

**MICROPROPAGAÇÃO, PÓS-COLHEITA E  
EFEITO ALELOPÁTICO DO MANJERICÃO  
'Maria Bonita'**

**LUCIANA DOMICIANO SILVA ROSADO**

**2009**

**LUCIANA DOMICIANO SILVA ROSADO**

**MICROPROPAGAÇÃO, PÓS-COLHEITA  
E EFEITO ALELOPÁTICO DO MANJERICÃO  
'Maria Bonita'**

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

Orientador

Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Rosado, Luciana Domiciano Silva.

Micropropagação, pós-colheita e efeito alelopático do manjerição  
'Maria Bonita' / Luciana Domiciano Silva Rosado – Lavras : UFLA,  
2009.

84p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Pós-colheita. 3. Efeito alelopático. 4.  
Armazenamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.88387

**LUCIANA DOMICIANO SILVA ROSADO**

**MICROPROPAGAÇÃO, PÓS-COLHEITA  
E EFEITO ALELOPÁTICO DO MANJERICÃO  
'Maria Bonita'**

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

APROVADA em 16 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Ricardo Monteiro Corrêa

CEFET/BAMBUÍ

Prof. Dr. Carlos Eduardo Magalhães dos Santos

UFV

Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, João Bosco e Maria de Lourdes

Aos meus irmãos, Renato e Fabiana

Aos meus avós, Sebastião (in memorian) e Maria

Aparecida (in memorian)

José Canuto e Cecília,

DEDICO.

Aos meus tios, tias e primos.

Aos grandes amigos: Juliana, Renata, Glaucia, Carlos

Eduardo, Mariana, Denise, Helen, Tatiana,

Priscila e Roseane

OFEREÇO

Chegamos exatamente onde precisamos chegar porque a mão de

Deus sempre guia aquele que segue seu caminho com

fé.

(Autor desconhecido).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, sendo meu refúgio, conforto e fortaleza em todos os momentos, me dando sabedoria e guiando meus passos.

À Universidade Federal de Lavras, à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e a FAPEMIG e a Capes pelos recursos financeiros.

Agradeço aos meus pais João Bosco Silva Rosado e Maria de Lourdes Domiciano Rosado que me deram o mais importante: a vida e a educação. Sem a ajuda deles não chegaria aqui. Aos meus irmãos Renato e Fabiana, pelo amor, pela amizade e incentivo.

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelo incentivo e grande conhecimento, que tornou esta orientação uma valiosa colaboração para a elaboração deste trabalho.

À professora Suzan Kelly Vilela Bertolucci, pela disposição em colaborar e ajudar no decorrer do mestrado.

Ao professor Dr. Péricles Barreto Alves, Ednilson dos Santos Niculau, pelo aparelho de cromatografia gasosa (GS/MS), ao Dr. Arie Fitzgerald Blank pela disponibilidade da semente de manjerição.

Ao pesquisador Telde Natel Custódio, pela colaboração na realização das análises estatísticas.

As minhas companheiras de república, Helen Arruda Rodrigues e Marina Oppido de Castro, pela paciência e convivência.

Ao grande amigo Evaldo Arantes de Souza, pela amizade e incentivo na condução dos experimentos.

Aos técnicos Wantuil e Claret e aos servidores técnicos do Horto de Plantas medicinais, Sr. Geraldo Luiz e Sr. Luiz Gonzaga e Leandro Simão (Dico) pela colaboração, apoio e amizade durante a condução dos trabalhos de pesquisa.

Aos colegas do laboratório de cultura de tecidos: Priscila, Flávia, Louise, Renata, Ricardo, Érika, Roseane, Helen, Jorge, Larissa, Andrea e Carolina, pela ótima convivência.

Ao Carlos Eduardo, que sempre esteve presente com muita paciência, compreensão e muito amor, sempre me incentivando e colaborando para a realização deste trabalho.

A todos que, embora não citados nominalmente, contribuíram de alguma forma para a minha formação pessoal e profissional.

**Obrigada!**

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
CAPITULO I.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 Referências bibliográficas.....	6
CAPITULO II- Aspectos do cultivo <i>in vitro</i> do manjeriço ‘Maria Bonita’.....	8
1 RESUMO.....	9
2 ABSTRACT.....	10
3 Introdução.....	11
4 Material e métodos.....	12
5 Resultados e discussão.....	14
6 Conclusões.....	20
7 Agradecimentos.....	21
8 Referências bibliográficas.....	21
CAPITULO III - Processamento da folha, tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i> L. ‘Maria Bonita’.....	24
1 RESUMO.....	25
2 ABSTRACT.....	26
3 Introdução.....	27
4 Material e métodos.....	28
5 Resultados e discussão.....	31
6 Conclusões.....	36
7 Agradecimentos.....	37
8 Referências bibliográficas.....	37
CAPITULO IV- Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjeriço ‘Maria Bonita’ em alface, tomate e melissa.....	40
1 RESUMO.....	41
2 ABSTRACT.....	42
3 Introdução.....	43
4 Material e métodos.....	44
5 Resultados e discussão.....	47
6 Conclusões.....	55
7 Agradecimentos.....	55
8 Referências bibliográficas.....	56
CAPITULO V - Embalagem e ambiente de armazenamento no teor e composição química da droga vegetal e do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i> L. ‘Maria Bonita’.....	59



<b>1 RESUMO.....</b>	<b>60</b>
<b>2 ABSTRACT.....</b>	<b>61</b>
<b>3 Introdução.....</b>	<b>62</b>
<b>4 Material e métodos.....</b>	<b>63</b>
<b>5 Resultados e discussão.....</b>	<b>66</b>
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>77</b>
<b>7 Agradecimentos.....</b>	<b>78</b>
<b>8 Referências bibliográficas.....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>81</b>

## RESUMO GERAL

ROSADO, Luciana Domiciano Silva. **Micropropagação, pós-colheita e efeito alelopático do manjeriço ‘Maria Bonita’**. 2009. 84p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. \*

Entre as espécies arbustivas medicinais, destaca-se o *Ocimum basilicum* L., uma espécie pertencente à família lamiaceae, com varias formas de utilização. Hoje em dia seu principal produto de interesse é o óleo extraído de suas folhas e inflorescências, largamente utilizado nas indústrias de cosméticos, como fixador de fragrâncias e como erva aromática, suas folhas secas acompanham temperos culinários. Os resultados indicam que a micropropagação do segmento nodal da plântula de manjeriço é possível sem a utilização de reguladores de crescimento. O uso de reguladores de crescimento induz a formação de calos e diminui o tamanho da brotação. A melhor dose para a obtenção de calos do manjeriço *O. basilicum* L, de explantes foliares a ser utilizada esta entre 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4 diclorofenoxiacético. O tipo de secagem e processamento da folha influencia no teor do óleo essencial de manjeriço. Quantidades ligeiramente elevadas de linalol foram obtidas nas folhas secadas em desidratador e posteriormente moídas. Os componentes majoritários do óleo essencial de *O. basilicum* L. nos devidos tratamentos foram o linalol e o geraniol. Os resultados obtidos com estudos alelopáticos, indicam que os extratos aquosos de manjeriço apresentaram efeito inibitório apenas para o índice de velocidade de germinação do tomate e para comprimento de raízes da alface e da melissa. O óleo essencial do manjeriço apresentou potencialidades alelopáticas inibitórias em sementes de alface, tomate e melissa para o índice de velocidade de germinação, comprimento das raízes e porcentagem de germinação. Observou-se que o tipo de embalagem não influenciou no teor e composição química do óleo essencial. Com o passar do tempo de armazenamento, há uma redução do teor percentual de óleo essencial da droga vegetal. Os diferentes ambientes de armazenamento não influenciaram na composição química do óleo essencial durante o período de 12 meses de armazenamento.

---

\* Orientador: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA.

## GENERAL ABSTRACT

ROSADO, Luciana Domiciano Silva. **Micropropagation, post harvest and allelopathic effect of basil 'Maria Bonita'**. 2009. 84 p. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

Among the medicinal bush species, *Ocimum basilicum* L. stands out, one species belonging to the family Lamiaceae with a number of forms of utilization. Nowadays, its main product of interest is the oil extracted from its leaves and inflorescence, widely used in the cosmetics industry as fragrance fixative and as an aromatic herb, its dry leaves go well with cooking seasonings. The results indicate that basil seedling's nodal segment micropropagation is possible without utilizing any growth regulators. The use of growth regulators induces callus formation and decreases shoot size. The best dose to obtain calluses of the basil *O. basilicum* L. from leaf explants to be used lies between 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. Both drying type and leaf processing influence basil essential oil content. Slightly increased amounts of linalool were obtained from the leaves dried in dehumidifier and ground afterwards. The major components of *O. basilicum* L. in the due treatments were linalool and geraniol. The results obtained from allelopathic studies show that basil aqueous extracts showed inhibitory effect only for velocity rate of tomato germination and for root length of lettuce and melissa. Basil essential oil presented inhibitory allelopathic potentiality in lettuce, tomato and melissa seeds for germination velocity rate, root length and germination percentage. It was found that the type of package did not influence the content and chemical composition of essential oil. As the storage time goes by, there is a decrease of the percent content of essential oil of plant drug. The different storage environments did not influence the chemical composition of the essential oil during the 12 months' storage period.

\* Major Professor: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA.

## **CAPÍTULO I**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Considerando o valor das plantas medicinais não apenas como terapêutico, mas também como fonte de recursos econômicos, torna-se necessário estabelecer técnicas de propagação, manejo e beneficiamento pós-colheita, para obtenção destas com a qualidade desejada.

No processo de produção de princípios ativos, fatores ambientais, identificação botânica, escolha do material, tratamentos culturais, secagem e armazenamento determinam a máxima qualidade destes princípios.

Ultimamente, tem sido significativa a utilização de substâncias químicas extraídas de plantas a serem utilizadas na fabricação de medicamentos para uso humano e de outros produtos, como inseticidas e fungicidas. Assim, o uso de vegetais com o intuito de curar determinada doença, veem, apresentando mudanças, com o conhecimento empírico acumulado ao longo das gerações para pesquisas refinadas em centros especializados (Silva, 2005).

Em se tratando de plantas medicinais, a preocupação não deve apenas estar relacionada com a produção quantitativa de biomassa por hectare, mas também com a riqueza dos princípios ativos contidos. Por isso diversos aspectos devem ser levados em conta para que se possam produzir plantas medicinais em quantidades suficientes e com qualidade necessária (Stefanini et al., 2002).

O gênero *Ocimum*, pertencente à família Lamiaceae, envolve cerca de 160 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América do Sul. No Brasil, presume-se a existência de 11 espécies nativas (Kamada, 1998). Relata-se mais de 60 variedades, com folhas de vários formatos, aromas e cores, (Quadro-1).

Quadro 1- Classificação Botânica da espécie *O. basilicum*

Taxonomia	Classificação
Divisão	Angiospermae
Classe	Eucotiledonea
Ordem	Lamiales
Família	Lamiaceae
Gênero	Ocimum
Espécie	<i>Ocimum basilicum</i> L.

