

Micropropagação de Quimiotipos de *Lippia Alba* Mill. N. E. Br Produtores de Citral, Carvona e Linalol.

Micropropagation of Three Chemotypes of *Lippia Alba* Mill. N. E. Br. Producers of Citral, Carvone and Linalool Respectively

^{1,4*}Tavares, E. S.;

^{2,4}Leitão, S. G.; ^{1,4}Reinert, F.;

^{3,4}Lage, C. L. S.

¹Instituto de Biologia CCS, UFRJ;

²Faculdade de Farmácia, CCS,

UFRJ; ³Instituto de Biofísica,

CCS, UFRJ; ⁴Programa de Pós-

graduação em Biotecnologia

Vegetal, CCS, UFRJ, Rua

Brigadeiro Trompowsky S/N, Ilha

do Fundão, 21941-590, Rio de

Janeiro, RJ.

*Correspondência: E-mail:
elianast@biologia.ufrj.br

Unitermos: *Lippia alba*;
Verbenaceae; cultura de tecidos;
citral; carvona; linalol

Key words: *Lippia alba*;
Verbenaceae; tissue culture; citral;
carvone; linalool

Resumo

O trabalho descreve um protocolo de micropropagação de três quimiotipos de *Lippia alba*, produtores de citral, carvona e linalol como componentes majoritários do óleo essencial. A espécie é amplamente utilizada na medicina tradicional e de grande interesse econômico devido, dentre outros fatores, às propriedades dos componentes majoritários do óleo essencial. Segmentos nodais de ramos dos três quimiotipos, foram introduzidos *in vitro*. Foi utilizado o meio de cultura Murashigue e Skoog, suplementado com sacarose e vitaminas, e desprovido de hormônios (MS), com e sem adição de norbixina. As plantas obtidas foram subcultivadas com concentrações variadas de AIA (ácido indolacético) e cinetina. A adição de norbixina foi eficaz em diminuir a morte dos explantes por oxidação. Os hormônios testados não são necessários para a multiplicação dos três quimiotipos de *L. alba* *in vitro*. Este protocolo mais rápido e econômico não afetou a aclimação das plantas micropropagadas, a qual foi obtida com sucesso.

Abstract

This work describes a micropropagation protocol for three different chemotypes of *Lippia alba*, which essential oil's major components are citral, carvone and linalol. *L. alba* is widely used in traditional medicine and among other characteristics, is of great economical interest for its essential oils. Nodal segments of three chemotypes, were cultured *in vitro*. Plants were grown in Murashigue and Skoog (MS) medium supplemented with sucrose and vitamins but not hormones, with and without norbixin. Plants obtained in this way were then subcultured to identify if the addition of IAA and kinetin optimized plant growth. The results showed that these hormones were not required to successfully culture and multiply the three chemotypes of *L. alba* *in vitro*. Addition of norbixin was efficient in decreasing plant tissue oxidation. This faster and more economical protocol did not affect *ex vitro* acclimation of plants that was also successful.



Introdução

Lippia alba ocorre em praticamente todas as regiões do Brasil. As folhas são utilizadas por suas propriedades sedativas, carminativa, espasmolítica e emenagoga (ZÉTOLA et al., 2002; VALE et al., 2002; MATOS et al., 1996). A composição de seu óleo essencial apresenta variações quantitativas e qualitativas, levando à distinção em diferentes quimiotipos (MATOS et al., 1996; FRIGHETO et al., 1998; ZOGHBI et al., 1998; TAVARES et al., 2004; TAVARES et al., no prelo). Os quimiotipos podem apresentar atividades farmacológicas distintas (DIP et al., 2002), bem como diferenças morfológicas (MATOS, 1996; CORRÊA, 1992). Dentre os vários quimiotipos de *L. alba*, existem três que produzem citral, carvona ou linalol como componentes majoritários de seus óleos essenciais.

