% no enraizamento dos segmentos nodais no meio de cultivo MS sem a suplementação de reguladores de crescimento. As plântulas com tamanho médio de 6,4 cm e com uma média de 4 raízes/plântula foram aclimatizadas com 100% de sobrevivência. A Figura 7 ilustra as plântulas para aclimatização e no vaso.

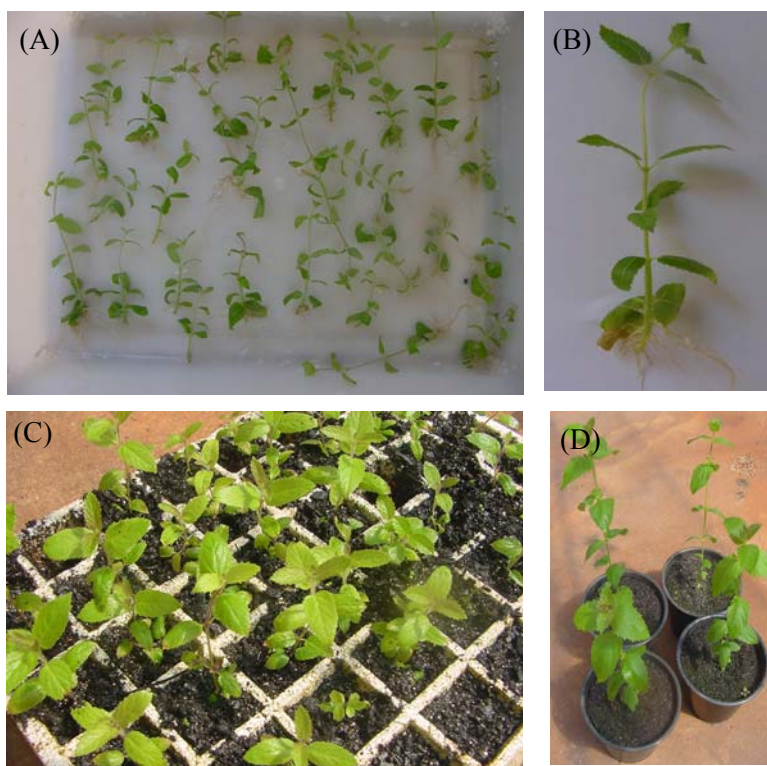


Figura 7 Plântulas retiradas do frasco (A); plântula para aclimatização (B); plântulas em bandejas (C); plântula em vaso após 30 dias (D)

#### 4 CONCLUSÕES

O crescimento *in vitro* de segmentos nodais de *H. marruboides* é favorecido com o cultivo em 40 mL de meio de cultura, com explantes inoculados na posição horizontal. A utilização de diferentes posições do segmento nodal na plântula influencia o crescimento *in vitro* de *H. marruboides*, onde para a maioria das variáveis de respostas os segmentos mais próximos à base apresentam resultados inferiores aos apicais. Plântulas de *H. marruboides* oriundas de segmentos apicais proporcionam maior taxa de multiplicação *in vitro* no 3º subcultivo (4,06).

A cultura nodal é um método eficiente para propagação clonal de *H. marruboides*, pois não interfere na composição química da fração volátil quando comparada com plantas obtidas de cultivos convencionais.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4<sup>th</sup> ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AL-QUDAH, T. S.; SHIBLI, R. A.; ALALI, F. Q. *In vitro* propagation and secondary metabolites production in wild germander (*Teucrium polium* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 47, p. 496-505, 2011.
- ARAÚJO, E. C. C. et al. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 3760-3762, 2003.
- BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae) em diferentes genótipos. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 1, n. 2, p. 164-469, 2009.
- BOTREL, P. P. et al. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marrubioides* EPL. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 33-37, 2010.
- CALVETE, E. O. et al. Desempenho *in vitro* e agronômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 943-949, dez. 2009.
- COSTA, M. G. C. et al. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explant of *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 100, p. 63-74. 2006.
- DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 503, p. 1-24, 1990.
- DI STASI L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002. 604 p.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 293-295, 2002.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistemas de análises de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos: versão 4.3. Lavras: UFLA, 2002.

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

GARCIA-LUIS, A. G. et al. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of troyer citrange. **Annals of Botany**, London, v. 84, p. 715-723, 1999.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Amsterdam: The Background Springer, 2008. p. 501, v. 1.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação: retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Cultura de tecidos transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.

HUNG, C. D.; TRUEMAN, S. J. Topographic effects differ between node and organogenic cultures of the eucalypt *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Wageningen, v. 104, p. 69-77, 2011.

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

NAOR, V.; ZIV, M.; ZAHAVI, T. The effect of the orientation of stem segments of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. Chardonnay on callus development in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Wageningen, v. 106, p. 353-358, 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH mass spectral library: software**. Gaithersburg, 2008.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p. 1499-1506, dez. 2002. Edição Especial.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, p. 756-759, 2004.

PAPAFOTIOU, M.; MARTINI, A. N. Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl. (ZZ). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, p. 115-120. 2009.

PEREIRA, F. D. et al. Proliferação *in vitro* de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio de cultura. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 102-106, 2006.

PEREIRA, J. E. S. et al. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 86-89, jan./mar. 2005.

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). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 637-642, jul./ago. 2006.

RAMAROSANDRATANA, A. V.; VAN STADEN, J. Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Wageningen, v. 74, p. 249-255, 2003.

REIS, E. S. et al. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) *in vitro*. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 703-709, maio/jun. 2004.

REIS, E. S. et al. Tipos de explantes e volumes de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 83-88, 2007.

SAINI, R.; JAIWAL, P. K. Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna Mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. **Plant Science**, Limerick, v. 163, p. 101-109, 2002.

SOUZA, L. K. H. et al. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 963-965, Oct. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004. 719 p.

**CAPÍTULO 3 Variabilidade química do óleo essencial de folhas e inflorescências de três acessos de *Hyptis marrubioides* EPL. coletados no sul de Minas Gerais**

## RESUMO

O gênero *Hyptis* apresenta uma grande importância como fonte de constituintes bioativos, possuindo importantes efeitos biológicos. Estudos com populações silvestres de plantas aromáticas e medicinais, relacionando teor e composição química com área de ocorrência dessas espécies, têm demonstrado a existência de variabilidade química no óleo essencial de plantas de diferentes populações. Objetivou-se avaliar o teor e a composição química do óleo volátil em folhas e inflorescências frescas de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides*), coletadas em diferentes localidades do Sul de Minas Gerais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, perfazendo um fatorial 3x2, com quatro repetições cada totalizando 24 parcelas. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação por 90 minutos e analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Foram realizadas análises de componentes principais (PCA) e de agrupamento hierárquico (HCA) a fim de avaliar a similaridade da composição química entre o óleo essencial das folhas e inflorescências dos três locais. O local de coleta influenciou no teor de óleo essencial de folhas e inflorescências de hortelã-do-campo. O maior teor de óleo essencial foi mensurado nas folhas de *H. marruboides* provenientes do município de Luminárias (0,14%). Não houve diferença significativa entre os locais de coleta no teor de óleo essencial extraído das inflorescências de *H. marruboides*. Os principais constituintes químicos identificados nos acessos foram a  $\alpha$ -tujona (6,72-19,3%), a  $\beta$ -tujona (8,40-24,20%), a *cis*-pinocanfona (2,68-5,71%),  $\alpha$ -copaeno (4,43-9,25%),  $\beta$ -cariofileno (7,24-11,49%) e o  $\gamma$ -muuroleno (6,73-12,02%). De acordo com as análises de PCA e HCA foi possível concluir que há um grande polimorfismo químico entre as amostras dos óleos essenciais.

Palavras-chave: Planta medicinal. População de plantas. Cromatografia Gasosa. Análise multivariada.

## ABSTRACT

The genus *Hyptis* presents a great importance as a bioactive constituents source, possessing important biological effects. Studies with wild populations of aromatic and medicinal plants, relating content and chemical composition with occurrence area of these species, have shown the existence of chemical variability in essential oil of plants from different populations. Objective was to evaluate the content and chemical composition of the volatile oil in leaves and fresh mint leaves (*Hyptis marrubioides*) inflorescences, collected in different sites in southern of Minas Gerais. The experimental design was completely randomized; making up a factorial 3x2, with four replicates each, amounting 24 plots. The essential oil was extracted by hydrodistillation per 90 minutes and analyzed by GC-ME. There were carried out principal components analyses (PCA) and hierarchical clustering (HCA) in order to evaluate the chemical composition similarity between the essential oil of the leaves and inflorescences of the three places. The collection site influenced the essential oil content of leaves and mint leaves inflorescences. The highest essential oil content was measured in the leaves of *H. marrubioides* from the municipality of Luminárias (0.14%). There were no significant differences among the collection site in the essential oil content extracted of *H. marrubioides* inflorescences. The main chemical constituents identified in the accessions were  $\alpha$ -thujone (6.72-19.3%),  $\beta$ -thujone (8.40-24.20%), *cis*-pinocamphone (2.68-5.71%),  $\alpha$ -copaene (4.43-9.25%),  $\beta$ -cariophyllene (7.24-11.49%) and  $\gamma$ -muurolene (6.73-12.02%). According to the PCA and HCA analyses, it was possible to conclude that there is a great chemical polymorphism among the essential oil samples.

Keywords: Medicinal plant. Population plants. Gas chromatography. Multivariate analysis.

## 1 INTRODUÇÃO

O óleo essencial no gênero *Hyptis* tem importância como fonte de constituintes bioativos, possuindo importantes efeitos biológicos, como atividades antimicrobianas, citotóxicas e inseticidas (KUHNT et al., 1995). *Hyptis marruboides* Epl., conhecida popularmente como hortelã-do-campo, é uma planta de uso medicinal com atividades contra infecções gastrointestinais e dermatológicas, dores e câimbras (CORRÊA, 1931).

Vários fatores devem ser levados em consideração quando se deseja estudar o teor e a produção de compostos químicos ativos. A variabilidade na produção e teor dos óleos essenciais em *Lamiaceae* é conhecida por ser afetada por fatores ambientais tais como luz, disponibilidade de nutrientes, estações do ano, período do dia, ciclo e parte da planta, como também por fatores genéticos (VIEIRA, 2000).