Fonte: Silva (2000)

Popularmente o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é denominado também de alfavaca, basilico, manjeriço-comum e manjeriço-de-folha-larga, manjeriço-doce, remédio-de-vaqueiro, segurelha, alfavaca-da-américa, erva-real, basilico-grande, alfavaca-cheirosa.

Caracterizado como uma planta vivaz, herbácea, fortemente aromática, que pode ser anual ou perene conforme o local de plantio. Pode alcançar até 1,5 m de altura, com caule ramificado; folhas opostas, glabras, ovais ou pecioladas, de coloração verde-escura; flores brancas, rosadas ou purpúreas e arranjadas em inflorescências e fruto seco. Sua floração se estende por praticamente todo o ano (Pirani & Cortopassi-Laurino, 1993).

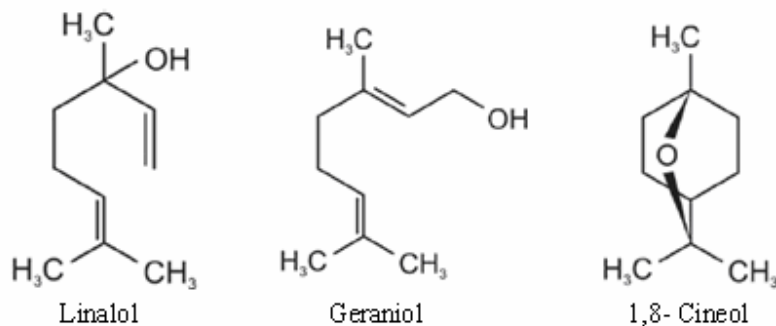
O manjeriço ‘Maria Bonita’ do presente estudo possui comprimento médio de folhas de 6,5 cm e largura de folhas de 2,8 cm, largura média da copa de 45,70 cm, diâmetro médio do caule de 1,32 cm, altura média de 45,50 cm e hábito de crescimento ereto, o que em conjunto, favorece a colheita manual e mecanizada. Possui aproximadamente 85% de umidade nas folhas e inflorescências de 80% no caule, com ciclo médio de 80 dias para o florescimento, peso médio de sementes de 1,90 g por planta e peso médio de 1000 sementes de 0,90 g (Blank et al., 2007), (Figura 1). A propagação pode ocorrer por sementes ou estacas herbáceas.



**FIGURA 1:** Aspecto da planta (a) e da inflorescência (b) de *Ocimum basilicum* L. 'Maria Bonita' cultivada em casa de vegetação, Lavras, MG. 2009. Foto: José Eduardo Brasil P. Pinto.

Apresenta propriedade medicamentosa atuando contra resfriados, tosses, gastrites, expectorante, suas folhas são utilizadas como tempero culinário e produzem um óleo essencial com vários princípios ativos adicionado no preparo de perfumes, cosméticos, repelentes de insetos e possui ação anestésica local em medicação odontológica e potencial atividade anti-giardial (Rabelo et al., 2003; Nakamura et al., 1999; Sahoo et al., 1997; Silva et al., 2003; Almeida et al., 2007).

A qualidade da planta de manjeriço é definida pela composição de seu óleo essencial (Carvalho Filho et al., 2006). O óleo essencial deste apresenta substâncias de importância econômica, terapêutica e condimentar, como estragol, metil-chavicol, linalol, lineol, alcanfor, cineol, eugenol, timol, citral e pineno; e dependendo da presença e da quantidade destas substâncias, será o fator determinante da qualidade e conseqüentemente do preço da matéria-prima. Contém também taninos, saponinas, flavonóides, ácido caféico e esculosídeo (Teske & Trentini, 1995; Menezes Jr., 2005). Os principais constituintes químicos encontrados na cultivar 'Maria Bonita' são linalol, geranoil, 1,8 cineol (Blank et al., 2007), (Figura 2).



**FIGURA 2:** Estruturas dos principais componentes do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. Lavras, MG, 2009.

O desenvolvimento de metodologias de micropropagação é um meio efetivo para multiplicação rápida de espécies nas quais é necessário obter alta uniformidade de progênie. Então há um grande interesse de utilização destas técnicas para ampliar a propagação de plantas medicinais e aromáticas (Manthell et al., 1994). Associada a esta técnica deve-se levar em consideração etapas de colheita, beneficiamento e armazenagem, pois o manejo adequado destas etapas pode evitar perdas além de contribuir para a preservação do produto final.

Tendo em vista as considerações iniciais, desenvolveu-se o presente trabalho com o objetivo de contribuir com informações que possam promover um protocolo mais eficiente de propagação, secagem, beneficiamento pós-colheita e utilização alelopática do óleo essencial de *O. basilicum* L.

Especificamente, objetivou-se realizar os seguintes estudos com a referida espécie:

- Avaliar o efeito dos reguladores de crescimento na micropropagação do manjeriço.
- Verificar o efeito do tipo de processamento e secagem no teor e composição química do óleo essencial do manjeriço.



- Estudar o efeito alelopático do extrato aquoso e óleo essencial das folhas frescas de *O. basilicum* no índice de velocidade de germinação, comprimento de raízes e porcentagem de germinação de alface (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), e melissa (*Melissa officinalis* L.).

-Avaliar o efeito do tipo de embalagem no período de armazenamento da droga vegetal no teor e composição química do óleo, assim como verificar se os diferentes ambientes de armazenamento afetam na composição química do óleo essencial do manjeriço.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I. de; ALVIANO, D.S.; VIEIRA, D.P.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; LOPES, A.H.; ALVIANO, C.S.; ROSA, M.S. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. **Parasitology Research**, Berlim, v.101, n.2, p.443-452, July. 2007.

BLANK, A.F.; SOUZA, V.M.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PAULA, J.W.A.; ALVES, P.B. Maria Bonita: cultivar de manjeriço tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.1811-1813, nov. 2007.

CARVALHO FILHO, J.L.S.; ALVES, P.B.; EHLERT, P.A.D.; MELO, A.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R.; BLANK, A.F. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.16, n.1, p.24-30, jan./mar. 2006.

KAMADA, T. **Plasticidade fenotípica da morfologia e do óleo essencial em acessos de manjeriço (*Ocimum spp*)**. 1998. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333 p.

MENEZES JR., A. **Manjeriço: *Ocimum basilicum***. 2005. Disponível em <<http://www.jperegrino.com.br/Fitoterapia/manjericao.htm>>. Acesso em: 04 jun. 2008.

NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BANDO, E.; MELO, A.F. N.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.5, p.675-678, jan./set. 1999.

PIRANI, J.R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 1993. 192 p.

RABELO, M.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.G.; MIRANDA, A.V.; MATOS, F.J.A.; CRIDDLE, D.N. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae). **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.36, n.4, p.521-524, Apr. 2003.

SAHOO, Y.; PATTNAIK, S.K.; CHAND, P.K. Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.69, p.85- 98, Mar. 1997.

SILVA, F.G. **Teor de fenóis e óleos essenciais em calos, plântulas e plantas em carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C. Asteraceae]**. 2005. 132 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, F.; SANTOS, R.H.S.; DINIZ, E.R.; BARBOSA, L.C.A.; CASALI, V.W.D.; LIMA, R.R. Teor e composição do óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) em dois horários e duas épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.6, p.33-38, 2003.

SILVA, F. **Óleo essencial e conservação pós-colheita de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) em dois horários e duas épocas de colheita**. 2000. 80 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

STEFANINI, M.B.; RODRIGUES, S.D.; MING, L.C. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.1, p.18-23, mar. 2002.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Compêndio de fitoterapia**: Herbarium. 2. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995. 317 p.

**CAPÍTULO II**  
**ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* DO MANJERICÃO ‘MARIA**  
**BONITA’**

## 1 RESUMO

ROSADO, Luciana Domiciano Silva. Aspectos do cultivo *in vitro* do manjeriço 'Maria bonita'. In: \_\_\_\_\_ **Micropropagação, pós-colheita e efeito alelopático do manjeriço 'Maria Bonita'**. 2009. p.8-23. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Com o objetivo de avaliar a influência de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Ocimum basilicum* L. 'Maria Bonita' foram conduzidos dois experimentos. O primeiro com o objetivo de verificar o efeito dos reguladores de crescimento (BAP e ANA) na propagação *in vitro* dessa cultivar de manjeriço nas seguintes concentrações (0,0; 0,5; 0,1 mg L<sup>-1</sup>) e o segundo avaliar as diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L<sup>-1</sup>) na indução de calos em explantes foliares. Os experimentos foram implantados em delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro composto por 9 tratamentos e o segundo com 4. No primeiro experimento, avaliou-se o comprimento; as biomassas fresca e seca das brotações; e as biomassas fresca e seca dos calos. No segundo avaliou-se as biomassas fresca e seca dos calos. Observou-se que o comprimento das brotações e biomassas fresca e seca das mesmas foi superior na ausência de regulador de crescimento. Com relação à presença de calos em segmentos nodais, a melhor concentração a ser utilizada foi 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA e 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP combinados. A maior biomassa fresca (2,10g) de calos em explantes foliares de manjeriço foi obtido com meio MS suplementado com 1,26 mg L<sup>-1</sup> do ácido 2,4-D. A maior biomassa seca (1,18g) de calos em explantes foliares foi obtido com 0,31mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Com o aumento das concentrações de 2,4-D houve uma tendência de decréscimo tanto na biomassa fresca quanto seca.

**Termos para indexação:** *Ocimum basilicum* L., propagação *in vitro*, reguladores de crescimento.

\*Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

## 2 ABSTRACT

ROSADO, Luciana Domiciano Silva. Aspects of the *in vitro* cultivation of sweet basil 'Maria Bonita'. In: \_\_\_\_\_ **Micropropagation, post harvest and allelopathic effect of basil 'Maria Bonita'**. 2009. 8-23p. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

With the objectives of evaluating the influence of growth regulators on the *in vitro* multiplication of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) 'Maria Bonita', two experiments were conducted. The first one with the objective of verifying the effect of the growth regulators on the formation of sweet basil seedlings (BAP and NAA) in the following concentrations (0.0; 0.5; 0.1 mg L<sup>-1</sup>) and the second one with the purpose of evaluating the different concentrations of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (0.0; 0.5; 1.0; 2.0 mg L<sup>-1</sup>) in leaf explant induction. The experiments were established in a completely randomized block design, the first treatment consisting of 9 treatments and the second one of 4. In the first experiment, the length, dry and fresh of the biomasses of the shoots and the calluses' dry and fresh biomasses were evaluated. In the second experiment, the fresh and dry biomasses of the calluses was evaluated. It was found that shoot length and dry and fresh biomasses of them was superior in the absence of growth regulators. With relation to the presence of calluses on nodal segments, the best concentration to be used was 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA and 0.5mg L<sup>-1</sup> BAP combined. The greatest fresh biomass (2,10g) of calluses on leaf explants of basil was obtained in MS medium supplied with 1.26 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. the greatest fresh biomass (1,18g) of calluses on leaf explants was obtained with 0.31 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D . With increasing concentrations of 2,4 D, there was a decreasing trend both in fresh and dry biomass.