O citral é uma mistura de neral e geranial utilizada como aromatizante em produtos de uso doméstico. Foi descrita sua atividade fungicida (WURYATMO et al., 2003); sua toxicidade sobre *Acarapis woodi*, parasita de abelhas produtoras de mel (ELLIS; BAXENDALE, 1997) e sobre *Meloydogyne incognita*, um nematóide parasita de tomate (KOKALIS et al., 2002). O citral apresenta, ainda, efeito ansiolítico e hipotérmico (VALE et al., 1998); analgésico e anti-dematogênico (VIANA et al. 1998) e sedativo e relaxante motor (GURGEL et al., 2002). A carvona apresenta ação nematicida (OKA et al., 2000), bacteriostática, bactericida e fungicida (AGGARWAL et al., 2002), bem como, atividade alelopática (FAROOQI et al., 2001). O linalol é utilizado na indústria de perfumaria (FRIGHETTO et al., 1998) e apresenta atividade antioxidante, comparável à da vitamina E na prevenção da peroxidação de lipídios (CELIK; OZYAKA, 2002). Apresenta, também, atividade antiinflamatória (PEANA et al., 2002); analgésica (PEANA et al., 2003); contra linhagens de células de leucemia e linfoma humanos (CHIANG et al., 2003) além de efeitos sedativos sobre o sistema nervoso central, incluindo propriedades hipnóticas, hipotérmicas e anticonvulsivantes (ELIZABETSKY et al., 1999). O óleo essencial de espécies ricas em linalol demonstrou atividade bactericida, fungistática (LIU et al., 2001) e inseticida (VERMA et al., 2000-2001).

O cultivo *in vitro* constitui importante ferramenta para a reprodução de exemplares com propriedades desejáveis. Podem ser cultivados clones em grande número e sob condições controladas de assepsia, nutrição e de fatores ambientais. Essa produção dá-se em tempo reduzido e com grande economia de

espaço. A técnica permite, ainda, a obtenção de plantas livres de patógenos geralmente propagados pelas técnicas tradicionais (GRATAPAGLIA; MACHADO, 1998). Juliani e colaboradores (1999) estabeleceram um protocolo para micropropagação de *Lippia junelliana* e o grupo de Gupta (2001) para *L. alba* (quimiotipo produtor de linalol). Neste último, os autores obtiveram múltiplos brotamentos com a adição de 6-benziladenina (BA) ao meio de Mura-shigue & Skoog. Pelo protocolo vigente, ocorre a necessidade de etapa de alongamento e indução de raízes, posterior à indução de múltiplos brotamentos.

Uma das dificuldades da micropropagação de plantas lenhosas como *L. alba* está relacionada ao alto grau de morte dos explantes por oxidação. Algumas técnicas têm sido utilizadas para diminuir a oxidação de explantes, como a adição de norbixina ao meio de cultura (LAGE, 2001). Considerando-se o grande potencial biotecnológico de *L. alba* e a importância do cultivo de plantas de interesse econômico visando, além do uso sustentável dos componentes da biodiversidade, a produção de plantas saudáveis e vigorosas; o presente trabalho tem como objetivo contribuir para o aprimoramento do protocolo de micropropagação da espécie.

Material e Métodos

Material vegetal. Estacas de *Lippia alba* dos quimiotipos 1 (rico em citral), 2 (rico em carvona) e 3 (rico em linalol), obtidas no horto de Far-Mangueiros, Fiocruz, Rio de Janeiro, foram cultivadas no Horto do Departamento de Botânica - UFRJ. O material foi depositado no Herbário do mesmo Departamento, sob os números RFA 29421, 29422 e 29423. A determinação foi feita pela Dra. Fátima Gonçalves Salimena, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Introdução *in vitro*. Três indivíduos de cada quimiotipo, com mais de seis meses após o plantio no Horto, foram utilizados como fonte de explantes para as culturas *in vitro*. Ramos herbáceos e sem folhas foram desinfestados com lavagem em água corrente seguida de imersão em água com detergente de uso doméstico, onde permaneceram sob agitação por 10 minutos, ao fim dos quais a água com detergente foram trocados, e o procedimento repetido por mais dez minutos. Os ramos foram, então, enxaguados em água destilada e levados para a câmara de fluxo laminar horizontal, onde foram tratados com álcool etílico comercial 70% por 5 minutos, seguido de lavagem em água destilada estéril, seguido de imersão



em água sanitária 50% por 8 minutos e lavados em água destilada estéril.