A constituição genética das plantas influencia a produção de determinados metabólitos, e diferentes variedades de espécies de plantas medicinais podem conter diferentes teores de óleo essencial. A hortelã (*Mentha arvensis*), por exemplo, possui variedades que são mais ricas em óleo essencial, contendo alto teor de mentol (BASSO; PISANTE; BASSO, 1998; SHARMA et al., 1992).

A variabilidade genética das plantas é expressa através dos chamados quimiotipos (APEL, 2001). Segundo alguns autores, quimiotipo é um termo aplicado a plantas de mesmo gênero e espécie, com a mesma aparência externa, mas que diferem, às vezes consideravelmente, em sua composição química. Esses quimiotipos usualmente ocorrem naturalmente em plantas silvestres, e podem resultar de polinização cruzada (PRICE; PRICE, 1999; SIMÕES; SPITZER, 2000).

Em estudos de divergência genética podem ser utilizados vários métodos, cuja escolha baseia-se na precisão desejada pelo pesquisador, na facilidade da análise e na forma como os dados foram obtidos. As técnicas de análise multivariada podem ser utilizadas para avaliar a divergência entre acessos e para selecionar os descritores mais importantes na discriminação dos acessos (AMARAL JÚNIOR, 1994; PEREIRA; VENCOVSKY; CRUZ, 1992). Entre as técnicas estatísticas multivariadas, destacam-se a análise de componentes principais (PCA) e os métodos de agrupamento hierárquico (HCA) (CRUZ, 1990, 1997; CRUZ; REGAZZI, 1997).

A Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) é uma ferramenta estatística multivariada que permite extrair, de um determinado conjunto de dados, informações relevantes para o seu entendimento. Esse conjunto de dados é caracterizado por apresentar dados quantitativos para diversas variáveis obtidos para diferentes amostras. As variáveis podem ser, por exemplo, características físico-químicas, dados cromatográficos e dados espectroscópicos. A aplicação da PCA a esse tipo de conjunto de dados permite explorar os resultados a fim de verificar a existência de similaridades ou diferenças entre as amostras que, por sua vez, corresponderão às semelhanças ou diferenças na composição química das amostras. A PCA visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis, denominadas componentes principais, as quais são obtidas através de combinações lineares das variáveis originais e são organizadas em ordem decrescente de importância. Como resultado, a PCA gera dois novos conjuntos de dados chamados de escores e pesos, os quais trazem, respectivamente, informações sobre as amostras e as variáveis. A interpretação dos dados gerados na PCA é facilitada por meio da análise gráfica. Os gráficos podem ser obtidos bi ou tridimensionais,

e representam as amostras e as variáveis em um sistema cartesiano, onde os eixos são as componentes principais. Esses gráficos apresentam informações que expressam as inter-relações que podem existir entre as amostras e as variáveis, facilitando a interpretação multivariada de todo o conjunto de dados (CORREIA; FERREIRA, 2007; MATOS et al., 2003; NUNES, 2011). A HCA busca agrupar as amostras em classes, baseando-se na similaridade dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros de classes diferentes (CORREIA; FERREIRA, 2007).

*Hyptis marruboides* é uma espécie que apresenta grandes potenciais biológicos, mas ainda são necessários vários estudos que comprovem sua eficácia. Estudar a variabilidade química é fundamental quando se deseja desenvolver estudos de efeitos biológicos, objetivando um padrão químico para essa espécie aliado à seleção de plantas com altos teores de óleo essencial. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o teor e a composição química de óleo volátil em folhas e inflorescências de *H. marruboides* coletadas em diferentes localidades do Sul de Minas Gerais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta das amostras

Folhas e inflorescências de populações nativas de *H. marrubioides* foram coletadas às 8h em três municípios do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil, durante o outono de 2010. As três localidades são os municípios de Ijaci situado a 21°11'58" de Latitude Sul e 44°57'32" de Longitude Oeste de *Greenwich* a uma altitude de 991 m, Luminárias situado a 21°30'30" de Latitude sul e 44°55'19" de Longitude oeste de *Greenwich* a uma altitude de 893 m e Ribeirão Vermelho situado a 21°12'49" de Latitude sul e 45°01'10" de Longitude oeste de *Greenwich* a uma altitude de 806 m. Em todos os locais, as plantas se encontravam próximas a rios que circundam a região.

### 2.2 Análises do solo

Em todas as localidades coletaram-se seis amostras de solo retiradas a uma camada de 0-20 cm de profundidade ao redor das plantas de *H. marrubioides* em fase de floração, as quais foram reunidas em uma única amostra constituindo uma amostra composta.

Realizaram-se as análises dos atributos de fertilidade dos solos (ANEXO A) no Laboratório de Fertilidade do Solo do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras.

Os resultados das análises de textura foram os seguintes para o município de Ijaci: argila, areia, silte ( $\text{dag kg}^{-1}$ ) = 38 (textura argilosa); 2,0; 60,0; Luminárias: 36,0 (textura argilosa); 34,0; 30,0 e no município de Ribeirão Vermelho: 24,0 (textura média); 42,0; 34,0.

A caracterização química das amostras de solo foi realizada conforme a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (1997). Os atributos químicos dos solos para o município de Ijaci foram: pH em água = 5,6; P e K ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) = 10,7 e 90;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , H+Al ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) = 2,7; 0,4; 0,2; 5,0; CTC efetiva, CTC potencial, ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) = 3,5; 8,4; m, V (%) = 5,7, 39,8; matéria orgânica ( $\text{dag kg}^{-1}$ ) = 3,8. Para o município de Luminárias foram: pH em água = 6,0; P e K ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) = 2,0 e 133;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , H+Al ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) = 2,6; 1,1; 0,1; 3,6; CTC efetiva, CTC potencial, ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) = 4,1; 7,7; m, V (%) = 2,4, 52,8; matéria orgânica ( $\text{dag kg}^{-1}$ ) = 4,8. E para o município de Ribeirão Vermelho foram: pH em água = 6,3; P e K ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) = 4,6 e 147;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , H+Al ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) = 2,5; 0,7; 0,1; 1,7; CTC efetiva, CTC potencial, ( $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) = 3,7; 5,2; m, V (%) = 2,7, 68,3; matéria orgânica ( $\text{dag kg}^{-1}$ ) = 1,6.

### 2.3 Extração e análises do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais localizado no Departamento de Agricultura na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

Os óleos essenciais das folhas e inflorescências frescas de *H. marruboides* foram extraídos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 90 min. O óleo essencial foi purificado por partição líquido-líquido com diclorometano. A fase orgânica foi reunida e tratada com 5 g de sulfato de magnésio anidro durante 30 min. Após esse período a solução foi filtrada e o solvente evaporado em temperatura ambiente, sob capela de exaustão de gases. O teor dos óleos essenciais foi determinado pelas massas obtidas dos óleos, e expresso em g de óleo por 100 g de matéria fresca (%).

A composição química do óleo essencial foi determinada por uma amostra composta formada pelo agrupamento das repetições de cada tratamento.

As análises foram realizadas em um aparelho de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro quadrupolar de massas (CG-EM), Shimadzu<sup>®</sup> QP5050A (Kyoto, Japão), nas seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida, modelo CBP-5 (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 μm de espessura do filme em 5% de fenilmetilpolisiloxano) (Shimadzu<sup>®</sup>, Japão), com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> de hélio como gás de arraste; aquecimento com temperatura programada (60°C com um gradiente de 3°C min<sup>-1</sup> até 240°C e, em seguida, com um gradiente de 10°C min<sup>-1</sup> até 270°C, mantendo-se uma isoterma de 7 min, com um tempo total de corrida de 70 min). A energia de ionização do detector foi de 70 eV, sendo o volume de injeção no modo *split* (1:20), amostra de 0,5 μL diluídas em diclorometano (grau ultrarresíduo, Baker, EUA). As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220°C e 240°C, respectivamente. A análise foi conduzida no modo varredura, a uma velocidade de 1,0 varredura s<sup>-1</sup>, com um intervalo de massas de 40-400 *m/z*. A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma total de íons (TIC). A identificação dos constituintes foi realizada por comparação, automática e manual, dos espectros de massas com o banco de dados das bibliotecas NIST/EPA/NHI (NIST, 1998), por comparação dos espectros de massas e índices de retenção (IR) com os da literatura (ADAMS, 2001) e coinjeção com padrões autênticos. Os índices de retenção foram calculados através da coinjeção com uma mistura de hidrocarbonetos, C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub> (Sigma, EUA), e com aplicação da equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

Foi realizada análise do percentual normalizado dos constituintes químicos identificados, que foram agrupados de acordo com a estrutura carbônica dos precursores biossintéticos dos terpenos presentes nos óleos essenciais nas três localidades e duas partes da planta de *H. marruboides*.

## 2.4 Análises estatísticas e multivariada

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, compreendendo três localidades de coleta (Ijaci, Luminárias e Ribeirão Vermelho) e duas partes da planta (folhas e inflorescências), perfazendo um fatorial 3x2, num total de 6 amostras de óleos essenciais, com quatro repetições, totalizando 24 parcelas. Os resultados dos teores do óleo essencial em *H. marruboides* foram analisados estatisticamente por análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade pelo programa Sisvar<sup>®</sup>, versão 5.0 (FERREIRA, 2000).

A fim de avaliar a similaridade da composição química entre o óleo essencial das folhas e inflorescências dos três acessos de *H. marruboides* (Ijaci, Luminárias e Ribeirão Vermelho) foram realizadas análises de componentes principais (PCA) e de agrupamento hierárquico (HCA). A PCA foi aplicada as amostras de óleos essenciais, tomando as áreas percentuais relativas correspondentes a cada constituinte químico identificado nas análises de CG-EM (Tabela 2, pág. 83) como variáveis. Para identificação dos constituintes no gráfico de pesos foi utilizado o intervalo numérico entre 1 a 31, correspondentes a numeração do pico cromatográfico indicado na Tabela 3. Foi tratada uma matriz 6x31 (6 amostras de óleos essenciais x 31 teores de constituintes químicos). Os dados foram pré-processados empregando autoescalamento e os resultados estão demonstrados pelos gráficos dos escores e dos pesos, com duas componentes principais (PC).

