

## MICROPROPAGAÇÃO E EXTRAÇÃO DO OLEO DE *MENTHA X VILLOSA HUDSON*<sub>1</sub>

ANNIE ELISABETH SANTIAGO BELTRÃO-UFPB/LTF/SCT<sub>2</sub>, PAULO M. MARINHO-UFPE<sub>3</sub>, JOSE MARIA BARBOSA FILHO-UFPB<sub>4</sub>, FABIANA AUGUSTA SANTIAGO BELTRÃO -PPGZ/CCA/UFPB<sub>5</sub>

**RESUMO-** A *Mentha x villosa* Hudson , conhecida vulgarmente como hortelã da folha miúda tem diversas aplicações na medicina popular como antiparasitária, estomática, analgésica, entre outras. Com o objetivo de estabelecer um protocolo de micropropagação iniciou-se o seu cultivo *in vitro* a partir de explantes de folhas e fragmentos de caule, gemas apicais e laterais desinfestados com solução de hipoclorito de sódio a 10%, e cultivados em meio MS acrescido de diferentes reguladores de crescimento. Os melhores resultados foram obtidos em meio contendo AIB a 0.4 mg/L e de BAP a 4 mg/L. As plantas originadas de gemas apicais e axilares apresentaram melhores resultados com 0.4 mg/L de AIB associado a 0.6mg/L de BAP, levando a formação de vasto sistema radicular e bom crescimento da parte aérea.

Palavras-chaves: Cultura *in vitro*, citocinina, auxina

**ABSTRACT-***Mentha x villosa* Hudson, known vulgarly as mint of the small leaf has diverse applications in the medicine popular as antiparasitic, estomática, analgésica, among others. With the objective to establish a micropropagation protocol we initiate its culture *in vitro* from explants of leaves and fragment's of caule, apicais and lateral egg yolks disinfested with solution of hypochlorite of sodium 10%, and cultivated in half increased ms of different regulators of growth. the best ones resulted had been gotten in way contend AIB 0,4 mg/l and of BAP 4 mg/l. as apicais and originated axillary egg yolk plants had presented better resulted with 0.4 mg/l of AIB associated 0.6mg/l of BAP, leading the formation of vast system to radicular and good growth of the aerial part.

**Key-words:**Culture *in vitro*, citocinina, auxina

## 1. INTRODUÇÃO

A micropropagação é indiscutivelmente a aplicação de impacto para a cultura de tecidos vegetais, servindo a programas de introdução, armazenamento e intercâmbio de germoplasma contribuindo para prevenir perda de variabilidade genética (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Além de rápida multiplicação a micropropagação pode ser realizada durante o ano todo em grande quantidade sem problemas de sazonalidade (CROCOMO, 1989).

As plantas aromáticas ou medicinais, ou substâncias delas extraídas, têm sido continuamente usadas para conferir sabor ou modificá-las em alguns alimentos, como medicamentos, na cura de doenças, na composição de perfumes e em práticas religiosas.

Existe uma preocupação crescente na conservação destas plantas, porque ao longo do tempo foram multiplicadas sem a preocupação de preservar genes responsáveis por diversas características importantes.

Os óleos essenciais mais utilizados quase sempre são provenientes de espécies europeias ou asiáticas domesticadas. Mesmo assim nestes países ainda há estudos que visam identificar e preservar os recursos genéticos existentes dessas espécies e de espécies silvestres que possuam algum potencial para produzir óleo, e possam ser incluídas entre as espécies utilizadas na produção comercial. Nas regiões tropicais e subtropicais onde a diversidade vegetal é muito maior, o conhecimento do potencial dos recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas e sua preservação, deve ser uma busca constante.

A *Mentha x villosa* Hudson anteriormente era citada na literatura como *Mentha crispa* L. entretanto a identificação Botânica feita por Dr. R. Harley do Kew Garden (Inglaterra) mostrou que esta planta é um híbrido da *Mentha spicata* e *Mentha suaveolens*, sendo conhecida popularmente como hortelã da folha miúda. A família compreende 220 gêneros e 4000 espécies. É distribuída em todo o mundo e apresenta grande importância industrial e econômica em cosméticos, alimentos, condimentos, na indústria farmacêutica e na medicina popular (BRITO, 1983).