Segmentos nodais e apicais dos ramos desinfestados, com aproximadamente 1cm de comprimento, foram inoculados verticalmente, obedecendo à polaridade do órgão, em tubo de ensaio (15 cm x 10 mm) com cerca de 15mL de meio de cultivo e vedados com filme de PVC. O meio continha sais minerais de MURASHIGE e SKOOG (1962) suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,60 µM de mio-inositol, 2,43 µM de piridoxina, 4,10 µM de ácido nicotínico e 1,48 µM de tiamina (MS). O pH do meio foi ajustado a 5,8 0,1, o meio solidificado com 8 g.L⁻¹ de ágar, e então esterilizado em autoclave a 120 °C e 1,1 kgf/cm² por 15 minutos. As culturas foram incubadas a 25 ± 2 °C sob fotoperíodo de 16 h e iluminação com lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, da marca Sylvania, sob intensidade de fluxo luminoso de 1.6 Wm⁻², 23 µMm⁻²s⁻¹. O desenvolvimento dos explantes foi acompanhado diariamente, sendo descartados os que apresentaram contaminação ou oxidação.

Tratamento com norbixina: Para testar a eficiência da adição de norbixina ao meio de cultivo, 96 explantes do quimiotipo 3 foram divididos em dois lotes. Um lote foi tratado conforme descrito acima e o outro inoculado em meio contendo 30 mg/mL de norbixina (LAGE, 2001). Os dois lotes foram incubados nas condições já descritas por 32 dias.

Etapa de multiplicação: Plantas *in vitro* dos três quimiotipos, com cerca de 5 nós, foram subcultivadas utilizando-se segmentos apicais ou nodais com duas gemas, com cerca de 1cm, os quais foram acondicionados em frascos de vidro de 500mL de capacidade, medindo 8cm de diâmetro e 15cm de altura com 40mL de meio MS, desprovido de reguladores de crescimento, sob as mesmas condições de temperatura e luminosidade descritas acima. Em cada frasco, foram cultivadas 5 plantas. Os subcultivos foram feitos com intervalos de 30 a 40 dias.

Uso de reguladores de crescimento: Plantas dos três quimiotipos, provenientes do 7º subcultivo, foram inoculadas em três tratamentos: MS; MS adicionado de ácido idolacético (AIA) nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,00 e 2,50 µM e em meio MS adicionado de citocinina nas concentrações 0,50; 1,00 e 2,50 µM. As plantas foram mantidas nas condições de luminosidade e temperatura já descritas. A experiência teve a duração de 33 dias e para cada tratamento foram utilizados cinco frascos contendo

cinco plantas cada.

Avaliação do crescimento das plantas *in vitro*: Foram efetuadas medidas semanais de: comprimento do maior ramo utilizando paquímetro, nº de nós de cada ramo, nº de ramos e porcentagem de plantas enraizadas.

Etapa de aclimação: Trinta plantas micropropagadas de cada quimiotipo foram retiradas do meio de cultura e, após lavagem das raízes em água, foram transplantadas para potes plásticos contendo terra adubada umedecida. Os potes foram, então, acondicionados em recipiente de vidro coberto com plástico transparente e transferidos para casa de vegetação com temperatura e luminosidade naturais, onde o plástico foi retirado gradualmente. Foram realizadas avaliações semanais para acompanhar o desenvolvimento das plantas.

Tratamento estatístico: Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o software Graph Pad InStat 3.0 para Windows® (Microsoft). Para comparação dos resultados foi utilizada a análise de variâncias (ANOVA), seguida do teste de Tuckey Kramer, para dados com distribuição normal e desvios padrões significativamente semelhantes, e o teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn, para dados que não apresentaram distribuição normal ou cujos desvios padrões foram significativamente diferentes.

Resultados

Introdução *in vitro*: Na propagação *in vitro* de *L. alba* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento, observou-se o desenvolvimento das gemas axilares preexistentes nos segmentos nodais e apicais. O quimiotipo 1 apresentou a melhor resposta ao tratamento de desinfestação já que 50% dos explantes introduzidos não apresentaram contaminação após o tratamento. No quimiotipo 2, 37% e no quimiotipo 3, 25% dos explantes não apresentaram contaminação após o tratamento. Porém, devido ao alto grau de morte por oxidação, após 32 dias de cultivo, apenas 21% dos explantes que não apresentaram contaminação originaram novas plantas do quimiotipo 1, 55% do quimiotipo 2 e 7% do quimiotipo 3 (n = 56). Em experimento posterior, em uma tentativa de diminuir a oxidação dos explantes do quimiotipo 3, foi adicionada norbixina ao meio de cultura, o que aumentou visivelmente a porcentagem de desenvolvimento dos explantes que não apresentaram contaminação. Dos 48 explantes introduzidos em



meio MS, 46% responderam ao tratamento de desinfestação e 9% originaram novas plantas. Já dos 48 explantes introduzidos em meio MS adicionado de bixina, 48% responderam ao tratamento de desinfestação e 30 % originaram novas plantas. O tempo de início de desenvolvimento das gemas axilares variou

nos diferentes quimiotipos: No quimiotipo 1 ocorreu após 16 dias de cultura, no quimiotipo 2 após 11 dias e no quimiotipo 3 apenas após 27 dias. A formação do sistema radicular adventício acompanhou o desenvolvimento das gemas.