**Index terms:** *Ocimum basilicum* L., propagation *in vitro*, growth regulators.

\*Major Professor: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

### 3 INTRODUÇÃO

O *Ocimum basilicum* L. pertencente à família Lamiaceae têm sido alvo de muitas pesquisas devido às características importantes que incluem a utilização na área alimentar, de fármacos, cosméticos e perfumaria (Rabelo et al., 2003). É um arbusto popularmente conhecido como manjerição ou alfavaca, espécie muito valorizada pela qualidade de óleo essencial e aroma que produz. Segundo Blank et al. (2007) o óleo essencial de manjerição ‘Maria Bonita PI 197442’ apresenta elevado rendimento de óleo essencial comparado a outras cultivares e possui substâncias de importância econômica, terapêutica e condimentar, como linalol, geraniol e 1,8 cineol.

Apesar da facilidade de se obter muda pelo método convencional através de sementes e estacas, os plantios com a espécie precisam ser formados a fim de se obter características de interesse, entre as quais devem apresentar fuste reto e crescimento uniforme, com isso melhorando seu rendimento (Reis et al., 2007). Assim, o desenvolvimento de metodologias de micropropagação é um meio efetivo para multiplicação rápida de espécies nas quais é necessário obter alta uniformidade da progênie. Então há um grande interesse de utilização destas técnicas para ampliar a propagação de plantas medicinais e aromáticas (Mantell et al., 1994).

A composição do meio de cultura, assim como a concentração dos seus componentes, é fundamental para o desenvolvimento dos tecidos (Caldas et al., 1998). Os reguladores de crescimento utilizados para induzir à proliferação de brotos são as citocininas. Tanto o tipo de citocinina quanto a concentração do regulador influenciam a resposta *in vitro*, sendo necessária a avaliação de distintas combinações para a otimização das condições de micropropagação de uma planta (Pereira, 2004).

Segundo Torres et al. (1998) o acréscimo de reguladores de crescimento ao meio de cultivo é utilizado para suprir possíveis deficiências endógenas e melhorar as características de cultivo *in vitro*. As concentrações ideais de ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (benzilaminopurina) para o estabelecimento de calos variam muito de acordo com o genótipo, explantes e interação com outros fitoreguladores. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento.

Pela importância medicinal e econômica do manjeriço, o presente trabalho teve por objetivo estabelecer as melhores concentrações e combinações de fitoreguladores adicionados ao meio de cultivo *in vitro*, almejando a obtenção de plântulas com melhores qualidades morfológicas e fisiológicas para posterior aclimatização. Visou avaliar também diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4 diclofenoxiacético) na indução de calos de manjeriço com intenções de induzir embriogênese somática futuramente.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

##### **Experimento 1: Avaliação de diferentes concentrações de ANA e BAP no desenvolvimento *in vitro* de segmento nodal do manjeriço ‘Maria Bonita’.**

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) - da Universidade Federal de Lavras – (UFLA), MG.

Os explantes utilizados para a instalação do experimento foram obtidos a partir de plântulas oriundas de manjeriço ‘Maria Bonita PI 197442’ pré-estabelecidas *in vitro* por 30 dias. Foram utilizados os segmentos nodais da parte mediana com 1 cm de comprimento, sendo inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 12 mL do meio MS (Murashige & Skoog, 1962),

com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e suplementado com os reguladores de crescimento ANA e BAP .

Foram avaliadas três concentrações (0,0; 0,1; 0,5 mg L<sup>-1</sup>) de ambos reguladores de crescimento com as seguintes combinações: T<sub>1</sub> ( 0,0 ANA e 0,0 BAP), T<sub>2</sub> ( 0,0 ANA e 0,1 BAP), T<sub>3</sub> ( 0,0 ANA e 0,5 BAP), T<sub>4</sub> ( 0,1 ANA e 0,0 BAP), T<sub>5</sub> (0,1 ANA e 0,1 BAP), T<sub>6</sub> ( 0,1 ANA e 0,5 BAP), T<sub>7</sub> (0,5 ANA e 0,0 BAP), T<sub>8</sub> ( 0,5 ANA e 0,1 BAP) e T<sub>9</sub> ( 0,5 ANA e 0,5 BAP). O pH foi ajustado para 5,7± 0,1 antes da autoclavagem.

Os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento a temperatura de 26± 1°C e fotoperíodo de 16h, sob intensidade luminosa de 25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> por um período de 30 dias.

O delineamento experimental aplicado foi o inteiramente casualizado (DIC) composto por 9 tratamentos, sendo cada tratamento composto por 5 repetições de 4 tubos cada, totalizando 20 tubos por tratamento.

Após 30 dias de cultivo, as variáveis analisadas foram comprimento das brotações, biomassa fresca e seca da parte aérea e biomassas frescas e secas de calos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott e Knott, a 5 % de probabilidade.

### **Experimento 2: Diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos de manjeriço (*Ocimum basilicum* L. ) em explantes foliares.**

Os calos foram obtidos utilizando-se explantes foliares provenientes de plântulas de manjeriço ‘Maria Bonita PI 197442’ pré-estabelecidas *in vitro* com 30 dias de idade em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962).

Os tratamentos testados foram meio MS com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> ágar e suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem.



Os explantes foliares com tamanho de 1 cm<sup>2</sup> de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 10 mL de meio de cultura. Após esta etapa, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25± 1<sup>o</sup>C e intensidade luminosa de 25µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. A avaliação da biomassa fresca foi realizada aos 30 dias após a inoculação do explante. Já a obtenção da biomassa seca dos calos foi realizada após a permanência dos mesmos em estufa durante 5 dias com a temperatura de 50 ± 2 <sup>o</sup>C.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos contendo 5 repetições sendo cada repetição composta por 4 tubos de ensaio contendo um explante por tubo. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2000), sendo realizada a análise de regressão polinomial.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Experimento I: Avaliação de diferentes concentrações de ANA e BAP no desenvolvimento *in vitro* de segmento nodal do manjericão 'Maria Bonita'.**

As diferentes combinações de ANA e BAP ao meio de cultura influenciaram significativamente (p< 0,05) no desenvolvimento do segmento nodal do manjericão para todas as variáveis analisadas (Tabela 1).

**TABELA 1:** Médias do comprimento das brotações (cm); da biomassa fresca e seca da parte aérea (g) e; biomassa fresca e seca de calos (g), submetidos a diferentes combinações de ANA e BAP ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Lavras, MG, 2009.

Trata- Mento	Tratamento ANA: BAP $\text{mg L}^{-1}$		Comprimento das brotações (cm)	Biomassa fresca aérea (g)	Biomassa seca aérea (g)	Biomassa fresca calos (g)	Biomassa seca calos (g)
T1	0,0	0,0	2,55a	1,32a	0,10a	0,00a	0,00a
T2	0,0	0,1	3,00a	1,20a	0,09a	0,38a	0,04a
T3	0,0	0,5	1,36b	1,16a	0,09a	0,35a	0,07a
T4	0,1	0,0	1,82b	0,91b	0,08b	0,00a	0,00a
T5	0,1	0,1	1,52b	0,85b	0,07b	0,76b	0,04a
T6	0,1	0,5	0,70c	0,53c	0,05c	0,95b	0,06a
T7	0,5	0,0	1,13c	0,91b	0,07b	0,21a	0,01a
T8	0,5	0,1	1,00c	0,37c	0,03d	3,36c	0,23b
T9	0,5	0,5	0,62c	0,24c	0,02d	4,11d	0,24b

\* Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott- Knott.

Pode-se inferir que a concentração e a combinação dos reguladores de crescimento testados e a sua interação com os níveis endógenos de hormônios presentes no explante são decisivos para o desenvolvimento das plântulas.

Conforme Pérez-Toreno et al. (2000), os efeitos decorridos do balanço entre os diferentes hormônios de crescimento sobre o desenvolvimento *in vitro* dependem do genótipo testado, tornando necessário o estudo individualizado para cada espécie ou cultivar.

Para a variável comprimento das brotações, os maiores comprimentos foram obtidos nos meios MS desprovidos de reguladores de crescimento e no meio com adição de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, os quais não diferiram estatisticamente.

Lima et al. (2007) estudando a influência dos reguladores de crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis* constatou que para o comprimento das plantas, as médias superiores foram obtidas nos tratamentos contendo  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP isolado e  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP em combinação com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. No entanto, estes não diferiram estatisticamente do meio sem

suplementação de reguladores de crescimento, sugerindo que para redução de custos, estes podem ser utilizados em baixas concentrações ou até mesmo eliminados do meio de cultura. Os resultados do presente trabalho são semelhantes aos encontrados por este autor, onde foi observado não haver necessidade da aplicação de regulador.

Não foram avaliadas variáveis relacionadas ao sistema radicular, pois o único tratamento que apresentou indução de formação de raízes foi o tratamento sem o acréscimo de regulador de crescimento (Figura 1).



**FIGURA 1:** Formação de brotações do manjericão em MS suplementado com os reguladores de crescimento T<sub>1</sub> (0,0 ANA e 0,0 BAP); T<sub>2</sub> (0,0 ANA e 0,1 BAP); T<sub>3</sub> (0,0 ANA e 0,5 BAP); T<sub>4</sub> (0,1 ANA e 0,0 BAP); T<sub>5</sub> (0,1 ANA e 0,1 BAP); T<sub>6</sub> (0,1 ANA e 0,5 BAP); T<sub>7</sub> (0,5 ANA e 0,0 BAP); T<sub>8</sub> (0,5 ANA e 0,1 BAP) e T<sub>9</sub> (0,5 ANA e 0,5 BAP). Lavras, MG, 2009. Foto: José Eduardo B. P. Pinto.

Segundo Beduhn (2005) na multiplicação de *O. basicum* L., o melhor meio para o cultivo *in vitro* desta espécie apresentou apenas ANA como regulador do crescimento, não havendo, portanto, a necessidade de BAP. Em relação a multiplicação da cultivar ‘Maria Bonita’ os melhores resultados foram

obtidos na ausência de reguladores de crescimento, pois não observou-se a presença de calos.

Em trabalho realizado por Rubin et al. (2007) sobre multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L, concluíram que baixas concentrações de ANA sem a adição de BAP no meio de cultivo foi favorável para a multiplicação *in vitro* de plantas de tomilho, proporcionando características morfológicas e fisiológicas desejáveis para a sua comercialização.

Em relação ao efeito das diferentes concentrações de BAP combinadas com ausência de ANA, para biomassa fresca e seca da parte aérea, doses de 0,1 mg L<sup>-1</sup> e 0,5 mg L<sup>-1</sup> não diferiram estatisticamente do tratamento sem os reguladores ANA e BAP obtendo-se maiores valores de biomassa fresca e seca da parte aérea. Para redução de custos e uma boa formação de brotos estes reguladores, podem ser utilizados em baixas concentrações ou até mesmo suprimidos (Tabela 1).