Apresenta eficácia comprovada na medicina popular como antiparasitária, antibacteriana e sedativa. Tais aplicações, devem-se aos óleos essenciais presentes na planta entre os quais limoneno,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -pineno (CRAVEIRO et al., 1993), além de 1,8-cineol, trans-

ocimeno, linalol ,  $\beta$ -farneseno,  $\beta$ -carifileno,  $\beta$ -cubebeno e como constituinte principal, a rotundifolona, um monoterpene oxigenado de rara ocorrência (HIRUMA , 1993).

As plantas do gênero *Mentha* vem sendo estudadas quanto ao cultivo “in vitro” de células e de órgãos (DORNENBURG & KNORR, 1995; KAWABE et al; 1993 ; SPENCER et al., 1993; KNORR et al., 1993; HIRATA et al., 1990). No entanto , a *Mentha x villosa* permanece pouco ou nada estudada neste sentido. Iniciou-se então o seu cultivo in vitro objetivando definir um protocolo de micropropagação. Objetivou-se definir as condições de cultura *in vitro* de *Mentha x villosa* no que diz respeito a micropropagacao bem como analisar os constituintes químicos presentes no óleo essencial das plantas micropropagadas .

## 2. MATERIAL E METODOS

Os experimentos foram divididos em duas etapas: micropropagação e regeneração. Para a cultura primária, ápices caulinares de plantas do campo foram utilizados como explantes, com o objetivo de fornecer material vegetal em condições assépticas para os experimentos de regeneração.

### 2.1. Micropropagação

Os explantes foram inoculados inicialmente em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de concentrações variáveis de AIB e 4 mg/L de BAP. Em seguida, passaram a ser cultivados no melhor meio obtido na sala de crescimento com temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

As vitroplantas obtidas serviram como explantes no experimento de micropropagação, onde foram utilizadas gemas apicais e axilares com e sem folhas, utilizando o mesmo meio de cultura acrescido das concentrações de 0,1 a 0,4 AIB e 0,6 de BAP. Após o crescimento, as plantas foram transferidas para vasos plásticos com substrato constituído de terra vegetal e vermiculita e aclimatizados em condições ambientais de laboratório em bandejas contendo 28 vasos permanecendo assim por oito dias. Em seguida foram levados para casa de vegetação onde permaneceram por quatro semanas, quando foram plantadas em canteiro de 1 m x 1,5 m contendo solo tipo Latossolo adubado com 5 Kg de esterco de curral permanecendo por 70

dias com regas diárias no período da tarde. Após esta fase de crescimento no campo as folhas foram coletadas pela manhã, pesadas e picadas manualmente para extração do óleo essencial.

Este material foi acondicionado em balão volumétrico com água destilada suficiente para cobri-lo e aquecido com manta aquecedora até a ebulição. Em seguida foi submetido a extração do óleo pelo processo de arraste a vapor de água ( WASICKY, 1963 ), em aparelho Clevenger adaptado, desenvolvido no LTF/UFPB. O período de extração durou 8 horas e foi obtido um óleo de cor amarelada e odor característico.

## 2.2. Regeneração

Para a regeneração utilizou-se o meio de cultura MS acrescido de Agar-agar (Merck) 8 g/L e de sacarose P. A.(Grupo Química) nas concentrações de 30 g/L e de 45 g/L. Nestes meios, foram adicionados os reguladores de crescimento, duas auxinas (ácido indolbutírico (AIB) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e uma citocinina (ácido 6-benzilaminopurina). Os reguladores foram utilizados em diferentes concentrações combinações , as auxinas em concentrações que variam respectivamente de 0,03 a 0,07 mg/L e a citocinina foi adicionada nas concentrações de 1-4 mg/L.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada tratamento teve 24 repetições e foi observado altura das brotações das gemas axilares e apicais e o sistema radicular.

## 3. RESULTADOS E DISCURSAO

Ápices caulinares, gemas axilares e meristemas são explantes indicados na propagação clonal *in vitro* porque possuem aptidões para o crescimento vegetativo e, satisfeitas as necessidades nutricionais, dão origem a plantas inteiras.