O agrupamento hierárquico das seis amostras de óleo essencial utilizou como medida de dissimilaridade a distância euclidiana média, obtida a partir dos dados autoescalados dos 31 descritores, correspondentes aos constituintes químicos identificados pela análise química representada na Tabela 4. Para a apresentação das estimativas das dissimilaridades da composição química das

amostras dos óleos essenciais foi traçado um dendrograma representativo dos grupos formados. As análises de PCA e de agrupamento hierárquico foram realizadas com os recursos computacionais do *software* Matlab version 7.5, MathWorks, Natick, 2007.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análises do solo

Os atributos de fertilidade e textura dos solos dos três acessos de *H. marruboides* indicaram que os solos apresentaram uma acidez de média a fraca.

Observou-se também que os solos coletados nos municípios de Ijaci e Luminárias apresentaram textura argilosa e os coletados em Ribeirão Vermelho, textura média. Todos os solos apresentaram teores altos de Mn e Fe. Esse resultado pode ser devido à ocorrência de populações de *H. marruboides* próximas as margens de rios onde predominam as várzeas, onde o ambiente químico e biológico dos solos é profundamente alterado. Conforme Meurer (2006), dependendo do estado de oxirredução do solo, os valores do pH e da concentração de  $Mn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  podem ser aumentados na solução do solo.

Apesar de apenas as condições nutricionais do solo terem sido avaliadas neste estudo, possivelmente outras variáveis locais, tais como microclima, insolação, idade da planta, variabilidade genética também podem ter grande influência na composição química volátil de *H. marruboides*. Isso demonstra um grande potencial no estudo dessas variáveis para maximizar a produção dos constituintes voláteis com interesse medicinal ou agroquímico.

#### 3.2 Análises do óleo essencial

A análise de variância indicou interação significativa para os fatores locais de coleta e partes da planta. Não houve diferença significativa entre os locais de coleta no teor de óleo essencial extraído das inflorescências. O teor de óleo nas inflorescências das plantas coletadas em Ribeirão Vermelho (0,12%) e Ijaci (0,13%) foram maiores que nas folhas, 0,02% e 0,05%, respectivamente.

Nas folhas, o maior teor de óleo essencial de *H. marruboides* foi mensurado de plantas provenientes do município de Luminárias (0,14%), teor cerca de três vezes superior em relação ao óleo das folhas das plantas oriundas de Ijaci (0,05%) (Tabela 1).

O maior teor de óleo essencial encontrado em folhas do acesso de Luminárias pode ser explicado pelas condições do local de coleta. O solo apresentou maior fertilidade, com maiores teores de matéria orgânica (4,8 dag kg<sup>-1</sup>), Mg (1,1 cmol<sub>c</sub>dm<sup>-3</sup>) e CTC efetiva (t = 4,1 cmol<sub>c</sub>dm<sup>-3</sup>). Nas proximidades dessa população havia restos culturais da cultura do milho, demonstrando que nesse local poderia ter ocorrido influência do colúvio advindo da área adjacente acima que recebeu adubação do solo. Boyle e Craker e Simón (1991) também verificaram que o crescimento da planta e o teor de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) foram significativamente superiores em plantas que receberam fertilizantes, quando comparados à testemunha.

Tabela 1 Teores de óleos essenciais (%) de folhas e inflorescências frescas de três acessos de *H. marruboides* coletados em municípios do Sul de Minas Gerais, Brasil. UFLA, Lavras, 2010

LOCAL COLETA	PARTE DA PLANTA	
	Folha	Inflorescência
Ribeirão Vermelho	0,02 bB	0,12 aA
Ijaci	0,05 bB	0,13 aA
Luminárias	0,14 aA	0,08 aA

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Azevedo et al. (2002) ao estudarem a variabilidade quimiotípica do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* do Cerrado Brasileiro observaram que partes aéreas de *H. suaveolens* secas ao ar oriundas de nove populações, em estágio de frutificação, apresentaram um rendimento médio do óleo essencial de 0,41% (p/p). Nos acessos de *H. marruboides* do presente estudo observou-se teor médio de 0,07% de óleo essencial extraído das folhas. Já nas inflorescências, o

teor médio foi de 0,11% (Tabela 1). Comparando os teores de óleo essencial das folhas e flores entre cada localidade observou-se que os teores das inflorescências são maiores que nas folhas nas plantas oriundas de Ribeirão Vermelho e Ijací. Em Luminárias, não houve diferença entre os teores de óleo das folhas e inflorescências (Tabela 1).

Estudos com populações de plantas aromáticas e medicinais relacionados ao teor e a composição química e a área de ocorrência têm demonstrado a existência de variação genética entre plantas de diferentes populações (BLANK et al., 2004; CASTRO et al., 2004; TAVARES et al., 2005; VIEIRA; SIMON, 2000).

Estudos de variabilidade química entre diferentes populações naturais de plantas medicinais e aromáticas são importantes para seleção de espécies altamente produtoras de metabólitos secundários ou que produza um metabólito de interesse em maiores quantidades. Esses estudos também são fundamentais para a determinação da atividade biológica de um produto natural e para o desenvolvimento de produtos comerciais. De acordo com Silva (2003) os estudos da variabilidade genética existentes, vinculados aos estudos fitoquímicos para identificação de compostos secundários com ação terapêutica e sua implicação na conservação, ainda são incipientes.

Através de um estudo de diferentes acessos de *H. marruboides* podem ser selecionadas populações com alto teor de óleo essencial, o que pode ser atribuído à variação genética entre as populações, ao ambiente ou a interação genótipo x ambiente. Botrel et al. (2009) identificaram diferenças quantitativas na composição química do óleo essencial de inflorescências de *H. marruboides*, onde os componentes  $\alpha$ -tujona e  $\beta$ -tujona apresentaram a maior porcentagem de área dos picos nas inflorescências roxas, 41 e 15,9%, respectivamente. As porcentagens nas inflorescências roxas chegaram a ser até nove vezes maiores, comparadas às inflorescências brancas.

Os resultados das análises qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais analisados estão representados na Tabela 2 na ordem de eluição em coluna CBP-5. No total, 31 constituintes voláteis foram identificados numa faixa entre 93,31% a 99,79%. Apenas as amostras de inflorescências de Ijací (I-i, 56,26%) e de Ribeirão Vermelho (R-i, 57,36%) apresentaram teores de monoterpenos oxigenados superiores aos sesquiterpenos oxigenados. As amostras de inflorescências de Luminárias (L-i) e das folhas de Ribeirão Vermelho (R-f) tiveram um conteúdo mais expressivo de sesquiterpenos totais, 61,27% e 66,21%, respectivamente. De acordo com Sales et al. (2007), sesquiterpenos oxigenados (52,9-93,2%) são a principal classe de constituintes químicos do óleo essencial de caules e folhas de populações de *H. marruboides* provenientes de Lavras e Tiradentes-MG. Resultados contrários foram observados neste trabalho, onde todos os acessos e partes da planta apresentaram menores teores de sesquiterpenos oxigenados (11,35-42,82%), exceto para folhas coletadas no município de Ribeirão Vermelho (Tabela 2).

Tabela 2 Composição química e porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos correspondentes aos constituintes identificados nos óleos essenciais de folhas e inflorescências de *H. marrubioides* coletadas nas três localidades do Sul de Minas Gerais

Constituinte	IR <sup>a</sup>	Área (%)						
		Ijaci		Liminárias		Ribeirão Vermelho		
		Folhas	Inflor.	Folhas	Inflor.	Folhas	Inflor.	
1	3-Octanol	992	0,45	0,30	0,35	0,10	0,10	0,21
2	<i>cis</i> -Hidrato de sanineno	1064	0,10	0,43	0,10	0,10	0,10	0,41
3	<i>trans</i> - Hidrato de sanineno	1098	0,93	0,74	0,10	0,10	0,63	0,89
4	$\alpha$ -Tujona	1104	8,71	17,57	16,42	7,11	6,72	19,30
5	$\beta$ -Tujanol	1115	20,19	24,20	19,07	15,58	8,40	23,35
6	<i>iso</i> -3-Tujanol	1132	2,58	0,80	0,72	2,34	2,10	0,51
7	<i>trans</i> -Sabinol	1137	0,10	0,79	0,82	-	-	0,85
8	<i>trans</i> -Verbenol	1142	1,22	1,80	1,55	0,79	1,29	1,88
9	<i>neiso</i> -3-Tujanol	1147	0,10	0,61	0,58	-	0,10	0,78
10	<i>cis</i> -Pinocanfona	1170	4,77	5,55	5,35	3,82	2,68	5,71
11	Terpinen-4-ol	1174	1,56	2,09	2,05	1,13	0,80	1,80
12	$\alpha$ -Terpineol	1188	2,06	1,68	1,14	1,07	1,75	1,88
13	$\alpha$ -Copaeno	1374	9,25	6,51	6,69	7,26	4,43	5,37
14	$\beta$ -Bourboneno	1383	2,30	0,54	0,77	2,26	0,10	0,39
15	$\beta$ -Cariofileno	1418	9,35	11,49	10,43	9,26	7,24	11,08
16	$\alpha$ -Humuleno	1452	0,85	0,99	1,01	0,91	0,60	0,86
17	(E)- $\beta$ -Farneseno	1454	0,10	0,10	-	-	0,10	0,33
18	$\gamma$ -Muuroleno	1480	8,57	9,24	12,02	9,03	6,73	11,47
19	$\gamma$ -Cadineno	1513	1,53	0,82	0,79	1,37	2,28	0,67
20	$\delta$ -Cadineno	1521	0,92	0,79	0,86	1,10	0,96	0,54
21	Desconhecido	1539	0,72	0,12	0,44	0,61	0,95	0,37
22	<i>cis</i> -Muurool-5-em-4 $\beta$ -ol	1555	0,64	0,47	5,01	7,56	6,41	1,84

“continua”

Tabela 2 “conclusão”

Constituinte	IR <sup>a</sup>	Área (%)						
		Ijaci		Liminárias		Ribeirão Vermelho		
		Folhas	Inflor.	Folhas	Inflor.	Folhas	Inflor.	
23	$\beta$ -Nerolidol	1573	0,10	0,61	0,62	0,59	0,71	0,38
24	Espatulenol	1576	0,74	0,62	0,51	1,09	2,51	0,53
25	Óxido de cariofileno	1581	4,44	3,04	2,98	6,15	10,59	2,40
26	10- <i>epi</i> -g-Eudesmol	1618	-	0,10	0,10	0,10	0,10	0,39
27	Cariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\alpha$ -ol	1631	0,97	0,75	0,69	1,11	2,10	0,49
28	Cariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol	1635	2,66	2,54	2,54	3,51	5,72	1,57
29	$\beta$ -Eudesmol	1649	0,10	0,46	0,47	0,87	2,11	0,53
30	$\alpha$ -Cadinol	1652	1,20	0,52	0,53	1,50	0,82	0,41
31	Germacra-4(15,5,10(14)-trien-1 $\alpha$ -ol	1685	6,73	3,23	3,57	6,99	11,75	2,81
	Monoterpenos oxigenados		42,32	56,26	47,90	32,04	24,57	57,36
	Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		33,59	30,60	33,01	31,80	23,39	31,08
	Sesquiterpenos oxigenados		17,58	12,34	17,02	29,47	42,82	11,35
	Sesquiterpenos totais		51,17	42,94	50,03	61,27	66,21	42,43
	<b>Total identificado</b>		<b>93,49</b>	<b>99,20</b>	<b>97,93</b>	<b>93,31</b>	<b>90,78</b>	<b>99,79</b>

<sup>a</sup> Índice de retenção relativo a série de *n*-alcanos (C8-C32) em coluna CBP-5.