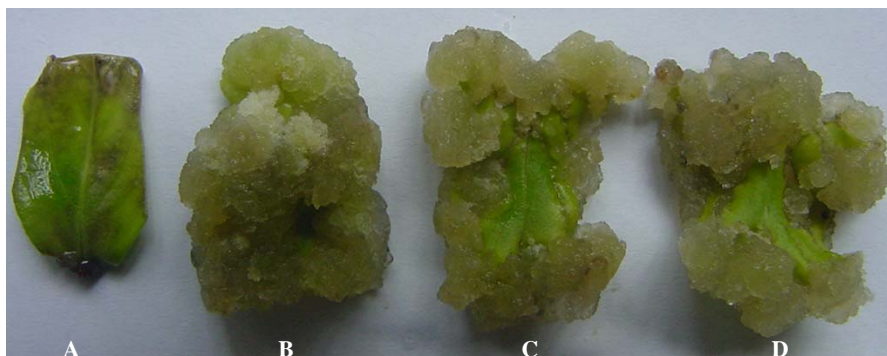
Normalmente os reguladores de crescimento podem induzir uma má formação de brotações e induzir a hiper-hidratação das mesmas, fato este observado neste experimento. Esse comportamento também foi observado por Dutra et al. (2004) em trabalhos de multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). Estes autores observaram que na medida em que os aumentava a concentração de BAP, houve redução de biomassa fresca da parte aérea. Resultado semelhante foi observado por Silva et al. (2001), relatando que os melhores resultados para o peso da matéria fresca da parte aérea foram obtidos com plantas cultivadas na ausência de BAP, concluindo que BAP pode exercer efeitos negativos no crescimento da parte aérea. Em outro trabalho, Rosal et al. (2007) estudando micropropagação em plantas de *Eremanthus erythropappus* concluíram que a proliferação de brotos foi melhor na presença de BAP e ANA, com 1,0 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que a alongação de brotos apicais foi obtida

apenas em meio contendo  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. A alongação de segmentos nodais foi induzida na presença de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA.

Com relação a presença de calos, concentrações de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e BAP induziram maior biomassa fresca no manjerição 'Maria Bonita'; para biomassa seca, os tratamentos T<sub>8</sub> e T<sub>9</sub> (Tabela 1) apresentaram maior valores de biomassa seca, entretanto não diferem estatisticamente entre si, podendo-se utilizar  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  ou  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP para o crescimento dos calos.

### **Experimento II: Diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) em explantes foliares.**

De acordo com análise de variância e teste de regressão, houve diferença significativa entre as concentrações de 2,4-D. Não houve crescimento de calos no tratamento sem suplementação dessa auxina (Figura 2 A), evidenciando com isso a importância da utilização do regulador de crescimento para indução da divisão celular, e conseqüentemente para formação de calos para a espécie em estudo. Observa-se a indução dos calos nas extremidades e sua proliferação em cima do explante. Os calos apresentaram consistência firme e uma coloração verde clara em todos os tratamentos, não sendo observada oxidação ou necrose. Isto mostra que as células estão viáveis para a repicagem e a continuação do processo de multiplicação (Figura 2).



**FIGURA 2:** Indução de calos em folhas de manjeriço em MS suplementado com diferentes concentrações do regulador de crescimento (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) do ácido 2,4 -D. Lavras, MG, 2009.

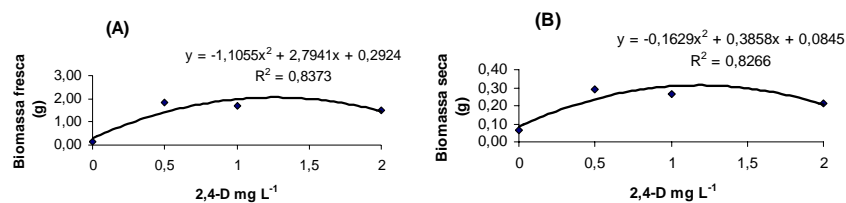
O regulador de crescimento 2,4-D aplicado aos explantes foliares de *O. basilicum* 'Maria Bonita' propiciou a indução de calos. Pereira et al. (2007) também observaram a necessidade da adição de reguladores de crescimento para a indução de calogênese em explantes foliares de *Uncaria guianensis*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Gopi et al. (2006) em experimento com explantes foliares de *O. basilicum* observando-se que a dose de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e a combinação de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP proporcionaram maior de indução de calos.

Em contrapartida, Stella & Braga (2002) relatam que as auxinas têm efeitos biológicos diferentes no explante, sendo ANA e AIB mais efetivas na indução de raízes, e 2,4-D na indução de calos fato este não observado para o manjeriço 'Maria Bonita'. Assim, a utilização de fitorregulador e da concentração a ser escolhida dependerá da espécie, do nível endógeno de auxina no explante e da capacidade do tecido em sintetizar naturalmente a auxina.

Com relação à biomassa fresca dos calos, observou-se um aumento de forma quadrática até o ponto máximo estimado de 2,10g na concentração de

1,26 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. À partir desse ponto ocorreu uma redução da biomassa fresca (Figura 3 A). Para a biomassa seca observou-se comportamento semelhante, onde houve um aumento da biomassa seca até o ponto máximo estimado de 0,31g na concentração de 1,18 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (Figura 3 B).



**FIGURA 3:** Biomassa fresca (A) e seca (B) de calos de manjeriço em função de diferentes concentrações de ácido 2,4-D. Lavras, MG, 2009.

A diminuição das biomassas fresca e seca dos calos com a utilização de concentrações elevadas do 2,4-D pode estar relacionada à fitotoxicidez causada por este regulador de crescimento. Esse comportamento também foi observado por Santos et al. (2005) estudando a indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd) no qual observaram, que na ausência de reguladores de crescimento não ocorrem a formação de calos friáveis e quando se acrescenta-se 6,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-D ocorre uma produção de 90 % de calos friáveis. Segundo Nogueira et al. (2007) trabalhando com calos de Muri-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) obtiveram melhor resultado com o uso de meio MS, acrescido de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, sendo semelhante a concentração neste trabalho.

## 6 CONCLUSÕES

Recomenda-se utilizar o meio MS sem suplementação com regulador de crescimento para obtenção de plântulas de manjeriço ‘Maria Bonita’ *in vitro*. O uso de reguladores de crescimento induz a formação de calos e reduz o crescimento das brotações.

Concentrações de 1,26 e 1,18 mg L<sup>-1</sup> proporcionaram maior biomassa fresca e seca de calos, respectivamente, em explantes foliares de manjeriço *O. basilicum* ‘Maria Bonita’.

## 7 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLANK, A.F.; SOUZA, V.M. de; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; PAULA, J.W.A. de; ALVES, P.B. Maria Bonita: cultivar de manjeriço tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.12, p.1811-1813, nov. 2007.

BEDUHN, F.A. **Estabelecimento e propagação *in vitro* de plantas medicinais da família Lamiaceae**. 2005. 58 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. A. Cultura de tecidos e meios nutritivos. In: TORRES, C.A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPH, 1998. p. 87-132.



- DUTRA, L.F.; OLIVEIRA, A.F.; FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de Oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.1, p.220-223, jan./fev. 2004.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Winddows 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.
- GOPI, C.; PONMURUMGAN, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.126, p.260-264, Nov. 2006.
- LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J. de M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M.V.; BENITEZ, L.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.669-671, jul. 2007. Suplemento.
- MANTELL, S.H.; MATTHESWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M. de; SOARES, G. de A.; SOARES, F.P.; CASTRO, A.H.F.; PAIVA, P.D. de O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, p.366-370, mar./apr. 2007.
- PEREIRA, R.C.A. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento dos biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow ex Roemer & Schultes DC e *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (Unha de gato)**. 2004. 186 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PEREIRA, R.C.A.; PINTO, J.E.B.P.; REIS, E.S.; CORRÊA, R.M.; BERTOLLUCI, S.K.V. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (UNHA DE GATO). **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.3, n.2, p.69-77, 2007.

- PÉREZ-TONERO, O.; EGEA, J.; VANOOSTENDE. Assesment of factores affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant Science**, Calcutta, v.158, n.1-2, p.61-70, Sept. 2000.
- RABELO, M.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.G.; MIRANDA, A.V.; MATOS, F.J.A.; CRIDDLE, D.N. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae). **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.36, n.4, p.521-524, May./Dec. 2003.
- REIS, I.N.R. de S.; LAMEIRA, O.A.; CORDEIRO, I.M.C.C. Indução da Calogênese em Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) Através da Adição de AIB e BAP. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.501-503, jul. 2007. Suplemento.
- ROSAL, L.F.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; COSTA, L.C.B.; CORRÊA, R.M. Micropropagation of the medicinal plant *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **HortScience**, Alexandria, v.42, n.6, p.1420-1424, 2007.
- RUBIN, S.; LIMA, C.S.M.; BANDEIRA, J. de M.; RIBEIRO, M.V.; BENITZ, L.C.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.480-482, jul. 2007. Suplemento.
- SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, P.D. de O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.510-514, maio/jun. 2005.
- SILVA, S.; SATO, A.; ESQUIBEL, M.A.; LAGE, C.L.S. Produção de mudas de *Melissa officinalis* L. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Congresso Ibero-americano de Biotecnologia Vegetal, 2001. p.74.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA/CBAB, 1998. 509 p.
- STELLA, A.; BRAGA, M.R. Callus and cell suspension culture of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.68, p.271 -276, 2002.

### **CAPITULO III**

#### **PROCESSAMENTO DA FOLHA E TIPO DE SECAGEM NO TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *OCIMUM* *BASILICUM* L. ‘MARIA BONITA’**

## 1 RESUMO

ROSADO, Luciana Domiciano Silva. Processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. 'Maria Bonita'. In: \_\_\_\_\_ **Micropropagação, pós-colheita e efeito alelopático do manjeriço 'Maria Bonita'**. 2009. p.24-39. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta medicinal aromática pertencente a família Lamiaceae rica em óleos essenciais com grande interesse industrial. O presente trabalho objetivou estudar a influência do processamento da folha (inteira e pulverizada) submetida a dois tipos secagem (estufa de ventilação forçada a 38<sup>0</sup>C e sala com desumidificador) sobre o teor e composição química do óleo essencial, assim como avaliar as características organolépticas do óleo de manjeriço 'Maria Bonita'. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos e 6 repetições. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação das folhas e analisado por GC e GC/MS. O tipo de secagem e o processamento da folha do *O. basilicum* influenciaram o teor e composição química do óleo essencial. Maior porcentagem da área de pico do componente químico linalol foi obtida quando se realizou o processo de secagem em relação as folhas frescas. A secagem em estufa conservou o aroma e a coloração verde das folhas preservando as características originais da cultivar.

**Termos para indexação:** Manjeriço, pós-colheita, planta medicinal

\* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

## 2 ABSTRACT

ROSADO, Luciana Domiciano Silva. Leaf processing and type of drying on the content and chemical composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. 'Maria Bonita'. In: \_\_\_ **Micropropagation, post harvest and allelopathic effect of basil 'Maria Bonita'**. 2009. 24-39p. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

The basil (*Ocimum basilicum* L) is an aromatic medicinal plant belonging to the family Lamiaceae rich in essential oils with a great industrial interest. The present work aimed to study the influence of the leaf processing (whole leaf and ground leaf) in two drying types (forced air oven-drying at 38°C and room using a moisture dryer) on the content and chemical composition of the basil essential oil as well as to evaluate the organoleptic characteristics of the oil of basil 'Maria Bonita'. The design used was the completely randomized with 4 treatments and 6 replicates. The essential oil was extracted by hydrodistillation of the leaves and analyzed by GC and GC/MS. It was observed that the drying type and the processing of the leaf of *O. basilicum* L influenced the content and chemical composition of the essential oil. Increased percentage of peak area of the chemical component linalool was obtained when the process of drying of the leaves was accomplished as compared with fresh leaves. The oven-drying conserved the aroma and green color of the leaves preserving the original characteristics of the cultivar.