A taxa de explantes micropropagados foi de 90%. Caracterizou-se como tal aqueles que desenvolveram raízes e tiveram as suas gemas apicais e laterais em crescimento (Tabelas 1,2,3 e 4).

**I JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA  
BANANEIRAS, 17 A 20 DE OUTUBRO DE 2006**

**Tabela 1.** Efeito das concentrações de AIB e BAP na altura das plantas em mg/L.

Tr	Mg/L		Altura em cm
	AIB	BAP	
1	0,0	0,6	0,0 a
2	0,1	0,6	6,0 b
3	0,2	0,6	8,0 c
4	0,3	0,6	10,0 d
5	0,4	0,6	11,0 e

Medias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,001$ ).

**Tabela 2.** Efeito das concentrações de AIB e BAP no numero de raízes

Tr	Mg/L		Altura em cm
	AIB	BAP	
1	0,0	0,6	0,0 a
2	0,1	0,6	10,0 b
3	0,2	0,6	10,0 c
4	0,3	0,6	10,0 d
5	0,4	0,6	12,0 e

Medias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,001$ ).

**Tabela 3.** Avaliação do desenvolvimento de gemas apicais com e sem folhas de *Mentha x villosa* Hudson em MS semi-sólido mais 0,4 mg/L de AIB e 0,6 mg/L de BAP.

Avaliação	Altura inicial	Altura aos 8 dias	Altura aos 30 dias
Com folhas	0.5 cm aA	20cm aB	11 cm aC
Sem folhas	0.5 cm aA	20cm aB	11 cm aC

Medias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,001$ ).

**Tabela 4.** Avaliação do desenvolvimento de gemas laterais com e sem folhas de *Mentha x villosa* Hudson em MS semi-solido mais 0,4 mg/L de AIB e 0,6 mg/L de BAP.

Avaliação	Altura inicial	Altura aos 8 dias	Altura aos 30 dias
Com folhas	0.5 cm a A	6cm a B	11. cm a B
Sem folhas	0.5cm a A	8cm a B	11 cm a C

Medias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,001$ ).

A etapa do transplântio envolveu a transferência das plantas em condições “in vitro” para a casa de vegetação onde foi submetida a uma fase de aclimatação e amadurecimento. Essa passagem é bastante crítica e representa em alguns casos um fator limitante do processo de micropropagação. A planta passa de uma situação de reduzido fluxo transpiratório para um ambiente onde fica muito susceptível ao estresse hídrico, passa de uma existência heterotrófica na qual depende de um suprimento externo de energia para um estado autotrófico no qual precisa rapidamente incrementar a absorção de sais.

A cultura *in vitro* de *Mentha x villosa* Hudson em meio MS, apresentou desenvolvimento normal com “boa” coloração das plantas e vasto sistema radicular. A aclimatação com substrato constituído de terra vegetal e vermiculita 1:1, mostrou bom resultado na fase intermediária do laboratório para casa de vegetação com bom desenvolvimento e taxa de pegamento das plantas de 100%.

Para a regeneração, os meios acrescidos de 2,4-D, em diferentes concentrações (0,03; 0,04; 0,05 e 0,06 mg/L), quando se usaram explantes fragmentos de folhas e caules, originaram somente calos. Tais resultados assemelham-se aos de Grattapaglia & Machado (1990), que observaram a aptidão de estimular a formação de calos pelo 2,4-D mesmo em baixas concentrações.

Os melhores resultados de regeneração foram obtidos com os fragmentos de caules em meio MS acrescido de BAP a 4 mg/L e de AIB a 0,4mg/L. Os regenerantes surgiram em forma de tufos com cerca de mais ou menos 50 plântulas por explante.

Kawabe et al. (1993), observando a produção de óleos essenciais em *Mentha x arvensis* cultivada em várias concentrações de BAP, também constataram que, em doses altas, como de 4 mg/L, a BAP induz uma vasta proliferação de gemas adventícias e de plântulas.

A organogênese direta, a regeneração a partir de tecidos não meristemáticos sem passagem pela fase de calo é possível em alguns casos e a fidelidade genética nestes casos é bastante alta. Provavelmente, devido ao fato das gemas adventícias surgirem a partir de uma ou duas camadas de células da epiderme como acontece com a tulipa (WRIGHT & ANDERSON, 1980).