Tabela 1 - Dados referentes aos três quimiotipos de *L. alba*, incubados sob luz branca, após 33 dias do 3º 4º e 7º subcultivo em meio MS (média ± erro padrão). Comprimento do maior ramo (cm) (Ramo), número de brotos (Broto), número de nós (Nó), porcentagem de explantes enraizados (Raiz). Para cada quimiotipo, as letras diferentes em uma mesma linha destacam resultados diferentes determinados pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas (p<0,05) (n= 35).

Quimiotipos	<i>L alba 1</i>			<i>L alba 2</i>			<i>L alba 3</i>		
	3º	4º	7º	3º	4º	7º	3º	4º	7º
Ramo	5,7 ± 0,8 ^a	3,8 ± 0,4 ^a	15,2 ± 1 ^b	3,4 ± 0,4 ^a	3,7 ± 0,1 ^a	9,9 ± 0,6 ^b	2,2 ± 0,3 ^a	2,2 ± 0,4 ^a	7,2 ± 0,7 ^b
Broto	2,0 ± 0,2 ^a	1,8 ± 0,2 ^a	1,7 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,3 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,1 ^a
Nó	7,3 ± 0,8 ^a	5,4 ± 0,3 ^a	7,8 ± 0,3 ^b	6,6 ± 0,6 ^a	5,9 ± 0,2 ^{ab}	7,0 ± 0,4 ^b	3,5 ± 0,3 ^a	3,6 ± 0,5 ^a	6,0 ± 0,4 ^b
Raiz	100%	94%	100%	100%	100%	96%	100%	86%	91%

Tabela 2 - Dados referentes aos três quimiotipos de *L. alba*, incubados sob luz branca, após 33 dias do 7º subcultivo em meio MS e em meio com adição de quatro concentrações de ácido indol-acético (AIA) (média ± erro padrão). Porcentagem de explantes que originaram plantas (com ou sem raiz) (Planta), comprimento do maior ramo (cm) (Ramo), número de brotos (Broto), número de nós (Nó), porcentagem de explantes enraizados (Raiz). Letras minúsculas diferentes em cada linha indicam resultados significativamente diferentes, determinados por análise de variâncias (ANOVA) seguida do teste de Tuckey Kramer de comparações múltiplas; letras maiúsculas diferentes indicam resultados significativamente diferentes determinados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas (p<0,05) (n=25).

	Quimiotipos	MS	AIA			
			0,25µM	0,50µM	1,00µM	2,50µM
Planta	<i>L. alba 1</i>	96% ^A	96% ^A	92% ^A	83% ^A	83% ^A
	<i>L. alba 2</i>	100% ^A	96% ^{A,B}	74% ^B	88% ^{A,B}	83% ^{A,B}
	<i>L. alba 3</i>	95% ^A	79% ^A	100% ^A	79% ^A	49% ^B
Ramo	<i>L. alba 1</i>	13,68 ± 0,40 ^a	7,11 ± 0,63 ^b	9,25 ± 0,66 ^b	8,57 ± 0,77 ^b	4,15 ± 0,63 ^c
	<i>L. alba 2</i>	9,90 ± 0,63 ^a	6,85 ± 0,88 ^{b, c, d}	7,55 ± 0,98 ^{a, c}	3,10 ± 0,56 ^{b, d}	7,67 ± 0,70 ^{a, c}
	<i>L. alba 3</i>	7,20 ± 0,74 ^a	4,75 ± 0,64 ^a	5,98 ± 0,71 ^a	5,61 ± 0,76 ^a	5,20 ± 1,1 ^a
Broto	<i>L. alba 1</i>	1,74 ± 0,1 ^{oA}	1,35 ± 0,10 ^B	1,68 ± 0,10 ^A	1,60 ± 0,11 ^A	1,30 ± 0,11 ^B
	<i>L. alba 2</i>	1,75 ± 0,14 ^A	1,35 ± 0,10 ^{A,B}	1,67 ± 0,10 ^A	1,50 ± 0,11 ^{A,B}	1,04 ± 0,12 ^B
	<i>L. alba 3</i>	1,63 ± 0,11 ^A	1,60 ± 0,12 ^A	1,61 ± 0,11 ^A	1,53 ± 0,11 ^A	1,18 ± 0,12 ^A
Nó	<i>L. alba 1</i>	7,78 ± 0,33 ^a	4,5 ± 0,2 ^{b, c}	5,9 ± 0,3 ^b	5,5 ± 0,3 ^b	3,5 ± 0,6 ^c
	<i>L. alba 2</i>	7,04 ± 0,39 ^a	4,91 ± 0,41 ^b	6,55 ± 0,62 ^{ab}	5,05 ± 0,37 ^b	4,80 ± 0,35 ^b
	<i>L. alba 3</i>	6,13 ± 0,37 ^a	3,94 ± 0,36 ^b	6,06 ± 0,36 ^a	5,00 ± 0,39 ^{a,c}	3,81 ± 0,40 ^{b,c}
Raiz	<i>L. alba 1</i>	100%	100%	95%	100%	73%
	<i>L. alba 2</i>	96% ^A	69% ^A	83% ^A	87% ^A	95% ^A
	<i>L. alba 3</i>	91% ^a	100% ^a	100% ^a	95% ^a	63% ^b