**Index terms:** Basil, post-harvest, medicinal plants.

\* Major Professor: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

### 3 INTRODUÇÃO

O manjericão, *Ocimum basilicum* L., pertencente à família Lamiaceae, é uma planta anual originária do Sudoeste Asiático e da África Central, utilizada como planta medicinal, aromática, apresentando substâncias de interesse para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Matos & Lorenzo, 2003).

Na medicina popular, as espécies de manjericão são indicadas como estimulante digestivo, antiespasmódico, gástrico, galactagogo, béquico, carminativo (Sajjadi, 2006). Entretanto estudos recentes têm demonstrado grande potencial antimicrobial e capacidades antioxidantes têm sido investigadas (Sartoratotto et al., 2004; Políteo et al., 2007).

As folhas secas de *O. basilicum* fazem parte da composição de temperos ou são utilizadas isoladamente na culinária, especialmente em massas. O óleo essencial é empregado para a produção de xampus, sabonetes e perfumes; apresentando também propriedades inseticidas e repelentes (Teixeira et al., 2002; Marotti et al., 1996; Umerie et al., 1998).

São diversos os fatores que podem acarretar mudanças no teor de óleo essencial, nas propriedades terapêuticas e condimentares como; método de secagem, manejo pós-colheita, horário de colheita e local de cultivo (Cantwell & Reid, 1994). A secagem, se não realizada adequadamente, pode comprometer o teor dos princípios ativos. Uma vez que ela diminui a velocidade de deterioração do material, por meio da redução no teor de água, atuando regressivamente na ação das enzimas, possibilitando a conservação das plantas por maior tempo.

Costa et al. (2005) relatam que o estado de fragmentação do material vegetal também tem sua importância para a otimização extrativa, pois quanto maior a divisão, mais expostos estarão os princípios ativos. Como os óleos essenciais localizam-se em estruturas internas e/ou externas diversas, a fragmentação do material vegetal pode influenciar diretamente no rendimento extrativo.

Existem poucas informações dos agricultores e beneficiadores de plantas medicinais quanto ao processo de secagem, sendo este, muitas vezes realizado em temperaturas sem o controle devido ou na temperatura inadequada ao princípio ativo. Desse modo, o controle da qualidade pós-colheita das espécies medicinais, em relação ao processo de secagem, deve ser realizado de modo a não comprometer os princípios ativos das drogas vegetais, uma vez que, o alto teor de umidade residual acima de 10% base úmida, favorece o desenvolvimento de fungos e bactérias, no qual possibilita a atividade hidrolítica de diversas enzimas, as quais podem comprometer tais princípios (Simões, 1999).

Devido ao valor econômico que o óleo essencial de manjerição apresenta no mercado atual é de fundamental importância estudos de pós-colheita com esta espécie obtida de melhoramento. O objetivo desse trabalho compreendeu o estudo da influência do processamento da folha e tipo de secagem sobre o teor e composição química do óleo essencial de manjerição ‘Maria Bonita’.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

O trabalho foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos e plantas medicinais da UFLA. Sementes de *O. basilicum* ‘Maria Bonita PI197442’ pré-estabelecidas *in vitro* foram inoculadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6g L<sup>-1</sup> de ágar. Após 30 dias as plantas cultivadas *in vitro* foram aclimatizadas em bandejas de isopor contendo o substrato comercial Plantmax®. Posteriormente, as plantas foram transplantadas para vasos de 10 L com areia, Plantmax® e matéria orgânica na proporção (1:1:1), mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente. Plantas com cerca de dois meses de idade tiveram suas folhas colhidas aleatoriamente, às 8

horas da manhã durante o período de floração e submetidas a triagem para retirada de material estranho à droga vegetal.

Essas foram armazenadas em papel Kraft e submetidas a diferentes processos de secagem: (1) em estufa de circulação forçada de ar a 38<sup>o</sup>C por 5 dias e (2) em sala com desumidificador com temperatura ambiente para obtenção do peso constante, por um período de 10 dias, valor esse devido a alta umidade do ambiente causado pelas chuvas. Na secagem em estufa, as folhas inteiras de manjeriço foram dispostas uniformemente e acomodadas em sacolas de papel Kraft para uma secagem homogênea. No desumidificador, as folhas coletadas foram devidamente separadas e distribuídas sobre bandejas com moldura de madeira e fundo em tela de sombrite, a fim de permitir a circulação do ar. Terminada a secagem, realizou-se uma avaliação subjetiva das folhas, adotando-se como critérios odor e coloração. Logo após, o material vegetal foi dividido em duas porções: folhas inteiras (1) e folhas que foram pulverizadas em moinho de facas utilizando tamis com malha de 20 mesh (2).

#### **Extração do óleo essencial**

Amostras de 40g de folhas secas (inteiras ou pulverizadas) foram transferidas para balões de destilação de 2 L, contendo 1,5 L de água destilada. A extração do óleo essencial foi realizada pelo processo de hidrodestilação durante 90 min a partir da ebulição. Logo em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido, em funil de separação, realizando-se três lavagens do hidrolato com três porções de 15 ml de diclorometano por 10 min cada. As frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de magnésio anidro, deixando-o agir por 30 min, posteriormente, o sal foi removido por filtração simples e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente sob capela de exaustão de gases. Diante da massa obtida, determinou-se o teor percentual do óleo essencial pela fórmula:  $(T\% = \text{Massa do óleo (g)} / 40\text{g} \times 100)$ . Para a



extração do óleo essencial de folhas frescas utilizou-se 80 g, sendo a metodologia de extração a mesma descrita acima.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 2 (processamento do material vegetal e tipo de secagem), totalizando 4 tratamentos com 6 repetições, cada repetição composta por 40g de material seco, correspondente a cada tipo de processamento e secagem. Os resultados de teores foram expressos em porcentagem na matéria seca e analisados pelo software SISVAR (Ferreira, 2000), sendo a comparação de médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### **Análise por CG E CG/MS**

Amostras de óleo foram acondicionadas em frascos de vidro, vedados com papel alumínio, colocadas dentro do isopor e encaminhados à análise da composição química no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe. Por meio de uma amostra composta do óleo essencial das seis repetições de cada tratamento, foi determinada a composição química por cromatografia gasosa, utilizando-se aparelho Shimadzu 17A equipado com detector de ionização de chama (FID) e também por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), usando o aparelho Shimadzu QP5050A nas seguintes condições: coluna CBP-5 (Shimadzu) preenchida com coluna capilar de sílica (30m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25 $\mu$ m, filme composto defenilmetilpolisiloxano 5%) conectado a um detetor quadrupólo operando em modo EI a 70 eV com intervalo de massa entre 40-400  $\mu$ , a razão de 0,5 scan/s; gás carreador: He (1 ml min<sup>-1</sup>); injetor e temperatura de interface a 220°C e 240°C, respectivamente, com razão de fluxo 1:20. O volume de injeção foi de 0,2  $\mu$ l (20% em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) em fluxo e temperatura de 60°C a 246°C, com um aumento de 3°C min<sup>-1</sup>, após 10°C min<sup>-1</sup> para 270°C, mantendo a temperatura final por 5 min.

Os componentes foram identificados por comparação com dados de espectro de massa da literatura (Adams, 2001) e por base de dados computadorizada usando biblioteca NIST (1998). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos e expressos com valores aferidos em três análises.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao teor de óleo essencial, em função do processamento e tipo de secagem das folhas de manjeriço, houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no teor de óleo essencial para folha inteira e moída provenientes da secagem em estufa de ventilação forçada de ar. Observaram-se maiores teores da matéria seca da folha inteira (1,07%) em relação à matéria seca da folha moída (0,86%). Entretanto, a secagem em desumidificador, não apresentou diferenças nos teores de óleos essenciais nos dois processamentos avaliados (Tabela 1).

**TABELA 1:** Teor (%) médio de óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. em função de métodos de secagem e processamento da folha. Lavras, MG, 2009.

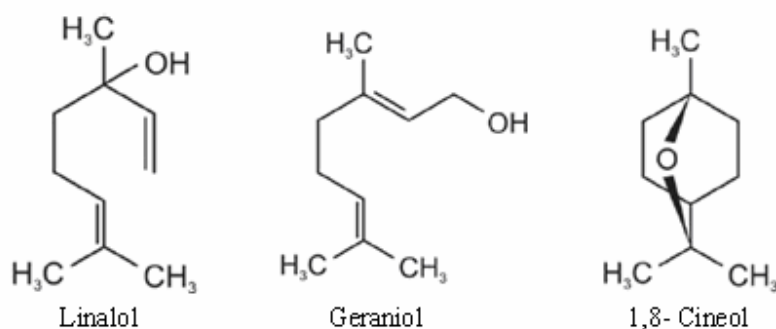
Secagem	Teor (%) no Processamento	
	Inteira	Moída
Estufa	1,07 A a	0,86 B a
Desumidificador	0,87 A b	0,94 A a

\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em plantas de manjeriço (Rosal et al., 2004), observaram o efeito de diferentes métodos de secagem no teor de óleo essencial de folhas e inflorescências, os quais verificaram que a secagem em estufa a 35<sup>0</sup>C permitiu maior teor de óleo essencial nesta espécie, em comparação com a secagem em desumidificador.

Em contrapartida, Corrêa et al. (2004) estudando o efeito da secagem (estufa a 35°C, secador solar 32°C, secagem mista 27°C e secagem à sombra 25°C), constatou menor teor de óleo essencial de *Vernonia polyanthes* na secagem realizada em estufa.

De acordo com Araújo (2004) as características organolépticas podem ser dadas pelos componentes majoritários e que o alto teor de monoterpenos presente na composição de um óleo essencial implica num produto instável, sensível à luz e ao calor. Fato este observado no óleo essencial do manjeriço ‘Maria Bonita’, que apresenta os compostos majoritários linalol, geraniol e 1,8 cineol que somados representam mais de 95,16% de todos os componentes químicos presentes no óleo essencial (Blank et al., 2007), (Figura 1).



**FIGURA 1:** Estruturas dos principais componentes monoterpenos presentes no óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. Lavras, MG, 2009.

Ao analisar as características organolépticas do óleo, a cultivar ‘Maria Bonita’ apresentou aroma agradável e forte, característico da planta, coloração incolor e baixa viscosidade. Também foi observado que nos materiais secos em estufa, houve um aroma mais intenso quando comparados a secagem promovida pelo desumidificador. A secagem das folhas em estufa foi mais rápida, preservando a coloração verde das folhas, com isso conservando o cheiro

característico da espécie. Na secagem em desumidificador o tempo de secagem foi maior, apresentando as folhas manchas escuras, provavelmente devido a alta umidade no período de condução do experimento.