**Quadro 1.** Porcentagem de regeneração de *Mentha x villosa* Hudson a partir de cultivo in vitro de folhas fragmentos de caules em meio MS acrescido de diferentes reguladores de crescimento.

Meios de cultura	Reguladores	Explantos	Resposta
MS30	2,4-D (0,30-0,7mg/L)	Folhas	100% calos
MS30	BAP/AIB (4/0,4mg/L)	Caules	7% Regeneração

O óleo essencial das plantas foi extraído e analisado por cromatografia gasosa e espectroscopia de massa. Observou-se que os principais componentes do óleo essencial da *Mentha x villosa* se mantêm. Nas plantas in vitro, indentificou-se o composto principal do óleo essencial, o óxido de piperitenona.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sobre a propagação da *Mentha x villosa* permite concluir que esta planta pode ser regenerada no meio MS adicionado de auxina AIB 0.4 mg/L e citocinina BAP 4mg/L;

As concentrações 0.4 mg/L de AIB e 0.6 mg/L de BAP promovem maior crescimento da parte aérea e das raízes, transformando explantes em plantas perfeitas;

O substrato terra vegetal e vermiculita 1:1, conservou a umidade necessária para a fase de aclimação das plantas, cuja taxa de pegamento foi de 100%;

A extração do óleo essencial das plantas cujas folhas pesaram 750g, o rendimento foi de 0,2 mL;

O óleo essencial das plantas apresentou como principal componente o óxido de piperitenona.

#### 5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BRITO, N. R. S. **Quimiossistemática da família Labiatae**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado, 1983.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, W. G. ; KUTNEY, J. P. **Óleos essenciais e Químicos fina.** Química nova 16 (3) 224-228, 1993.

CROCOMO, O. J. **Biotechnological approaches for the control f plant morphogenesis and their applications in agriculture.** Genome, Ottawa, V.31, n.2, p. 1034-1041, 1989.

DORNENBURG, H; KNORR. D.; **Strategies for the improvement of seconday metabolite production in plant cell cultures.** Enzyme and microb technol, 17:674-684, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. **Micropropagação .**In: Tecnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. ABCTO/EMBRAPA-CNPQ, Parte II. P 99-170, 1990.

HIRATA, T.; MURAKAMI, S.; OGIHARA, K.;SUGA, T. **Volatile monoterpene constituents of the plantlets of *Mentha spicata* produced by shoot tip culture.** Photochemistry, 29 (2) 493-495, 1990.

HIRUMA, C. A. **Estudo Químico e Farmacológico do óleo essencial das folhas de *Mentha x villosa*.** Tese de mestrado apresentada ao mestrado de naturais da UFPB, 1993.

KAWABE, S.;FUJIWARA, H.; MURAKAMI, K.; HOSOMO, K.**Volatile constituents of *Mentha x arvensis* culture.** Biosci biotech biochem, 57 (4) 657-658, 1993.

KNORR, D.;CASTER, C.; DORNENBURG, H.; DIRN, R.;GRAF, S.; HAVKIN-FRENKEL, D.; PODSTOLKI, A.; WERRMAN, U. **Biosynthesis and yield improvement of food ingredients from plant cell and tissue cultures.** Food technol, 57-63, 1993.

LOYD, G.; MCCOWN, B. **Commercially- feasible micropropagation of mountain laurel, *kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture.** Comb. Proc. Intl. Plant prop. Soc., 30: 421-427, 1980.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassys with tobacco tissue culture. **Plant physiol**, 15:473-497, 1962.

SPEENCER, A.; HAMILL, J.; RHODES, J.C.; In vitro biosynthesis of monoterpene of monoterrpene by Agrobacterium transformed shoot culture of two menthe species. **Phytochemistry**, 32 (4) 911-949, 1993.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho CLevenger para extração de óleo essencial. **Ver. Farm. Bioq.** S. Paulo. 1 (1) 77-81, 1963.

WRIGH, N. A.; ALDEERSON, P.G.; **The growth of tulip tissues in vitro.** Acta Hort. 109:263-270, 1980.