Foram observadas variações nos teores dos constituintes químicos dos óleos das inflorescências e folhas das três localidades (Tabela 2). A faixa de teores observados para os constituintes majoritários do óleo demonstraram grandes diferenças entre as amostras. Os principais constituintes foram a  $\alpha$ -tujona (6,72-19,3%), a  $\beta$ -tujona (8,40-24,20%), a *cis*-pinocanfona (2,68-5,71%),  $\alpha$ -copaeno (4,43-9,25%),  $\beta$ -cariofileno (7,24-11,49%) e o  $\gamma$ -muuroleno (6,73-12,02%). Os teores de  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona do presente trabalho foram bastante distintos dos observados por Botrel et al. (2009) que determinaram 41,0% de  $\alpha$ -tujona e 15,9% de  $\beta$ -tujona em inflorescências de genótipo roxo de plantas *H. marruboides* cultivadas em campo experimental em Lavras-MG (Brasil).

A diferença mais marcante entre os teores dos constituintes do óleo foi observada nas amostras das R-f que apresentaram os menores teores de  $\alpha$ -tujona (6,72%),  $\beta$ -tujona (8,40%), *cis*-pinocanfona (2,68%),  $\alpha$ -copaeno (4,43%),  $\beta$ -cariofileno (7,24%) e  $\gamma$ -muuroleno (6,73%) e os maiores de  $\gamma$ -cadineno (2,28%), espatulenol (2,51%), óxido de cariofileno (10,59%), cariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\alpha$ -ol (2,10%), cariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol (5,72%),  $\beta$ -eudesmol (2,11%) e germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\alpha$ -ol (11,75%) (Tabela 2). A análise de PCA confirma a expressiva distinção dessa amostra em relação às demais, pois ela forma uma amostra isolada das demais (Figura 1).

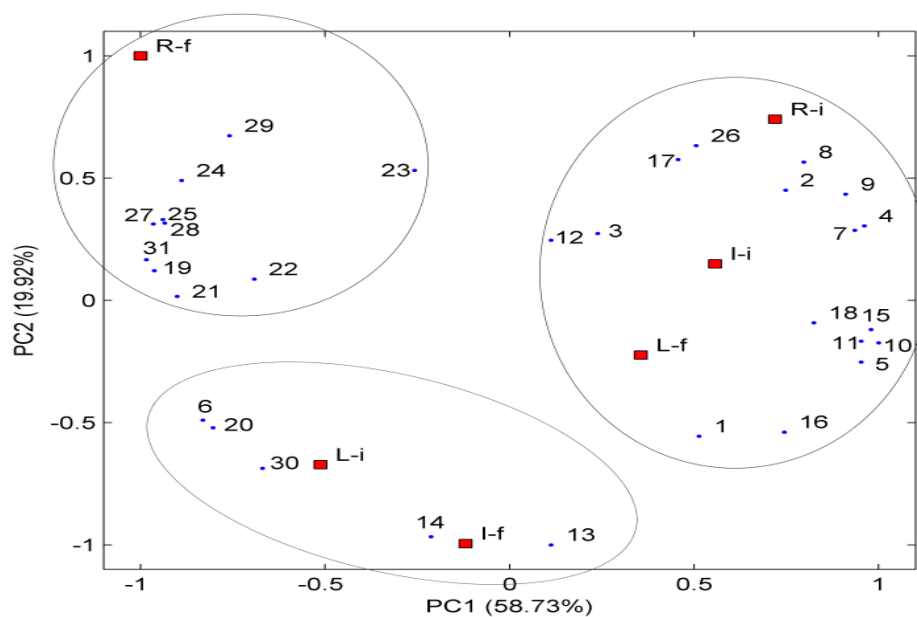


Figura 1 Dispersão gráfica gerada a partir dos escores dos componentes (CP) 1 e 2, na análise de componentes principais para os óleos essenciais extraídos de inflorescências e folhas de *H. marruboides* coletadas em 3 localidades. **R**: Ribeirão Vermelho; **L**: Luminárias; **I**: Ijaci; **f**: folhas; **i**: inflorescências. A numeração da PCA segue a Tabela 2

Os principais constituintes químicos encontrados por Sales et al. (2007) em *H. marruboides*, ao estudarem a variabilidade química presente no óleo essencial dessa espécie em duas localidades da região do Cerrado Brasileiro (Lavras e Tiradentes, MG) foram cariofila-4(14),8(15)-dien-5 $\beta$ -ol, eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol, óxido de cariofileno e  $\beta$ -cariofileno. Esses resultados diferem dos encontrados neste trabalho, onde os monoterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona apresentaram maiores percentagens no óleo essencial, variando de 6,72 a 24,20%. No estudo realizado por Sales et al. (2007), as percentagens de  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona variaram de 0,4 a 1,8%. Comparando estes locais de coleta com os estudados neste trabalho, pode-se sugerir que existem fatores ambientais ou genéticos influenciando a composição química.

Comparando as amostras de I-i, R-i e Luminárias folhas (L-f), os óleos de I-i e R-i apresentaram os maiores teores de  $\alpha$ -tujona (17,57% e 19,30%, respectivamente) e de  $\beta$ -cariofileno (11,49% e 11,08%, respectivamente). Pela análise de PCA também pode-se observar a distinção das amostras L-i e I-f das I-i, R-i e L-f (Figura 1).

Corroborando com os dados apresentados acima, o gráfico de escores demonstra a separação de três grupos contrastantes (Figura 1). A análise de PCA indicou uma variância cumulativa de 78,65%, sendo que a primeira componente principal explica 58,73% e a segunda 19,92%.

Apesar do número populacional analisado, ser bastante reduzido e da amostragem ter sido tomada de localidades muito próximas, pôde-se notar que há um grande polimorfismo químico entre as amostras de óleos essenciais. Curiosamente, óleos essenciais extraídos de folhas de uma localidade apresentaram uma composição química qualitativa e quantitativa similar a de óleos extraídos de inflorescências de outra localidade. Como exemplo disso, a análise de agrupamento hierárquico interligou as amostras L-i com I-f e I-i com L-f, conforme demonstra o dendrograma da Figura 2. Os resultados da HCA corroboram integralmente com as análises de PCA, pois também indicaram o isolamento de R-f e a maior proximidade entre o grupo L-i e I-f e o grupo R-i, L-f e I-i.

Resultados obtidos por Azevedo et al. (2002) mostraram algumas importantes diferenças entre populações de *Hyptis suaveolens* do Cerrado Brasileiro, indicando a existência de polimorfismo químico. Três principais tipos de óleos essenciais de indivíduos de *H. suaveolens* foram encontrados: Grupo I (22,2% das amostras) foi caracterizado pela presença de  $\alpha$ -bulneseno (0,13%); Grupo II (33,3% das amostras) teve  $\beta$ -bourboneno (4,58%) como composto majoritário; e Grupo III (44,5% das amostras) mostrou porcentagens significativas de 1,8-cineol (20,90%) e sabineno (11,98%).

A identificação de polimorfismo químico também foi observada por Sales et al. (2007) ao estudarem a composição e variabilidade química do óleo essencial de *H. marruboides* em duas localidades da região do Cerrado Brasileiro (Lavras e Tiradentes, MG). Três principais tipos de óleos essenciais foram encontrados: agrupamento I (folhas frescas e caules frescos ou secos de Lavras) caracterizados por alta porcentagem de cariofila-4(14),8(15)-dien-5 $\beta$ -ol (16,7%) e eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol (12,8%); agrupamento II (folhas secas e caules de Tiradentes) com *epi*-longipinanol (16,2%) como principal constituinte; e agrupamento III (folhas secas de Lavras) contendo alto teor de ( $\beta$ )-cariofileno (17,4%) e  $\alpha$ -copaeno (10,1%).

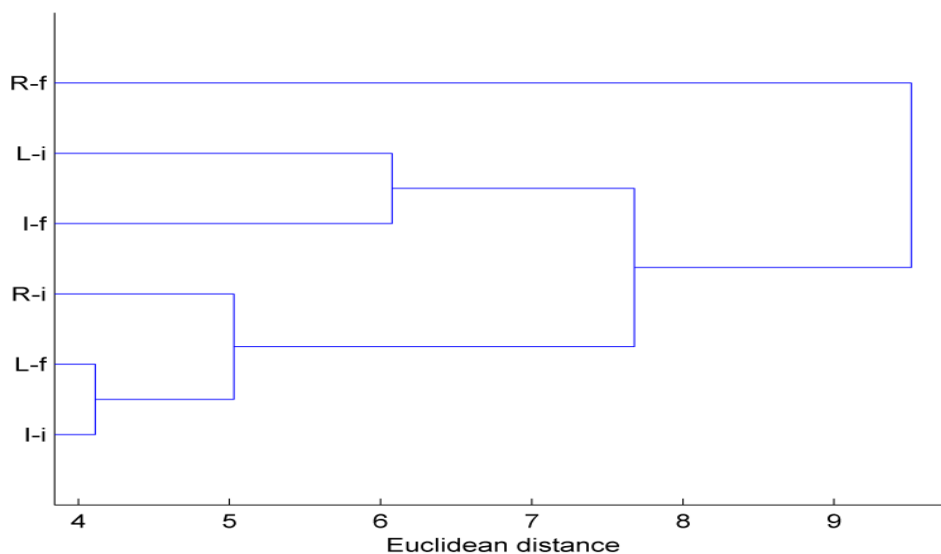


Figura 2 Dendrograma do padrão de similaridade estabelecido pela análise de agrupamento hierárquico, com base nas distâncias euclidianas médias, para os óleos essenciais extraídos de inflorescências e folhas de *H. marruboides* coletadas em 3 localidades. **R**: Ribeirão Vermelho; **L**: Luminárias; **I**: Ijaci; **f**: folhas; **i**: inflorescências

Na Tabela 3, visando melhor visualização das alterações na biossíntese dos compostos, pode-se observar o percentual normalizado dos constituintes químicos agrupados de acordo com o esqueleto carbônico dos terpenos presentes nos óleos essenciais nas três localidades e duas partes da planta de *H. marruboides*.