Resultado semelhante foi observado por Costa et al. (1999) no qual avaliaram a secagem das folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) utilizando dois secadores: estufa e câmara com desumidificador. Estes autores concluíram que a secagem em estufa apresentou melhor qualidade quanto às características organolépticas, onde conservou a coloração esverdeada das folhas.

Foram observados por Radünz, et al. (2002), que a secagem em temperatura ambiente em relação a secagem em estufa, provocou alterações na coloração e odor das folhas de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), e que estas foram provocadas devido ao maior período de secagem e desenvolvimento de fungos. Resultados contrários as características originais da planta.

O óleo essencial de *O. basilicum* apresentou predominantemente monoterpenos oxigenados. Análises de GC- MS e GC- FID identificaram a presença de monoterpenos (1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, geraniol, linalol) e sesquiterpenos (acetato de isobornila, acetato de geranila,  $\alpha$ -trans-bergamoteno,  $\gamma$ -muuroleno,  $\gamma$ -cadieno e epi-  $\alpha$ -cadinol). Identificaram-se dois compostos majoritários, o linalol e o geraniol (Tabela 2).

**TABELA 2:** Percentagem da área relativa dos picos cromatográficos correspondentes aos compostos identificados no óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. em função de métodos de secagem e processamento da folha. Lavras, MG, 2009.

IK	Constituintes	Classe	Folhas frescas	Estufa		Desumidificador	
				Moída	Inteira	Moída	Inteira
1032	1,8-cineol	M	1,12	0,55	0,73	0,45	0,37
1099	linalol	M	78,35	81,69	80,85	84,34	82,21
1194	$\alpha$ -terpineol	M	0,59	0,79	0,83	0,75	0,81
1250	geraniol	M	15,94	12,41	14,37	12,17	13,85
1284	acetato de isobornila	S	-	-	0,25	0,24	0,27
1378	acetato de geranila	S	1,7	1,59	1,42	1,09	1,39
1432	$\alpha$ - <i>Trans</i> -bergamoteno	S	0,7	1,16	0,58	0,5	0,51
1780	$\gamma$ -muuroleno	S	-	0,4	-	-	-
1512	$\gamma$ -cadineno	S	0,2	0,49	0,24	-	-
1641	epi- $\alpha$ -cadinol	S	1,4	0,87	0,68	0,42	0,54
<b>Total dos picos dos monoterpénos (M)</b>			96,0	95,44	96,78	97,71	97,24
<b>Total dos picos dos sesquiterpenos (S)</b>			4,0	4,51	3,17	2,25	2,71
<b>Total dos Picos</b>			100	99,95	99,95	99,96	99,95

IK: Índice de Kovat

Foi observada uma diferença na porcentagem da área de picos na composição química do óleo essencial, comparando-se folhas frescas com folhas secas, uma vez que o teor de linalol sofreu um aumento na porcentagem da área de pico quando as folhas foram submetidas ao processo de secagem, ao contrário do que foi observado para o geraniol e 1,8-cineol no qual se obteve uma redução destes picos. Segundo pesquisas desenvolvidas por Semikolenov et al. (2003) o geraniol é convertido em linalol pelo processo de isomerização, uma vez que estes compostos são muito sensíveis a temperatura. Provavelmente, isto deve ter ocorrido no processo de secagem das folhas de manjeriço.

O linalol é o constituinte químico com maior porcentagem de área do pico do óleo essencial obtido nesta espécie. As porcentagens de área correspondentes ao composto não apresentaram diferenças consideráveis entre os processamentos utilizados e os métodos de secagem. Ao contrário do que foi observado para as áreas do pico correspondentes ao composto  *$\alpha$ -trans-bergamoteno* que apresentou área relativa de 1,16% na secagem em estufa utilizando-se folhas moídas, e 0,50% na secagem em desumidificador para este mesmo processamento.

Entre os dois tipos de secagem, a diferença principal na composição química do óleo essencial foi a presença dos compostos  $\gamma$ -muuroleno e  $\gamma$ -cadineno que não foram identificados nas folhas moídas e inteiras, quando secas em desumidificador. Por outro lado, na estufa, o composto acetato de isobornila não foi obtido na folha moída enquanto o  $\gamma$ -muuroleno não foi observado na folha inteira. A estufa garantiu melhor preservação dos constituintes do *O. basilicum* L. em relação ao outro método de secagem. Os demais constituintes do óleo essencial apresentaram teores muito baixos. Os dados obtidos das determinações qualitativas e quantitativas dos componentes principais presentes no óleo essencial de *O. basilicum* estão apresentados na (Tabela 2).

Resultados contrários foram obtidos por Asekun et al. (2007) estudando os efeitos de diferentes métodos de secagem (ao ar, sol e forno) na qualidade e quantidade do óleo essencial de *Mentha longifolia* L., onde o conteúdo de monoterpenos de folhas secas ao ar e ao sol representou rendimento de 93,3% e 91,8%, respectivamente e quando se utilizou a secagem no forno esse conteúdo diminuiu para 63,5%, sendo todos os tratamentos comparados com folha fresca (92%). As mudanças nas concentrações dos componentes voláteis dependem de vários fatores como método de secagem e classificação das plantas. O manjeriço pertencente à família Lamiaceae, armazena seus óleos essenciais próximos a superfície das folhas (Moyler, 1994). Pressupõe-se que temperaturas menores no desidratador poderiam contribuir para uma menor degradação das células oleíferas e conseqüentemente, preservarem os componentes químicos do óleo, fato este não observado para o manjeriço ‘Maria Bonita’.

## 6 CONCLUSÕES

O tipo de secagem e processamento da folha pouco influencia no teor e composição química do óleo essencial de manjeriço.

A secagem em estufa conservou as características organolépticas do manjeriço quanto ao aroma e coloração verde das folhas.

Maiores quantidades de linalol foram obtidas nas folhas submetidas ao processo de secagem em relação a folha fresca.

Os componentes majoritários do óleo essencial de *O. basilicum* L. nos devidos tratamentos foram o linalol e o geraniol.

## 7 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry**. Allured: Illinois, 2001. 421 p.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 416 p.
- ASEKUN, O.T.; GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A.J. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. Capensis. **Food chemistry**, Oxford, v.101, p.995-998, 2007.
- BLANK, A.F.; SOUZA, V.M.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PAULA, J.W.A.; ALVES, P.B. Maria Bonita: cultivar de manjerição tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.12, p.1811-1813, nov. 2007.
- CANTWELL, M.I.; REID, M. S. Postharvest physiology and handling of fresh culinary herbs. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, Amherst, v.1, n.3, 1994.
- CORRÊA, R.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P.; REIS, É.S.; ALVES, T.L. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.2, p.339-344, mar./abr., 2004.
- COSTA, C.C.; CASALI, V.W.D.; MACEDO, J.A.B. Qualidade de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) após secagem e embalagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.1, n.2, p.1-5, 1999.
- COSTA, L.C.B.; CORRÊA, R.M.; CARDOSO, J.C.W.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERRI, P.H. Secagem e fragmentação da matéria seca



no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.956-959, out./dez., 2005.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Winddows 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.

MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E. Differences in essential oil composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) italian cultivars related to morphological characteristics. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.44, n.12, p.3926-3929, 1996.

MATOS, F.J.A.; LORENZO, H. **Plantas medicinais do Brasil:** nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 544 p.

MOYLER, D.A. Spices – recent advances. In: CHARALAMBOUS, G. **Spices, herbs and edible fungi**. Amsterdam: Elsevier, 1994. p.1-70.

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

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version of the NIST/ EPA/NIH Mass Spectral Database**. Gaithersburg, MD: U. S. Department of Commerce, 1998.

POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food chemistry**, Oxford, v.101, n.1, p.379-385, 2007.

RADÜNZ, L.L.; MELO, E.C.; MARTINS, P.M.; SANTOS, R.H.S.; SANTOS, R.R.; MACHADO, M.C. Secagem de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em secador de leito fixo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.5, n.1, p.79-82, out. 2002.

ROSAL, L.F.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; SOARES, G.A.; BARROS, T.A. Teor de óleo essencial de folhas e inflorescências de basilicão sob diferentes métodos de secagem. In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 8., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004.

SAJJADI, S.E. Analysis of the essential oil of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. **Daru**, Iran, v.14, n.3, p.128-130, 2006.

SARTORATOTTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.275-280, Oct./Dec. 2004.

SEMIKOLENOV, V.A.; ILYNA, I.I.; MAKSIMOVSKAYA, R.I. Linalool to geraniol/nerol isomerization catalyzed by  $(RO)_3VO$  complexes: studies of kinetics and mechanism. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v.204-205, p.201-210, Sep. 2003.

SIMÕES, D.E. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. São Paulo: Atheneu, 1999. 540 p.

TEIXEIRA, J.P.F.; MARQUES, M.O.M.; FURLANI, P.R.; FACANALLI, R. Essential oil contents in two cultivars of basil cultivated on NFT-hydroponics. **Acta Horticulturae**, São Pedro, v.569, p.203-208, Feb. 2002.

UMERIE, S.C.; ANASO, H.U.; ANYASORO, L.J.C. Insecticidal potentials of *Ocimum basilicum* leaf extracts. **Bioresource Technology**, Oxon, v.64, n.3, p.237-239, 1998.

## **CAPITULO IV**

### **ALELOPATIA DO EXTRATO AQUOSO E DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DO MANJERICÃO 'MARIA BONITA' NA GERMINAÇÃO DE ALFACE, TOMATE E MELISSA**

## 1 RESUMO

ROSADO, Luciana Domiciano Silva. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjeriço 'Maria Bonita' na germinação de alface, tomate e melissa. In: \_\_\_\_\_ **Micropropagação, pós-colheita e efeito alelopático do manjeriço 'Maria Bonita'**. 2009. p.40-58. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito alelopático do extrato aquoso e óleo essencial das folhas frescas de *Ocimum basilicum* L. no índice de velocidade de germinação, comprimento de raízes e porcentagem de germinação da alface (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), e melissa (*Melissa officinalis* L.). Os extratos foram obtidos pela trituração das folhas frescas e o óleo essencial extraído por hidrodestilação das folhas durante 90 min. Foram utilizadas duas formas de aplicação, extrato aquoso e óleo essencial, cinco concentrações (0,0; 0,001; 0,01; 0,1 e 1,0% v/v), em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, com 25 sementes de cada espécie por placa, totalizando 25 parcelas para cada espécie. Através dos resultados obtidos pode-se concluir que os extratos aquosos de manjeriço apresentaram efeito inibitório apenas para o índice de velocidade de germinação do tomate e para comprimento de raízes da alface e da melissa. O óleo essencial do manjeriço apresentou potencialidades alelopáticas inibitórias em sementes de alface, tomate e melissa para o índice de velocidade de germinação, comprimento das raízes e porcentagem de germinação.