Tabela 3 - Dados referentes à *L. alba* 1, incubada sob luz branca, após 33 dias do 7^o subcultivo em meio MS adicionado de diferentes concentrações de cinetina (média ± erro padrão). Porcentagem de explantes que originaram plantas (com ou sem raiz) (Planta), comprimento do maior ramo (cm) (Ramo), número de brotos (Broto), número de nós (Nó), porcentagem de explantes enraizados (Raiz) Letras minúsculas diferentes em cada linha indicam resultados significativamente diferentes, determinados por análise de variâncias (ANOVA) seguida do teste de Tuckey Kramer de comparações múltiplas; letras maiúsculas diferentes indicam resultados significativamente diferentes determinados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas (p<0,05) (n=25).

	Quimiotipos	MS	Cinetina		
			0,50mM	1,00mM	2,50mM
Planta	<i>L. alba</i> 1	100% ^a	100% ^a	96% ^a	96% ^a
	<i>L. alba</i> 2	100%	100%	100%	100%
	<i>L. alba</i> 3	89% ^{a,b}	75% ^{a, b}	56% ^b	92% ^a
Ramo	<i>L. alba</i> 1	10,70 ± 0,79 ^a	9,60 ± 0,94 ^{a, b}	7,75 ± 0,86 ^{a, b}	7,03 ± 0,78 ^b
	<i>L. alba</i> 2	6,38 ± 0,51 ^a	7,18 ± 0,46 ^a	5,26 ± 0,46 ^a	6,12 ± 0,50 ^a
	<i>L. alba</i> 3	5,99 ± 1,28 ^a	7,87 ± 1,27 ^a	7,03 ± 1,74 ^a	6,70 ± 0,85 ^a
Broto	<i>L. alba</i> 1	1,33 ± 0,13 ^A	1,54 ± 0,10 ^A	1,26 ± 0,09 ^A	1,61 ± 0,12 ^A
	<i>L. alba</i> 2	1,92 ± 0,10 ^A	1,83 ± 0,10 ^A	1,71 ± 0,15 ^A	1,63 ± 0,12 ^A
	<i>L. alba</i> 3	1,38 ± 0,13 ^A	1,44 ± 0,12 ^A	1,30 ± 0,15 ^A	1,64 ± 0,12 ^A
Nó	<i>L. alba</i> 1	4,91 ± 0,36 ^a	5,33 ± 0,27 ^a	3,74 ± 0,25 ^b	4,87 ± 0,30 ^a
	<i>L. alba</i> 2	6,25 ± 0,34 ^{a, b, c}	6,78 ± 0,48 ^{a, b}	5,42 ± 0,29 ^{a, c}	5,46 ± 0,31 ^{a, b, c}
	<i>L. alba</i> 3	4,06 ± 0,36 ^a	4,44 ± 0,44 ^a	3,90 ± 0,32 ^a	5,14 ± 0,30 ^a
Raiz	<i>L. alba</i> 1	100%	96% ^a	91% ^a	83% ^a
	<i>L. alba</i> 2	100%	100%	100%	83%
	<i>L. alba</i> 3	87% ^A	72% ^A	80% ^A	76% ^A

Multiplicação: Ao fim dos sucessivos subcultivos as plantas micropropagadas apresentaram a parte aérea constituída por eixo caulinar com entrenós bem delimitados, folhas com limbos expandidos e sistema radicular bem desenvolvido.