Tabela 3 Percentual normalizado dos constituintes químicos agrupados de acordo com o esqueleto carbônico dos terpenos presentes nos óleos essenciais de folhas e inflorescências de *H. marruboides* coletadas nas três localidades do Sul de Minas Gerais

Constituinte	Área (%)					
	Ijaci		Luminárias		Rib. Vermelho	
	Folhas	Inflor.	Folhas	Inflor.	Folhas	Inflor.
Tujona	35,26	45,56	38,78	27,22	20,09	46,37
Pineno	6,46	7,42	7,08	4,97	4,42	7,64
Mentano	3,90	3,81	3,27	2,37	2,84	3,70
Copaeno	9,97	6,57	6,86	7,83	4,93	5,40
Bourboneno	2,48	0,55	0,79	2,44	0,11	0,39
Cariofileno	18,78	17,99	17,07	21,61	28,55	15,63
Humuleno	0,92	1,00	1,04	0,98	0,67	0,87
Farneseno	0,22	0,72	0,64	0,64	0,90	0,71
Cadineno	13,86	11,95	19,70	22,18	19,15	15,02
Aromadendreno	0,80	0,63	0,52	1,18	2,79	0,53
Eudesmeno	0,11	0,57	0,58	1,05	2,46	0,93
Germacreno	7,25	3,26	3,66	7,54	13,08	2,83
<b>Total</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

Observa-se que 46,37% dos constituintes químicos do óleo essencial extraído de inflorescências no município de Ribeirão Vermelho foram originados a partir do mentano resultando em esqueletos carbônicos do tipo tujano. E, 28,55% e 13,08 dos constituintes químicos do óleo essencial extraído de folhas de *H. marruboides* nesse acesso, foram originados a partir dos cátions humulil e germacril resultando em esqueletos carbônicos do tipo cariofilano e germacrano, respectivamente.

Os maiores percentuais normalizados nos diferentes acessos estudados foram obtidos com constituintes químicos resultantes em esqueletos carbônicos do tipo tujano.

#### 4 CONCLUSÕES

O maior teor de óleo essencial foi obtido de folhas de *H. marruboides* provenientes do município de Luminárias-MG (0,14%).

Os principais constituintes químicos identificados nos acessos foram a  $\alpha$ -tujona (6,72-19,3%), a  $\beta$ -tujona (8,40-24,20%), a *cis*-pinocanfona (2,68-5,71%),  $\alpha$ -copaeno (4,43-9,25%),  $\beta$ -cariofileno (7,24-11,49%) e o  $\gamma$ -muuroleno (6,73-12,02%).

Ressalta-se que mesmo sendo de localidades muito próximas, com base nas análises multivariadas foi possível concluir que há um grande polimorfismo químico entre as amostras dos óleos essenciais provenientes de folhas e inflorescências de *H. marruboides* das três populações de plantas estudadas. Porém, o número reduzido de indivíduos avaliados (três), bem como a realização de uma só análise química para cada indivíduo, não nos fornece dados estatisticamente suficientes para que se possa discutir a existência de quimiotipos na espécie.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001. 456 p.
- AMARAL JÚNIOR, A. T. **Análise multivariada e isoenzimática da divergência genética entre acessos de moranga (*Cucurbita maxima* Duchesne)**. 1994. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1994.
- APEL, M. A. **Óleos voláteis e espécies da subtribo Eugeniinae (Myrtaceae): composição química e atividades antimicrobiana e antiinflamatória**. 2001. 256 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- AZEVEDO, N. R. et al. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, p. 205–216, 2002.
- BLANK, A. F. et al. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 113-116, jan./mar. 2004.
- BASSO, F.; PISANTE M.; BASSO, B. Agronomical aspects of officinal plant cultivation. **Phytotherapy Research**, London, v. 12, p. 131-134, 1998.
- BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae) em diferentes genótipos. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 1, n. 2, p. 164-469, 2009.
- BOYLE, T. H.; CRACKER, L. E.; SIMÓN, J. E. Growing medium and fertilization regime influence growth and essential oil content of rosemary. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 1, p. 33-34, 1991.
- CASTRO, H. G. et al. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 1931.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.

CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. 1990. 188 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1990.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 1997. 390 f.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 1997. 390 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro, 1997. 212p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In... REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

KUHNT, T. M. et al. Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, p. 227-232, 1995.

MATOS, G. D. et al. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 6, p. 38-50, ago./set. 2003.

MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Evangraf, 2006. 285 p.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version of the NIST/EPA/NIH mass spectral database**: software. Gaithersburg, 1998.

NUNES, C. A. **Abordagem quimiométrica da oxidação de glicerol sobre nanopartículas de ouro suportadas**. 2011. 104 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PEREIRA, A. V.; VENCOVSKY, R.; CRUZ, C. D. Selection of botanical and agronomical descriptors for the characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasm. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 1, p. 115-124, 1992.

PRICE, S.; PRICE, L. **Aromaterapy for health professionals**. New York: Churchill Livingstone, 1999.

SALES, J. F. et al. Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marruboides* Epl. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, p. 552-556, 2007.

SHARMA, S. et al. Stability of essential oil yield and quality characters in Japanese mint (*Mentha arvensis* L.) under varied environmental conditions. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 4, p. 411-416, 1992.

SILVA, M. A. S. **Variabilidade genética e fitoquímica de *Casearia sylvestris* Sw. em populações do cerrado e mata atlântica do estado de São Paulo**. 2003. 155 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

TAVARES, E. S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 1-5, jan./mar. 2005.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 463-71, 1963.

VIEIRA, R. F.; SIMON, J. E. Chemical characterization of basil (*Ocimum spp.*) germplasm used in the markets and in the traditional medicine. **Economic Botany**, New York, v. 54, n. 2, p. 207-216, 2000.

**CAPÍTULO 4** Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* EPL. E DA SUBSTÂNCIA  $\alpha + \beta$  tujona sobre *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

## RESUMO

Espécies de plantas medicinais têm sido estudadas na tentativa de descobrir novas moléculas inseticidas. Objetivou-se realizar a caracterização química e avaliar a atividade inseticida do óleo essencial de *Hyptis marruboides* e de uma mistura isomérica comercial de  $\alpha$ + $\beta$ -tujona sobre *Atta sexdens rubropilosa*. Os constituintes majoritários presentes no óleo essencial foram:  $\beta$ -tujona (40,8%),  $\alpha$ -tujona (16,1%) e sabineno (15,9%), seguidos pelos constituintes 10S,11S-himachala-3(12),4-dieno (4,4%), *cis*-pinocanfona (4,0%) e  $\beta$ -cariofileno (3,9%). A aplicação tópica do óleo essencial das inflorescências de *H. marruboides* na dose de 28,5% de  $\alpha$  +  $\beta$ -tujona indicou efetiva toxicidade em formigas cortadeiras. A atividade tóxica do óleo essencial foi cerca de 40% maior que a da mistura isomérica. Essa dose de  $\alpha$  +  $\beta$ -tujona do óleo apresenta uma  $TL_{50}$  estimada de 3,06 dias. O componente majoritário presente no óleo essencial é a  $\beta$ -tujona, o qual parece ser a substância responsável pela morte de 90% das formigas após 144 h da aplicação.

Palavras-chave: Planta medicinal. Inseticida natural. *Atta* spp.

## ABSTRACT

Species of medicinal plants have been studied in the effort of discovering new insecticidal molecules. It was aimed to perform the chemical characterization and evaluate the insecticidal activity of the essential oil *Hyptis marrubioides* and of a commercial isomeric mixture  $\alpha$ + $\beta$ -thujone on *Atta sexdens rubropilosa*. The major constituents present in the essential oil were  $\beta$ -thujone (40.8%),  $\alpha$ -thujone (16.1%) and sabinene (15.9%), followed by the constituents 10S.11S-himachala-3(12), 4-dieno (4.4%), *cis*-pinocamphone (4.0%) and  $\beta$ -caryophyllene (3.9%). The topical application of the essential oil *H. marrubioides* inflorescences at the dose of 28.5% of  $\alpha$  +  $\beta$ -thujone indicated effective toxicity in cutter ants. The toxic activity of the essential oil was about 40% high than isomeric mixture. This dose  $\alpha$  +  $\beta$ -thujone oil had a TL<sub>50</sub> estimated of 3.06 days. The major constituent present in the essential oil is a  $\beta$ -thujone, which seems to be the substance responsible for the 90% ants death after 144 h from the application.

Keywords: Medicinal plant. Natural insecticide. *Atta* spp.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais de origem vegetal com ação tóxica às formigas cortadeiras e/ou ao fungo simbionte é uma perspectiva na busca de um método eficaz de controle dessa praga. No Brasil, a utilização de formas alternativas de controle de pragas vem crescendo em substituição aos inseticidas altamente tóxicos ao homem e ao meio ambiente (FERNANDES et al., 2006), mas ainda em pequenas proporções.

Plantas aromáticas e seus óleos essenciais têm sido estudados como agentes antimicrobianos, fungicidas, inseticidas e repelentes de insetos e conservação de produtos estocados (BAKKALI et al., 2008; DORMAN; DEANS, 2000; ISMAN; MACHIAL, 2006). Os óleos essenciais constituem-se numa alternativa aos pesticidas sintéticos, pois não apresentam efeitos adversos para o meio ambiente (ISMAN, 2000; ISMAN; MACHIAL, 2006). Por isso, um dos maiores interesses dos óleos essenciais, na última década, primeiramente se deve a sua atividade fumigante e inseticida de contato e pela sua menor exigência de mecanismos de aprovação regulatória para sua exploração, devido sua longa história de uso (ISMAN, 2006). Pesquisas desenvolvidas com óleos essenciais confirmaram seus potenciais no controle de diversos fitopatógenos e pragas que afetam a produção agrícola (BALBI-PEÑA et al., 2006; BATISH et al., 2008; ISMAN, 2006; VIGO-SCHULTZ et al., 2006).