**Palavras-chave:** *Ocimum basilicum* L., alelopatia, composição química.

\* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

## 2 ABSTRACT

ROSADO, Luciana Domiciano Silva. Allelopathy of the water extract and essential oil leaves basil (*Ocimum basilicum* L.) on the germination lettuce, tomato and melissa. In: \_\_\_\_\_ **Micropropagation, post harvest and allelopathic effect of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) ‘Maria Bonita’**. 2009. 40-58 p. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

The objective of this work was to study the allelopathic effect of water extract and essential oil of the fresh leaves of *Ocimum basilicum* L. on the germination velocity rate, root length and percentage of germination of three species, lettuce (*Lactuca sativa* L.), tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and melissa (*Melissa officinalis* L.). The extracts were obtained by the grinding of fresh leaves and essential oil extracted by hydrodistillation of the leaves for 90 min. Two application forms, water extract and essential oil, five concentrations (0.0; 0.001; 0.01; 0.1 and 1.0% v/v), in completely randomized design, with five replicates, with 25 seeds of each species per dish were utilized, amounting to 25 plots for each species. Through the obtained results, one can conclude that the water extracts of sweet basil presented effect inhibitory only for the germination velocity rate of the tomato and for root length of the lettuce and melissa. The basil essential oil presented allelopathic inhibitory potentialities in seeds of lettuce, tomato and melissa for germination velocity rate, root length and germination percentage.

**Key words:** *Ocimum basilicum* L., chemical composition, allelopathy.

\* Major Professor: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

### 3 INTRODUÇÃO

A alelopatia tem sido descrita como um processo pelo qual produtos do metabolismo secundário de um determinado vegetal são liberados, impedindo a germinação e o desenvolvimento de outras plantas relativamente próximas (Soares & Viera, 2000).

O princípio ativo das plantas medicinais e aromáticas é mediado por meio de substâncias químicas pertencentes a diferentes categorias de compostos, tais como fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, entre outros (Periotto et al. 2004). Quando estes compostos apresentam alguma propriedade inibitória, pode afetar a germinação de sementes de várias espécies, sendo a sensibilidade destas, variável com a concentração aplicada (Hruska et al. 1982).

Pesquisas têm demonstrado os efeitos dos extratos aquosos e dos óleos essenciais sobre a germinação de diferentes espécies (Piccolo et al., 2007; Maraschin-Silva & Aquila, 2006; Alves et al., 2004; Souza Filho et al., 2006). Na maioria das espécies, o efeito alelopático é mais evidente quando utilizados extratos de folhas (Souza et al., 2007).

O *Ocimum basilicum* L. ‘Maria Bonita’ é uma planta aromática e medicinal pertencente à família Lamiaceae. Conhecida popularmente como manjeriço ou alfavaca, apresenta grande importância econômica. O óleo essencial presente nesta cultivar apresenta elevada quantidade de linalol 82,64% (Blank et al., 2007) e é usado no preparo de perfumes, cosméticos, repelentes de insetos, anti-inflamatório, dentre outras (Teixeira et al., 2002; Rabelo et al., 2003).

As investigações de plantas com atividade alelopática podem ser úteis na busca de fitotoxinas com potencial para compor novos agroquímicos, sendo altamente importante a realização de pesquisas nesse campo para se conhecer os mecanismos de ação, produção e decomposição de compostos alelopáticos.

Pouco se sabe sobre os efeitos alelopáticos do óleo essencial de manjeriço (*O. basilicum* L.) nas espécies cultivadas, portanto o objetivo do presente trabalho foi estudar os possíveis efeitos alelopáticos de extratos aquosos e do óleo essencial de manjeriço no índice de velocidade de germinação, comprimento das raízes e na porcentagem de germinação de alface (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e melissa (*Melissa officinalis* L.).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

O trabalho foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos e plantas medicinais da UFLA. Sementes de *O. basilicum* L. ‘Maria Bonita PI197442’ pré-estabelecidas *in vitro*, foram inoculadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6g L<sup>-1</sup> de ágar. Após 30 dias as plantas cultivadas *in vitro* foram aclimatizadas em bandejas de isopor contendo o substrato comercial Plantmax®. Posteriormente, as plantas foram transplantadas para vasos de 10 litros com areia, Plantmax® e matéria orgânica na proporção (1: 1: 1), mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente. Plantas com cerca de dois meses tiveram suas folhas colhidas na parte da manhã, levadas ao laboratório para obtenção do extrato aquoso da folha fresca e para extração do óleo essencial.

### **Obtenção dos extratos**

O extrato aquoso foi obtido, a frio por turbólise. Foram utilizados 150 g de folhas frescas para 1 L de água destilada.

Para obtenção do óleo essencial foram utilizados 40 g de massa fresca das folhas que foram transferidas para balões volumétricos de 2 L acrescentando

1,5 L de água destilada. Foram realizadas oito extrações do óleo essencial das folhas de manjeriço, obtendo-se no final uma amostra composta. Estas extrações foram realizadas pelo processo de hidrodestilação durante 90 min a partir da ebulição. Logo em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido, em funil de separação, realizando-se três lavagens do hidrolato com três porções de 15 mL de diclorometano por 10 min cada. As frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de magnésio anidro, deixando-o agir por 30 min e posteriormente, o sal foi removido por filtração simples e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente em capela de exaustão de gases.

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa conforme procedimentos descritos no Capítulo 3.

#### **Atividade alelopática**

O extrato aquoso e o óleo do manjeriço foram emulsionados com Tween 80, na proporção de 1:1. A partir da solução emulsionada foram obtidas soluções aquosas nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1 e 1,0% (v/v) e uma solução de Tween 80 a 1,0% (v/v) foi usada como controle.

Foram utilizadas para o teste de germinação, cinco repetições contendo 25 sementes de cada espécie, que foram semeadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro), tendo como substrato três folhas de papel de filtro, umedecidas com volume de água destilada equivalente a três vezes a massa do papel seco. Logo após a semeadura da alface, tomate e melissa, 3 mL da solução de cada concentração do extrato aquoso e do óleo essencial foram distribuídos em dois papéis de filtro, colados na tampa da placa, ou seja, na parte superior evitando o contato direto das sementes tanto com o óleo, quanto com o extrato. Em seguida, essas placas foram mantidas em sala de crescimento a temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de  $25 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ .



A avaliação do potencial alelopático do extrato aquoso e do óleo essencial foi realizada pela determinação do índice de velocidade de germinação, comprimento das raízes (cm) das plântulas e porcentagem de germinação.

A avaliação dos resultados foi realizada no primeiro dia em que as plantas começaram a germinar (protrusão da radícula) sendo esta ocorrência observada no terceiro dia após a semeadura. Avaliou-se por sete dias consecutivos a emissão da radícula para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG) e no sétimo dia o comprimento das raízes e a porcentagem de germinação.

#### **Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x5) com duas formas de aplicação e cinco doses do extrato e do óleo, com 5 repetições por tratamento, com 25 sementes por placa, sendo cada placa perfazendo uma parcela.

A porcentagem (G) e a velocidade (V) de germinação foram calculadas com o uso das seguintes fórmulas, conforme Laboriau & Valadares (1976).

$$a) G = (N/A).100$$

Onde: N = número total de sementes germinadas;

A = número total de sementes colocadas para germinar.

$$b) V = (\sum ni) / (\sum ni \cdot ti)$$

Onde: ni = Número de sementes germinadas dentro de um intervalo de tempo (ti-1) - (ti).

ti = tempo

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do teste de regressão não-linear, conforme SAS (1999).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, observou-se que a ação do extrato aquoso de folhas frescas de manjeriço para o índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de alface, tomate e melissa, demonstrou que não houve diferença estatística para a variável analisada em alface e melissa. Estudos recentes mostram que, embora a porcentagem final de germinação possa não ser significativamente afetada pela ação de aleloquímicos, o padrão de germinação pode ser modificado, verificando-se diferenças na velocidade e na sincronia da germinação de sementes submetidas a tais compostos (Santana et al., 2006). Entretanto, para o tomate apenas as concentrações 0,1 e 1.0% foram menores e estatisticamente diferentes, causando significativa redução no IVG em relação aos demais tratamentos, indicando assim menor vigor das sementes (Tabela 1 e Figura 1).

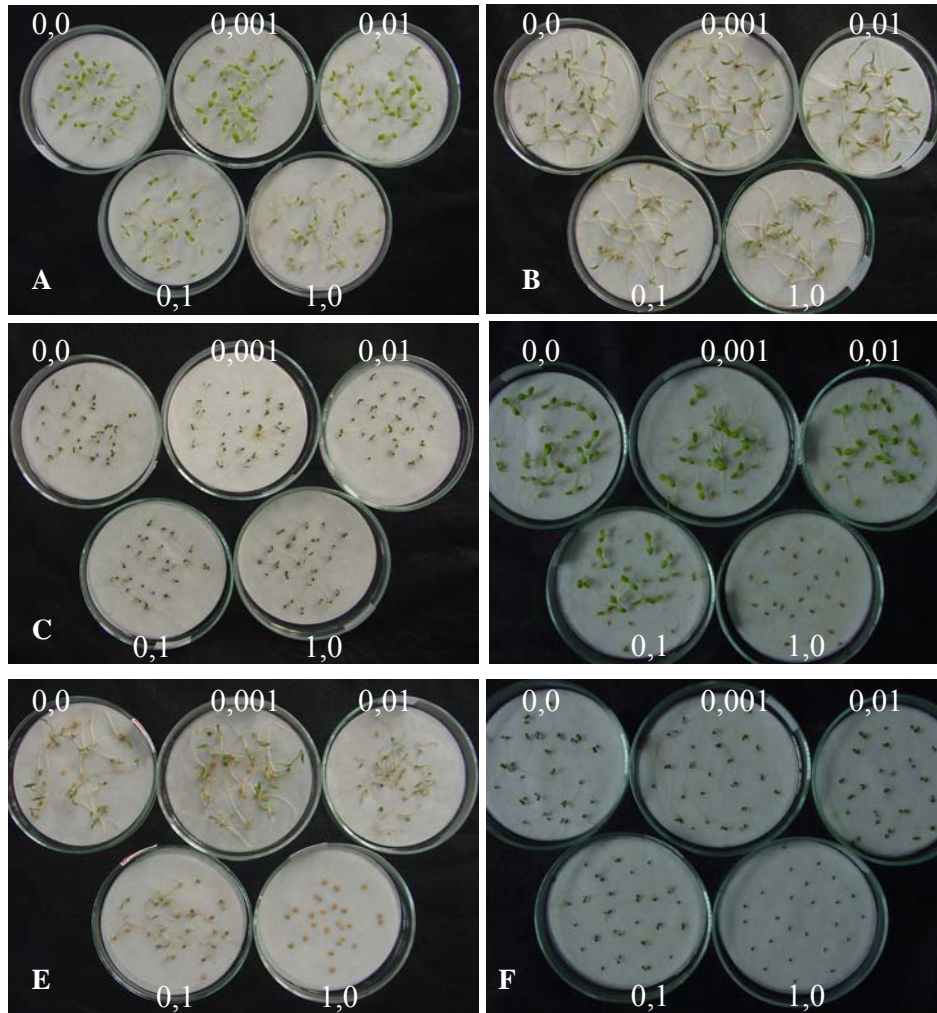
Para o comprimento das raízes houve diferença significativa para doses do extrato aquoso em sementes de alface e melissa (Tabela 1 e Figura1). Para alface as doses controle e 0,001%, proporcionaram os maiores comprimentos e para melissa a dose de 1% apresentou menor comprimento de raiz, evidenciando efeito alelopático para esta variável.