Influência de sucessivos subcultivos na multiplicação de *L. alba*: Ao comparar o terceiro e quarto subcultivos com o sétimo (Tabela 1), observa-se que o comprimento do maior ramo, bem como o número de nós, aumentaram significativamente nos três quimiotipos, O número de brotos e a porcentagem de enraizamento, no entanto, não sofreram variação significativa.

Influência de reguladores de crescimento no crescimento e multiplicação de *L. alba*:

- **AIA:** A comparação dos resultados de crescimento e multiplicação de *L. Alba*, em meio MS e em meio com adição de quatro concentrações de AIA, está na Tabela 2. Em todos os parâmetros medi-

dos, houve redução do crescimento e multiplicação das plantas com a adição de AIA.

- **Cinetina:** Os resultados da experiência com cinetina podem ser observados na Tabela 3. Assim como o observado com AIA, o cultivo de *Lippia alba* em meio com adição de cinetina não otimizou sua multiplicação *in vitro*.

Aclimação: Na experiência de aclimação obteve-se 100% de sobrevivência das plantas em todos os quimiotipos, e as plantas propagadas por cultura de tecidos não mostraram qualquer diferença morfológica quando comparadas às plantas do campo.

Discussão

A alta frequência de morte por oxidação de explantes de *L. alba* introduzidos em meio MS deve-se provavelmente ao fato de ser essa uma espécie de hábito subarbuscivo. Plantas lenhosas possuem compostos

fenólicos, precursores da síntese de lignina, e que podem estar ligados a processos de regulação e crescimento. Dependendo da concentração endógena de auxina nos tecidos, ocorre indução da oxidação destes compostos. Em torno da superfície excisada do explante acumulam-se polifenóis e produtos de oxidação que modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000). Além disso, a atividade das enzimas que regulam a biossíntese e oxidação de fenóis é aumentada em presença de luz, necessária para o desenvolvimento dos explantes (ADAMS, 1979). A dificuldade em se propagar explantes nodais deve-se justamente à oxidação que ocorre nesses segmentos (ANDRADE et al., 2000). Dentre as estratégias utilizadas para o controle da oxidação, está a lavagem em água corrente dos ramos coletados, auxiliando a lixiviação de compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Este procedimento não se mostrou eficaz para a espécie estudada. O uso, porém, no presente trabalho, da norbixina como antioxidante (LAGE 2001) mostrou-se eficaz no controle da oxidação dos explantes.

O aumento do número de nós ocorrido no 7º subcultivo, o qual influencia positivamente a multiplicação de *L. alba*, pode ser explicado pelo processo de rejuvenescimento, estimulado por sucessivos subcultivos, já que a introdução de *L. alba* em condições *in vitro* deu-se à partir de explantes obtidos de plantas maduras. As plantas sofrem mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da fase juvenil para a adulta. Após a germinação, a planta inicia uma fase de crescimento vegetativo vigoroso, durante a qual a floração não pode ser induzida mesmo com condições externas favoráveis. A maturação nas plantas lenhosas acarreta diminuição na capacidade de propagação vegetativa, taxas de crescimento, qualidade e rapidez na formação de raízes (WENDLING; XAVIER, 2001). Embora as características de maturação sejam transmitidas, por meio de divisões celulares, de uma geração somática para a próxima, a maturação pode ser revertida (HUANG et al., 1990). Dentre os métodos para reverter a maturação ou manter a juvenildade em plantas encontra-se a propagação vegetativa seriada (TITON et al., 2002), como efetuada no presente trabalho.

O protocolo de micropropagação de *L. alba* sugerido por Gupta e colaboradores (2002) necessita de duas etapas para multiplicação das plantas: indução de