*Hyptis marrubioides* Epl. é uma espécie pertencente à família *Lamiaceae*, conhecida popularmente como hortelã-do-campo. O gênero *Hyptis* apresenta uma grande diversidade morfológica, principalmente na região do Cerrado Brasileiro, com cerca de 300 a 400 espécies (HARLEY, 1988).

Vários estudos têm confirmado atividades biológicas importantes relacionadas ao gênero *Hyptis*, tais como atividades antifúngica (OLIVEIRA et

al., 2004), antibacteriana (SOUZA et al., 2003), larvicida (COSTA et al., 2005) e inseticida (ARAÚJO et al., 2003).

O óleo essencial de *H. marrubioides* é constituído majoritariamente pelos monoterpenos isoméricos  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona (BOTREL et al., 2009).

Investigações sobre atividades biológicas dos isômeros  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona têm sido conduzidas no Instituto Europeu de Saúde (EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2002). A tujona, composta por uma mistura isomérica está banida como aditivo alimentar nos Estados Unidos e sua presença em alimentos e bebidas é regulamentada em vários países (na União Europeia o limite é de 10 mg L<sup>-1</sup>). Deve ser enfatizado que as restrições ao uso de plantas que contêm tujona e derivados deve-se principalmente ao isômero- $\alpha$  (PRESTI et al., 2007).

As formigas cortadeiras [*Atta sexdens rubropilosa* (Forel)] pertencem à ordem Hymenoptera, família Formicidae. São insetos que causam grandes prejuízos às plantações, pois geralmente a infestação de uma área é caracterizada por um elevado número de colônias de controle difícil e oneroso para o agricultor (RIBEIRO, 2002).

Almeida et al. (2007) avaliaram a toxicidade de extratos, frações e substâncias puras de *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) para operárias de *Atta sexdens* L. e para o seu fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. Os resultados mostraram que dentre as seis substâncias isoladas de *H. puberula*, três delas foram concomitantemente tóxicas para as saúvas e para o fungo, mostrando que constituintes químicos de origem natural são uma fonte promissora de novas substâncias para o controle de formigas cortadeiras.

Objetivou-se realizar a caracterização química e avaliar a atividade inseticida do óleo essencial de *H. marrubioides* e de uma mistura isomérica comercial de  $\alpha$ + $\beta$ -tujona sobre *Atta sexdens rubropilosa* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Extração do óleo essencial

Inflorescências de plantas de *H. marrubioides* com idade de 270 dias, cultivadas em casa de vegetação foram coletadas em fevereiro de 2011. A exsicata da espécie está depositada no herbário localizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, sob registro ESAL 13955.

As inflorescências foram coletadas na parte mediana de ramos floridos de 20 vasos às 8h. As inflorescências frescas foram pesadas em balança analítica (240 g) e, posteriormente, hidrodestiladas em aparelho de Clevenger por 60 min. Foram utilizadas quatro repetições, cada uma oriunda de amostra composta de 60 g de massa fresca. O óleo essencial foi purificado por partição líquido-líquido em funil de separação, realizando-se três lavagens do hidrolato com três porções de 20 mL de diclorometano. As frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de magnésio anidro. O solvente foi evaporado à temperatura ambiente, sob capela de exaustão de gases. O óleo isolado foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama de hidrogênio (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

### 2.2 Substâncias de referência

Foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) uma mistura isomérica de referência de  $\alpha + \beta$ -tujona. Conforme as especificações do produto a mistura apresenta 82,5% de pureza determinada por porcentagem de área relativa por CG, contendo  $\sim 70\%$  de  $\alpha$ -tujona e  $\sim 10\%$  de  $\beta$ -tujona. Solução de referência de *n*-alcanos, C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>, também foi adquirida da mesma companhia.

### 2.3 Análises cromatográficas

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. O óleo essencial foi analisado por CG-DIC e CG-EM. Para as análises de CG-DIC empregou-se um sistema Agilent® 7890A equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220°C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, isotérmico por 1,5 min, seguido por uma rampa de temperatura de 3° C/min até 240 °C, seguida de uma rampa de 10°C/min até 270°C. O óleo foi diluído em acetato de etila (1%, v/v) e injetado automaticamente no cromatógrafo empregando volume de injeção de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50.

Nas análises de CG-EM utilizou-se um sistema Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® 5975C, operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com um intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z*. As condições cromatográficas foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC. Cada constituinte foi identificado por comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007); por comparação dos índices de retenção relativos com índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; BOTREL et al., 2009; DAVIES, 1990); e por coinjeção de substância de referência de  $\alpha + \beta$ -tujona. Os índices de retenção (IR) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>), injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras. A concentração dos constituintes foi calculada por meio da área

integral de seus respectivos picos, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra, obtida pela análise utilizando cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (FID).

#### 2.4 Atividade formicida

O experimento foi conduzido no Laboratório de Seletividade do Departamento de Entomologia da UFLA.

As formigas cortadeiras foram coletadas no interior de um eucaliptal isento de contaminação química situado no Campus da UFLA. Para a realização dos bioensaios, as formigas operárias foram acomodadas em placas de Petri e mantidas em câmara climática com temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12h. Foram utilizadas placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel-filtro, contendo 10 formigas que receberam dieta artificial constituída de 5 g de glicose; 0,1 g de lêvedo de cerveja; 1,5 g de ágar e 1 g de peptona bacteriológica dissolvidos em 100 mL de água destilada. A cada 2 dias, foi feita a troca da dieta para evitar contaminação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, em esquema fatorial ( $2 \times 5$ ), sendo duas fontes de  $\alpha + \beta$ -tujona: o óleo essencial de inflorescências de *H. marrubioides* e a mistura isomérica de referência de  $\alpha + \beta$ -tujona.

Soluções do óleo essencial e da mistura isomérica empregando como veículo, óleo vegetal de soja, foram preparadas nas concentrações de 7,1; 14,2; 21,2 e 28,5%. Essas concentrações foram determinadas a partir de ensaios preliminares realizados por Botrel (2009) e estão expressas em termos dos teores de  $\alpha + \beta$ -tujona nas duas fontes.

O volume de 1,0  $\mu\text{L}$  das misturas foi aplicado no dorso das formigas com auxílio de uma microseringa, sendo que no tratamento controle (ausência

total de óleo essencial ou mistura isomérica), aplicou-se apenas o óleo vegetal de soja. Para facilitar a manipulação das formigas durante a aplicação dos tratamentos, as mesmas foram desmaiadas por meio de CO<sub>2</sub> por cerca de 30 segundos.

## 2.5 Análises estatísticas

A mortalidade das formigas foi registrada a cada 24 h, contando-se o número de formigas mortas em cada placa, por um período de 6 dias. Após esse período, calcularam-se os tempos letais 50% (TL50) para cada grupo formado através da análise de sobrevivência utilizando o pacote "*survival*" do R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Após a seleção do modelo matemático mais adequado por meio da análise de resíduos, realizou-se a análise de contraste para verificar a semelhança entre os produtos testados e foi realizada a formação de grupos congêneres.

A evolução da mortalidade das formigas foi determinada pelo cálculo da área abaixo da curva de progressão da mortalidade de formigas (AACPMF) segundo a seguinte fórmula modificada de Campbell & Madden (1990): AACPMF =  $\sum \{[(\text{mortalidade atual} + \text{mortalidade anterior})/2] * \text{intervalo entre avaliações}\}$ . Após análise estatística pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2000) realizou-se o teste de média de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização química do óleo essencial

A análise cromatográfica detectou a presença de 35 componentes no óleo essencial das inflorescências de *H. marruboides*. Dentre os principais constituintes destacaram-se além da  $\alpha$ -tujona (16,1%) e  $\beta$ -tujona (40,8%), a predominância de sabineno (15,9%), 10S,11S-himachala-3(12),4-dieno (4,4%), *cis*-pinocanfona (4,0%) e  $\beta$ -cariofileno (3,9%) (Tabela 1).

O teor de  $\alpha$  +  $\beta$ -tujona no óleo essencial das inflorescências de *H. marruboides* correspondeu a um total de 56,9%. Esse teor é idêntico a somatória dos teores de  $\alpha$  +  $\beta$ -tujona encontrados por Botrel et al. (2009) em análises do óleo essencial das inflorescências do genótipo roxo de *H. marruboides*, que quantificaram 41,0% de  $\alpha$ -tujona e 15,9% de  $\beta$ -tujona.

A classe dos monoterpênicos oxigenados (65%) foi dominante no óleo essencial das inflorescências de *H. marruboides* (Tabela 1), diferente da composição química do óleo essencial do caule e das folhas dessa espécie vegetal analisados por Sales et al. (2007), que constataram que o óleo constituiu-se, predominantemente, por constituintes químicos da classe dos sesquiterpênicos oxigenados (52,9- 93,2%).