múltiplos brotamentos em meio adicionado de BA, por 6 semanas, e posterior indução de alongamento das plantas e produção de raízes em MS, por mais 3 semanas, antes de iniciar o processo de aclimação. Dessa forma o protocolo é mais caro, trabalhoso e demorado que o apresentado no presente trabalho. A transferência de plantas micropropagadas para casa de vegetação representar fator limitante das técnicas de micropropagação, devido a uma alteração drástica no metabolismo, a qual interfere nos processos fisiológicos fundamentais das plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990). As plantas microcultivadas podem ser divididas em dois grupos com relação à resposta fotossintética: em um grupo as folhas formadas *in vitro* nunca desenvolvem capacidade fotossintética e declinam em condições *ex vitro*; no outro grupo as folhas persistem, com capacidade de adaptação às condições autotróficas e com aumento concomitante das taxas de fotossíntese (GROUT, 1988). Em *L. alba*, assim como foi observado em *L. juneliana* (JULIANI et al. 1999), as folhas das plantas aclimatadas persistiram e sofreram gradual mudança de coloração e textura durante o processo, o que sugere pertencerem ao segundo grupo (dados não mostrados). Outro problema na transferência para casa de vegetação é que as raízes formadas *in vitro* costumam ser pouco ramificadas, o que prejudica o processo de absorção, necessitando de tempo para a emergência de novas raízes e a conseqüente normalização deste processo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990). No caso de *L. alba*, as raízes produzidas *in vitro* são ramificadas e suficientes para sua função. O sucesso obtido na multiplicação de *L. alba* cultivada em meio MS desprovido de reguladores de crescimento, aliado ao sucesso na etapa de aclimação das plantas, torna viável a multiplicação rápida e simplificada da espécie, permitindo a obtenção de plantas saudáveis e vigorosas, dos três quimiotipos, em espaço reduzido e curto intervalo de tempo.

Referências

1. ADAMS, R.M.; KOENIGSBERG, S.S.; LANGHANS, R.W. *In vitro* propagation of *Cephalotus follicularis* (Australian patcher plant). *Horticultural Science*, v.14, n.1, p.512-513, 1979.
2. AGGARWAL, K.K.; KHANUJA, S.P.S.; AHMAD, A.; KUMAR, T.R.S.; GUPTA, V.K.; KUMAR, S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal*, v.17, n.1, p.59-63, 2002.
3. ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). *Ciências Agrotécnicas*, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
4. CELIK, S.; OZYAKA, A. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid,