Tabela 1 Composição química e porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos correspondentes aos constituintes identificados no óleo essencial das inflorescências de *Hyptis marrubioides*

Pico	Constituinte	IR <sup>a</sup>	Área do pico (%)	Método de indentificação
1	$\alpha$ -tujeno	931	0,2	c,d
2	$\alpha$ -pineno	938	0,3	c,e
3	tuja-2,4-(10)-diene	959	0,1	c,e
4	<b>sanineno</b>	975	<b>15,9</b>	c,e
5	$\beta$ -pineno	978	1,5	c,e
6	$\alpha$ -terpineno	1013	0,3	c,e
7	$\beta$ -tujeno	1024	0,5	c
8	1,8-cineol	1027	1,0	c
9	g-terpineno	1054	0,4	c,e
10	hidrato de trans-sabineno	1063	0,3	d
11	terpinoleno	1084	0,1	c,e
12	hidrato de cis-sabineno	1095	0,2	d
13	n.i. (m/z=136)	1097	0,2	-
14	<b><math>\alpha</math>-tujona</b>	1102	<b>16,1</b>	c,e,g
15	<b><math>\beta</math>-tujona</b>	1114	<b>40,8</b>	c,e,g
16	iso-3-tujonol	1134	0,3	c,f
17	trans-pinocarveol	1139	0,2	c,e
18	3-tujen-2-ol	1141	0,2	c
19	cis-pinen-3-ol	1145	0,6	c
20	trans-pinocanfona	1162	0,1	c,e
21	cis-pinocanfona	1177	4,0	-
22	n.i. (m/z=154)	1181	0,9	c,e
23	$\alpha$ -terpineol	1196	0,6	c,d
24	$\alpha$ -ylamgeno	1371	0,2	c,e
25	$\alpha$ -copaeno	1399	2,3	c,d

“continua”

Tabela 1 “conclusão”

Pico	Constituinte	IR <sup>a</sup>	Área do pico (%)	Método de indentificação
26	β-bourboneno	1409	0,2	c,d
27	β-cariofileno	1433	3,9	c,d
28	α-humuleno	1469	0,3	c,d
29	10S,11S-himachala-3(12),4-dieno	1510	4,4	c,e
30	n.i. (m/z=207)	1512	1,5	c
31	n.i. (m/z=154)	1534	0,1	-
32	d-cadineno	1545	0,1	-
33	n.i. (m/z=220)	1553	0,3	c
34	14-hidroxi-(Z)-cariofioleno	1612	0,7	c,e
35	n.i. (m/z=220)	1710	0,3	
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>			<b>19,7</b>	
<b>Monoterpenos oxigenados</b>			<b>65,0</b>	
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>			<b>12,0</b>	
<b>Não identificados</b>			<b>3,3</b>	
<b>TOTAL</b>			<b>100</b>	

<sup>a</sup>Índice de retenção relativo a série de *n*-alcanos (C8-C20) em coluna HP/MS-5. <sup>b</sup>Porcentagem de área relativa do pico cromatográfico obtido pelo detector de ionização de chama. <sup>c</sup>Identificação estabelecida com base na comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e Adams (2007). Índice de retenção relativo relatados por Davies et al. (1990)<sup>d</sup>; Adams (2007)<sup>e</sup> e Botrel et al. (2009)<sup>f</sup>. <sup>g</sup>Identificação realizada pela coinjeção de substância de referência. n.i.: não identificado

### 3.2 Atividade formicida

A toxicidade das diferentes doses do óleo essencial de inflorescências de *H. marruboides* para formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*) pode ser observada na Figura 1. A dose de 28,5% de óleo essencial proporcionou maior percentagem de mortalidade de formigas cortadeiras em todos os períodos avaliados, chegando a 90%, 144 h após a aplicação. Para as demais doses utilizadas do óleo essencial, a mortalidade não ultrapassou a 25%, durante o período avaliado (Figura 1).

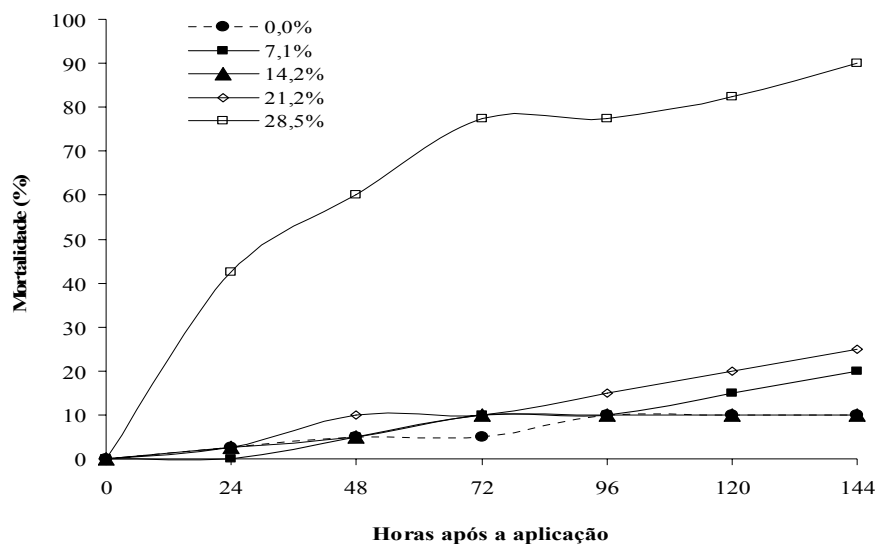


Figura 1 Mortalidade de formigas cortadeiras (%) expostas a diferentes doses de  $\alpha$  +  $\beta$ -tujona utilizando como fonte o óleo essencial de inflorescências de *H. marruboides*, durante 144 h após a aplicação

A tujona é um monoterpreno oxigenado que apresenta atividade neurotóxica em animais, podendo provocar crises epileptiformes ou tetaniformes e distúrbios sensoriais e psíquicos (LACHENMEIER, 2010; SIMÕES; SPITZER, 2003). Devido aos relatos na literatura sobre a toxicidade para essa

substância e, uma vez que o óleo essencial das inflorescências de *H. marruboides* apresentou altos teores de  $\alpha + \beta$ -tujona (Tabela 1) e demonstrou alta toxicidade para as formigas cortadeiras na dose de 28,5% (Figura 1), buscou-se esclarecer se a mortalidade provocada pelo óleo essencial seria devido à alta concentração de  $\alpha + \beta$ -tujona. Para isso, então avaliou-se a atividade formicida da mistura isomérica comercial de  $\alpha + \beta$ -tujona. Entretanto, na maior dose de  $\alpha + \beta$ -tujona obtida a partir da mistura isomérica (28,5%), observou-se apenas 50% de mortalidade das formigas, 144 h após a aplicação (Figura 2). Esse percentual de mortalidade corresponde a cerca de 40% menor que a porcentagem de mortalidade das formigas observada para o óleo essencial, no sexto dia de aplicação.

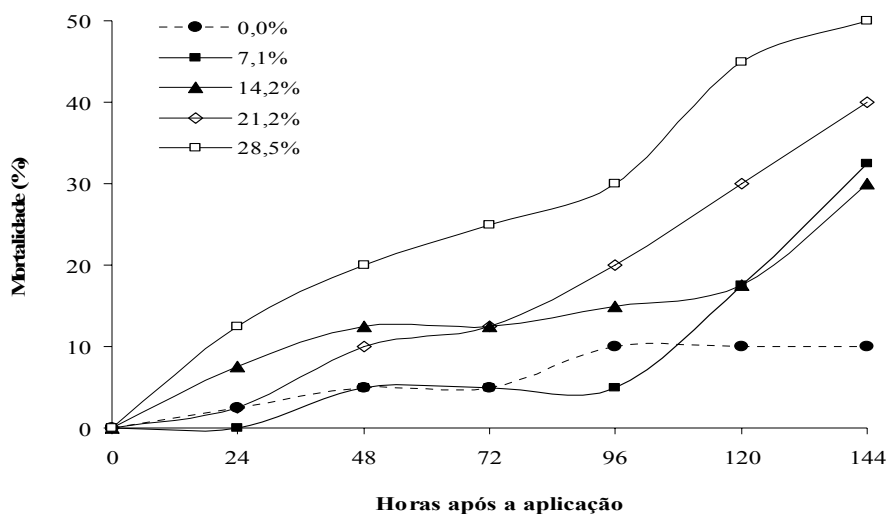


Figura 2 Mortalidade de formigas cortadeiras (%) expostas a diferentes doses de  $\alpha + \beta$ -tujona utilizando como fonte a mistura isomérica, durante 144 h após a aplicação

Ainda com relação a toxicidade da mistura isomérica observou-se que nos períodos de 120 e 144 h após a aplicação das doses de 7,1 e 14,2% não foram observadas diferenças significativas na mortalidade das formigas, que

apresentaram um valor de cerca de 30% de mortalidade (Figura 2). Empregando o óleo essencial como fonte de  $\alpha + \beta$  tujona, na dose de 7,1%, apenas 20% da população das formigas encontravam-se mortas (Figura 1).

Essas diferenças nas respostas tóxicas às formigas podem ser devido às distintas relações entre os teores de  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona do óleo essencial de *H. marruboides* e da mistura isomérica (Tabela 2). Observa-se pela Tabela 2 que há uma relação inversa entre os teores de  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona no óleo essencial e na mistura isomérica. O óleo essencial contém maiores teores de  $\beta$ -tujona, enquanto que a mistura isomérica contém maiores teores de  $\alpha$ -tujona. Pelas diferenças observadas na mortalidade das formigas,  $\beta$ -tujona parece ter maior grau de toxicidade que a  $\alpha$ -tujona.

Tabela 2 Doses totais e individuais de  $\alpha$ -tujona e  $\beta$ -tujona das soluções aplicadas nas formigas, conforme a fonte empregada

Doses de $\alpha + \beta$ -tujona (%)	Óleo essencial <sup>1</sup>		Mistura isomérica <sup>2</sup>	
	$\alpha$ -tujona (%)	$\beta$ -tujona (%)	$\alpha$ -tujona (%)	$\beta$ -tujona (%)
0	0	0	0	0
7,1	2,0	5,1	6,2	0,9
14,2	4,0	10,2	12,4	1,8
21,2	6,0	15,2	18,5	2,7
28,5	8,1	20,4	24,9	3,6

<sup>1</sup>Teor de  $\alpha$ -tujona=16,1% e de  $\beta$ -tujona=40,8%, expressos em área relativa por análises de CG-DIC (*vide* condições de análise no item material e métodos) <sup>2</sup>Teor de  $\alpha$ -tujona=70% e de  $\beta$ -tujona=10%, conforme especificações do fabricante (*vide* item ‘Substâncias de referência’ para maiores informações)

Após 48 h da aplicação das duas fontes de  $\alpha + \beta$  tujona observou-se que à medida que as doses de óleo essencial e da mistura isomérica foram aumentadas as formigas alimentavam-se com menor frequência e demonstravam certo grau de paralisia.

Na Tabela 3 apresentam-se os valores médios da área abaixo da curva de progressão da mortalidade de formigas (AACPMF) em função da aplicação das doses de  $\alpha + \beta$  tujona oriundas do óleo essencial de *H. marruboides* e da

mistura isomérica. Os resultados indicaram a ocorrência de diferenças significativas entre as fontes de  $\alpha + \beta$  tujona. A dose de 28,5% de ambas as fontes de  $\alpha + \beta$ -tujona foram superiores às demais. Entre as fontes de  $\alpha + \beta$ -tujona, foi possível confirmar a superioridade da atividade formicida do óleo essencial em relação a mistura isomérica ao utilizar a concentração de 28,5%.