- vitamin E and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂O₂. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v.35, n.6, p.547-552, 2002.
5. CHIANG, L.C.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; NG, L.T.; LIN, C.C. Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan. *American Journal of Chinese Medicine*, v.31, n.1, p.37-46, 2003.
6. CORRÊA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt & Wilson - erva-cidreira. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.73, n.3, p.57-64, 1992.
7. DIP, E.C.; TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; MATHEUS, M.E.; LEITÃO, S.G.; LAGE, C.L.S. Sedative properties of ethanolic extracts from *Lippia alba* Mill. N. E. Brown: comparison of the activities of three different chemotypes. 1º Simpósio Brasileiro em Química Medicinal. *Novas Estratégias em Planejamento racional de Fármacos*. Caxambu, Minas Gerais, 2001.
8. ELIZABETSKY, E.; SILVA-BRUM, L. F.; SOUZA, D.O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine*, v.6, n.2, p.107-113, 1999.
9. ELLIS, M.D.; BAXENDALE, F.P. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. *Journal of Economic Entomology*, v.90, n.5, p.1087-1091, 1997.
10. FAROOQI, A.H.A.; FATIMA, S.; SHARMA, S.; KUMAR, S. Plant growth control properties of essential oils and their constituents. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, v.22, n.1B, p.603-604, 2000.
11. FRIGHETTO, N.; OLIVEIRA, J.G.; SIANI, A.C.; CHAGAS, K.C. *Lippia alba* Mill N. E. Br. (Verbenaceae) as a source of linalool. *Journal of Essential Oil Research*, v.10, p.578-580, 1998.
12. GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação In: TORRES, A.C.; STYER, L.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa - CNPH, v.1, n.1, p.183-260, 1998.
13. GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets in vitro, and stresses of transplanting. *Acta Horticulturae*, v. 30, p.120-135, 1988.
14. GUPTA, S.K.; SINGH, P.; BAJPAI, P.; RAM, G.; DIGVIJAI, S.; GUPTA, M.M.; JAIN, D.C.; KHANUJA, S.P.S.; KUMAR, S. Morphogenetic variation for artemisinin and volatile oil in *Artemisia annua*. *Industrial Crops and Products*, v.16, p.2217-2224, 2002.
15. GURGEL, V.T.; COUTO, F.E.; SANTOS, J.G.; VIANA, G.S.B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Phytomedicine*, v.9, n.8, p.709-714, 2002.
16. HEMPEL, F.D.; WELCH, D.R.; FELDMAN, L.J. Floral induction and determination: where is flowering controlled? *Trends in Plant Science*, v.5, n.1, p.17-21, 2000.
17. HUANG, L.C. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p.252-264, 1990.
18. JULIANI JR, H.R.; KOROCH, A.R.; JULIANI, H.R.; TRIPPI, V.S. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Plant Cell Tissue Organic Culture*, v.59, p.175-179, 1999.
19. KOKALIS, B.N.; MARTINEZ, O.N.; RODRIGUEZ, K.R.; KLOEPPER, J.W. Development of multi-component transplant mixes for suppression of Meloidogyne ingognita on tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Nematology*, v.34, n.4, p.362-369, 2002.
20. LAGE, C.L.S. *Meio de cultura para a prevenção e/ou redução da oxidação de cultura de tecido*. Depositante Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pat. I. BR. 0106515-7, 2001.
21. LIU, C.H.; MISHRA, A.K.; HE, B.; TAN, R.X. Composition and antifungal activity of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora*. *International Pest Control*, v.43, n.2, p.72-74, 2001.
22. MATOS, F.J.A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) Parte II - Farmacoquímica. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.77, n.4, p.137-141, 1996.
23. MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *Journal of Essential Oil Research* v.8, p.695-698, 1996.
24. MELO, B.; PINTO, J.E.B.P.; LUZ, J.M.Q.; PEIXOTO, J.R.; JULIATTI, F.C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura in vitro de embriões da guarirobeira. *Ciências Agrotécnicas*, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, 2001.
25. MURASHIGUE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-479, 1962.
26. OKA, Y.; NACAR, S.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; YANIV, Z.; SPIEGEL, Y. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopatology*, v.90, n.7, p.710-715, 2000.
27. PEANA, A.T.; DAQUILA, P.S.; PANIN, F.; CHESSA, M.L.; MORETTI, M.D.L.; SERRA, G.; PIPPIA, P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *European Journal of Pharmacology*, v.460, n.1, p.37-41, 2003.
28. PEANA, A.T.; DAQUILA, P.S.; PANIN, F.; SERRA, G.; MORETTI, M.D.L. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oil. *Phytomedicine*, v.9, n.8, p.721-726, 2002.
29. RETAMAR, J.A. Variaciones fitoquímicas de la especie *Lippia alba* (salvia morada) y sus aplicaciones en la química fina. *EsSENze Derivati Agrumari*, v.16, n.1, p.55-60, 1994.
30. TAVARES, E.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Kinetin enhanced linalool production by in vitro plantlets of *Lippia alba*. *Journal of Essential Oil Research*, v.16, n.5, p.405-408, 2004.
31. TAVARES, E.S.; JULIAO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.S.; LEITAO, S.G. 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*, v.15, n.1, 2005 (no prelo).
32. TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Dinâmica do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*, v.26, n.6, p.665-673, 2002.
33. VALE, T.G.; MATOS, F.J.A.; LIMA, T.C.M.; VIANA, G.S.B. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown chemotypes. *Journal of Ethnopharmacology*, v.167, p.127-133, 1998.
34. VERMA, N.; TRIPATHI, A.K.; PREJEPATI, V.; BAHAL, J.K.; BANSAL, R.P.; KHANUJA, S.P.S.; KUMAR, S. Toxicity of essential oil from *Lippia alba* towards stored grain insects. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, v.22-23, n.4A-1A, p.117-119, 2000-2001.
35. VIANA, G.S.B.; DO VALE, T.G.; RAO, V.S.N.; MATOS, F.J.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: A comparative study. *Pharmaceutical Biology*, v.36, n.5, p.347-351, 1998.
36. WENDING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. *Floresta e Ambiente*, v.8, n.1, p.187-194, 2001.
37. WURYATMO, E.; KLIEBER, A.; SCOTT, E.S. Inhibition of citrus postharvest pathogens by vapor of citral and related compounds in culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.9, p.2637-2640, 2003.
38. ZÉTOLA, M.; DE LIMA, T.C.M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLES-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R.P.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian false melissa). *Journal of Ethnopharmacology*, v.82, p.207-215, 2002.
39. ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.; MAIA, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br Growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour and Fragrance Journal*, v.13, p.47-48, 1998.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao Dr. Antonio Carlos Siani e ao Dr. Benjamin Gilbert, de Far-Manguinhos, FIOCRUZ, pela cessão do material botânico.