Tabela 3 Área abaixo da curva de progressão da mortalidade de formigas (AACPMF) em função da aplicação de diferentes doses de  $\alpha + \beta$ -tujona utilizando como fonte o óleo essencial das inflorescências de *H. marruboides* e a mistura isomérica

$\alpha + \beta$ -tujona ----- % -----	Óleo essencial	Mistura isomérica
	----- AACPMF -----	
0,0	90 b A	90 b A
7,1	102 b A	117 b A
14,2	120 b A	192 b A
21,2	168 b A	228 b A
28,5	924 a A	378 a B

As médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os óleos essenciais são ricos em terpenoides que podem causar potencial de repelência às formigas da tribo Attini, conforme demonstrado por Marsaro Júnior et al. (2004). Esses autores observaram alterações de comportamento em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* quando as formigas foram expostas ao óleo essencial de *Eucalyptus maculata*. Além disso, os extratos hexânicos dessa espécie de eucalipto revelaram alguns terpenoides, especialmente o  $\beta$ -eudesmol, como os responsáveis pelas alterações de comportamento.

No presente trabalho observou-se que imediatamente após a aplicação do óleo essencial de *H. marruboides* e da mistura isomérica ocorreu um alto grau de excitação das formigas cortadeiras, sendo que nas doses máximas avaliadas, observaram-se mutilamentos entre as formigas. A tujona, constituinte majoritário do óleo essencial de inflorescências de *H. marruboides* é caracterizada por uma cetona monoterpênica que exhibe propriedades

neurotóxicas manifestadas por convulsões tônico-clônicas em animais e humanos (LACHENMEIER, 2010). Provavelmente, esse constituinte pode ter alguma influência na mortalidade das formigas cortadeiras, apesar da potencial ação sinérgica de outros constituintes do óleo essencial, tais como o  $\beta$ -cariofileno (3,9%). North, House e Ackson (2000) utilizando o cariofileno sintético impregnado em iscas atrativas e em fragmentos de papel-filtro em colônias de *Atta sexdens rubropilosa*, encontraram que essa substância provoca repelência, alarme, “*self-grooming*” (autolimpeza), comportamento agonístico (abertura de mandíbulas e posição de ataque) seguido de luta entre as operárias companheiras de ninho.

A menor  $TL_{50}$  (tempo necessário para matar 50% da população de formigas) foi de 3,06 dias, quando se aplicou no dorso das formigas 28,5% da mistura isomérica  $\alpha + \beta$ -tujona utilizando como fonte o óleo essencial de inflorescências de *H. marruboides* (Tabela 4). Ao aplicar a mesma dose de  $\alpha + \beta$ -tujona utilizando como fonte a mistura isomérica verificou-se uma  $TL_{50}$  maior (7,27 dias). Doses intermediárias de  $\alpha + \beta$ -tujona (7,1%; 14,2%; 21,2%) utilizando como fonte a mistura isomérica proporcionaram uma  $TL_{50}$  menor (10,02 dias) comparado à aplicação da mistura isomérica utilizando como fonte o óleo essencial (20,84 dias).

Tabela 4 Valores de  $TL_{50}$  (dias) de formigas cortadeiras que receberam diferentes doses de  $\alpha + \beta$ -tujona utilizando como fonte o óleo essencial das inflorescências de *H. marruboides* e a mistura isomérica, por um período de 144 h

$\alpha + \beta$ -tujona	Óleo essencial	Mistura isomérica
----- % -----	----- % -----	----- % -----
	----- $TL_{50}$ (dias) -----	
0,0	20,84 A	20,27 A
7,1	20,84 A	10,02 B
14,2	20,84 A	10,02 B
21,2	20,84 A	10,02 B
28,5	3,06 B	7,27 C

As médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e não diferem entre si pelo teste de contraste ao nível de 5% de probabilidade.

Cheng et al. (2008) ao estudarem a atividade inseticida do óleo essencial e da substância química *trans*-cinamaldeído presente em *Cinnamomum osmophloeum* verificaram que, tanto o óleo essencial quanto a substância química provocaram alta mortalidade em formiga de fogo (*Solenopsis invicta*) após um período de exposição de 80 min. em frascos fechados.

#### 4 CONCLUSÕES

A aplicação tópica do óleo essencial das inflorescências de *H. marrubioides* na dose de 28,5% de  $\alpha + \beta$ -tujona exibe uma efetiva toxicidade às formigas cortadeiras, com uma atividade tóxica cerca de 40% maior que a da mistura isomérica.

A dose de 28,5% de  $\alpha + \beta$ -tujona do óleo apresenta uma  $TL_{50}$  estimada de 3,06 dias.

O constituinte majoritário do óleo essencial é a  $\beta$ -tujona, o qual apresenta uma forte relação com a toxicidade observada nas formigas.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**, 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ALMEIDA, R. N. A. et al. Toxicity of Substances Isolated from *Heliecta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the Leaf-cutting Ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **Bio Assay**, Piracicaba, v. 2, p. 2-8, 2007.
- ARAÚJO, E. C. C. et al. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 3760-3762, 2003.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina: avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 310-314, 2006.
- BATISH, D. R. et al. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 256, p. 2166-2174, 2008.
- BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae) em diferentes genótipos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, p. 164-169, 2009.
- BOTREL, P. P. **Influência de genótipos, ambientes de cultivo e variação sazonal no teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epling e seu efeito sobre formigas saúva-limão**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- CHENG, S. S. et al. Termination red imported fire ants using *Cinnamomum osmophloeum* leaf essential oil. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 889-893, 2008.
- COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes*

*aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 304-309, dez. 2005.

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

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 308–316, 2000.

EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. **Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone**. (Expressed on 2 December 2002). Disponível em: < [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out162\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out162_en.pdf)>. Acesso em: 22 dez. 2011.

FERNANDES, J. M. et al. Efeito de soluções de origem vegetal na herbivoria de duas espécies de tanchagem (*Plantago major* L. e *Plantago lanceolata* L.). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 35-41, 2006.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

HARLEY, R. M. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relatives in Brasil. In: WORKSHOP ON NEOTROPICAL DISTRIBUTION PATTERNS, 1., 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 71-80.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Santa Cruz, v. 51, p. 45–66, 2006.

ISMAN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. In: RAI, M.; CARPINELLA, M. C. (Ed.). Naturally occurring bioactive compounds. **Advances in Phytomedicine**, Maharashtra, v. 3, p. 29–44, 2006.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop protection**, Guildford, v. 19, p. 603–608, 2000.

LACHENMEIER, D. W. Wormwood (*Artemisia absinthium* L.): a curious plant with both neurotoxic and neuroprotective properties? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 131, p. 224–227, 2010.

MARSARO JÚNIOR, A. L. et al. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, Heidelberg, v. 30, n. 9, p. 1771-1780, Sept. 2004.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH mass spectral library: software**. Gaithersburg, 2008.

NORTH, R. D.; HOUSE, P. E.; JACKSON, C. W. Agonistic behavior of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* elicited by caryophyllene. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2000.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, p. 756-759, 2004.

PRESTI, M. L. O. et al. Characterization of *Artemisia arborescens* L. (Asteraceae) leaf-derived essential oil from Southern Italy. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, p. 218-224, May/June 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Vienna, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 23 dez. 2011.

RIBEIRO, T. A. N. **Estudo químico-farmacológico das raízes de *Spiranthera Odoratissima* St. Hill**. 2002. 54 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2002.

SALES, J. F. et al. Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marrubioides* Epl. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, n. 6, p. 552-556, Nov./Dec. 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. p. 467-496.

SOUZA, L. K. H. et al. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 963-965, Oct. 2003.

VIGO-SCHULTZ, S. C. et al. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em couve-flor. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, p. 515-524, 2006.

**ANEXOS**

ANEXO 1A Atributos de fertilidade do solo nas profundidades de 0 a 20 cm, na fase de floração nos três acessos de *H. marruboides* localizados nos municípios Sul Mineiros de Ijaci, Luminárias e Ribeirão Vermelho. UFLA, Lavras – MG, 2010

<b>Atributo</b>	<b>Unidade</b>	<b>Ijaci</b>	<b>Luminárias</b>	<b>Ribeirão Vermelho</b>
pH (água, KCl e CaCl <sub>2</sub> )	-	5,6 AcM	6,0 AcM	6,3 AcF
P (Mehlich 1)	mg dm <sup>-3</sup>	10,7 M	2,0 MB	4,6 MB
K (Mehlich 1)	mg dm <sup>-3</sup>	90 Bo	133 MBo	147 MBo
Ca (KCl)	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	2,7 Bo	2,6 Bo	2,5 Bo
Mg (KCl)	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	0,4 B	1,1 Bo	0,7 M
Al (KCl)	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	0,2 MB	0,1 MB	0,1 MB
H + Al	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	5,0 M	3,6 M	1,7 B
SB	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	3,3 M	4,0 Bo	3,6 M
t	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	3,5 M	4,1 M	3,7 M
T	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	8,4 M	7,7 M	5,2 M
m	%	5,7 MB	2,4 MB	2,7 MB
V	%	39,8 B	52,8 M	68,3 Bo
Matéria orgânica	dag kg <sup>-1</sup>	3,8 M	4,8 Bo	1,6 B
P-rem	mg L <sup>-1</sup>	30,8	19,8	37,4
S-SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	9,4 B	5,4 B	6,7 B
B (água quente)	mg dm <sup>-3</sup>	0,1 MB	0,2 B	0,3 B
Zn (Mehlich 1)	mg dm <sup>-3</sup>	2,3 A	2,9 A	1,4 M
Fe (Mehlich 1)	mg dm <sup>-3</sup>	141,3 A	37,9 Bo	66,4 A
Mn (Mehlich 1)	mg dm <sup>-3</sup>	63,2 A	51,8 A	25,2 A
Cu (Mehlich 1)	mg dm <sup>-3</sup>	2,3 A	1,5 Bo	0,6 B
Argila	dag kg <sup>-1</sup>	38 TAr	36 TAr	24 TMe
Areia	dag kg <sup>-1</sup>	2,0	34,0	42,0
Silte	dag kg <sup>-1</sup>	60,0	30,0	34,0

AcM - Acidez média; AcF - Acidez fraca; MB - Muito baixo; B - Baixo; M - Médio; Bo - Bom; MBo - Muito bom; A - Alto; TAr - Textura argilosa; TMe - Textura média; t – CTC efetiva; T – CTC potencial; m – saturação por Al; V – saturação por bases

Fonte: (CFSEMG, 1999)