As porcentagens de germinação de alface, melissa e tomate não foram influenciadas pelas concentrações dos extratos aquosos de manjeriço (Tabela1 e Figura1).

**TABELA 1:** Médias do índice de velocidade de germinação de alface (IVG-A), tomate (IVG-T) e melissa (IVG-M); Comprimento das raízes da alface (CR-A), tomate (CR-T) e melissa (CR-M); e porcentagem de germinação da alface (Ger-A), tomate (Ger-T) e melissa (Ger-M) sob o efeito do extrato aquoso do manjeriçã. Lavras, MG, 2009.

Extrato aquoso (% V/V)	IVG-A	IVG-T	IVG-M	CR-A (cm)	CR-T (cm)	CR-M (cm)	Ger-A (%)	Ger-T (%)	Ger-M (%)
Controle	23,77 a	13,78 a	14,40 a	2,75 a	4,76 a	2,78 a	99 a	94 a	86 a
0,001	23,44 a	12,13 a	13,76 a	3,12 a	5,94 a	2,64 a	98 a	92 a	88 a
0,01	23,72 a	13,19 a	15,59 a	1,73 b	6,49 a	2,74 a	96 a	98 a	72 a
0,1	24,19 a	11,14 b	12,59 a	1,18 b	5,23 a	2,50 a	98 a	93 a	86 a
1	23,52 a	9,84 b	12,66 a	1,27 b	4,97 a	1,50 b	99 a	94 a	90 a

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.



**FIGURA 1:** Aplicação das diferentes doses do extrato aquoso (A, B e C) e do óleo essencial (D, E e F) do manjericão em sementes de alface (A e D), tomate (B e E) e melissa (C e F), Lavras-MG, 2009.

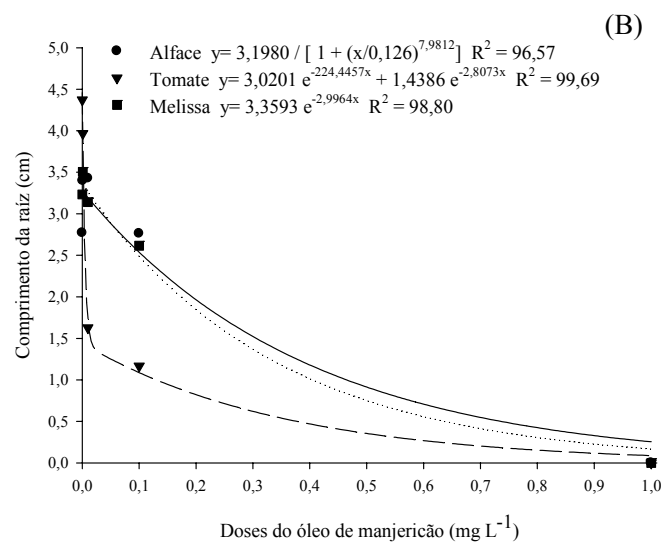
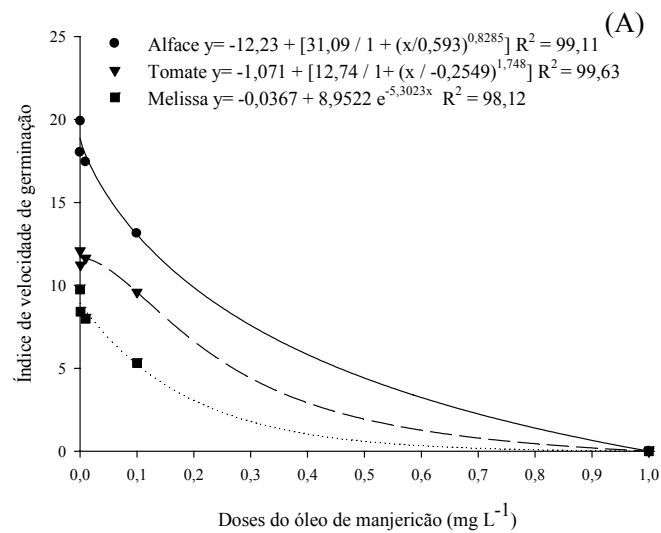
Segundo Rodrigues et al. (1999), os compostos alelopáticos são inibidores de germinação e crescimento, pois interferem na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas.

Lustosa et al. (2007) observou que para a variável porcentagem de germinação, tanto o extrato aquoso de *Piper aduncum* quanto o de *Piper tectoniifolium* mostraram efeito alelopático significativo sobre as sementes de alface, sendo que, quanto maior a concentração do extrato maior o número de sementes não germinadas. Pesquisas de Wandscheer & Pastorini (2008), verificaram que para sementes de tomate, somente o extrato de folha 10% reduziu a porcentagem de germinação e o comprimento radicular do epicótilo. No entanto, extratos de folhas e raiz 10% causaram atraso no processo germinativo e no número de plântulas germinadas por dia, sendo o extrato de folha 10% mais ativo.

Pessotto & Pastorini (2007) verificaram que para o índice de velocidade de germinação da alface não houve diferença significativa entre os tratamentos com extratos de funcho a 1% e a 10%. Entretanto, observou-se que nas sementes de alface submetidas ao tratamento com funcho a 30%, houve redução significativa do IVG em relação aos demais tratamentos, bem como o atraso no processo germinativo e a diminuição da porcentagem de germinação destas sementes. Não houve germinação das sementes de tomate submetidas ao extrato de funcho a 10% e a 30%, somente a 1%.

De acordo com análise de variância e teste de regressão não-linear, houve efeito significativo das doses do óleo essencial de manjeriço.

Com relação ao IVG e comprimento da raiz, observou-se redução nos valores destas variáveis com o incremento nas doses de óleo essencial, apresentando valores nulos na dosagem de 1,0 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de manjeriço 'Maria Bonita' (Figura 2).

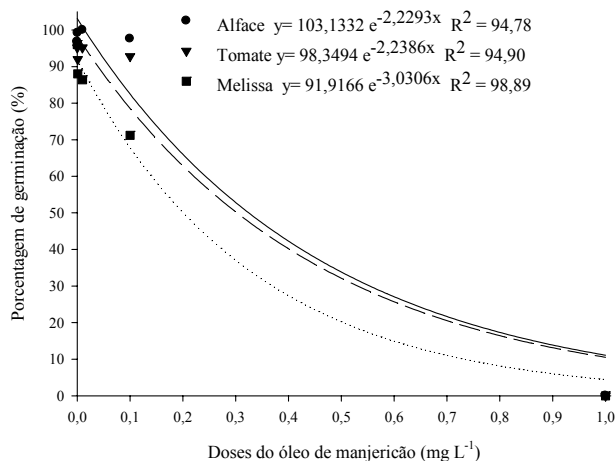


**FIGURA 2:** (A) Índice de velocidade de germinação (IVG) e (B) comprimento das raízes de sementes de alfafa, tomate e melissa submetidas a doses crescentes do óleo essencial de manjeriço. Lavras, MG, 2009.

O comprimento da raiz da alface, tomate e melissa foi significativamente menor no tratamento com óleo essencial de manjeriço a 1 %. Observou-se que tanto o epicótilo quanto o hipocótilo apresentaram-se pouco desenvolvidos. As folhas apareceram menores e mais escuras, porém na dose de 1% houve inibição completa da germinação, causando a morte da plântula, evidenciando que a ação de vários aleloquímicos está envolvida na inibição e em modificações nos padrões de crescimento ou desenvolvimento das sementes (Figura 1).

Alves et al. (2004), estudando a alelopatia de extratos voláteis do óleo essencial, na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface, observaram que em alfavaca-cravo, apenas a concentração de 1,0% do óleo essencial teve efeito inibitório significativo sobre a germinação da alface, sendo observado resultados semelhantes ao observado neste trabalho.

Para porcentagem de germinação observou-se comportamento semelhante ao descrito anteriormente para as demais variáveis (Figura 3). Nesse processo de germinação, juntamente com água, podem penetrar algumas substâncias alelopáticas capazes de inibir ou retardar a multiplicação ou crescimento das células, podendo também retardar a geminação (Gonzalez et al., 2002).



**FIGURA 3:** Porcentagem de germinação sementes de alface, tomate e melissa submetidas a doses crescentes do óleo essencial de manjeriço. Lavras, MG, 2009.

No que se refere à composição química, a análise por GC- MS do óleo de *Ocimum basilicum* ‘Maria Bonita’ identificou a presença de oito compostos, 1,8-cineol, linalol, geraniol,  $\alpha$ -Terpineol, acetato de geranila,  $\alpha$ -trans-Bergamoteno,  $\gamma$ -Cadineno e epi- $\alpha$ -Cadinol. As porcentagens de área dos picos correspondentes ao composto linalol é (78,35%) e geraniol (15,95%) sendo estes os componentes majoritários. Os dados obtidos das determinações qualitativas e quantitativas dos componentes principais presentes nas folhas frescas do óleo essencial de *O. basilicum* L. estão apresentados na (Tabela 2).



**TABELA 2:** Percentagem da área relativa dos picos cromatográficos correspondentes aos compostos identificados nas folhas frescas do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. Lavras, MG, 2009.

IK	Constituintes	Classe	GC- MS (%)
1031	1,8 - Cineol	M	1,12
1096	Linalol	M	78,35
1188	$\alpha$ -Terpineol	M	0,59
1252	Geraniol	M	15,94
1381	Acetato de geranila	S	1,7
1434	$\alpha$ -trans- Bergamoteno	S	0,7
1513	$\gamma$ -Cadineno	S	0,2
1640	epi- $\alpha$ -Cadinol	S	1,4
<b>% Total dos monoterpenos (M)</b>			<b>96,00</b>
<b>% Total dos sesquiterpenos (S)</b>			<b>4,0</b>

Estudos recentes no âmbito fitoquímico revelaram que espécies da família Lamiaceae como *Ocimum* sp apresentam quantidades expressivas de substâncias voláteis (Zabaras & Wyllie, 2001).

É possível que o monoterpeno linalol presente no manjeriço, por ser o componente majoritário, seja o responsável pelos efeitos fitotóxicos nas sementes e no crescimento inicial das plântulas de alface, tomate e melissa. Os monoterpenóides formam a maioria dos óleos essenciais das plantas e são, dentro desse grupo, os que têm sido identificados com maior potencialidade inibitória. Diversas espécies de *Salvia*, *Eucalyptus*, *Artemísia* e *Cassia occidentalis*, elaboram produtos voláteis tóxicos como canfeno, dipenteno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno que inibem o desenvolvimento de outras plantas (Almeida, 1988).

Singh et al. (2002) estudando o efeito de quatro monoterpenos - citronelol, citronelal, cineol e linalol na germinação, crescimento e fisiologia de *Cássia occidentalis* sugerem que citronelal e linalol possuem potencial fitotóxico mais forte.

Variações de respostas foram observadas por Scrivanti et al. (2003) trabalhando com óleo essencial *Tagetes minuta* e *Schinus areira*, que avaliaram o efeito dos agentes alelopáticos no crescimento de raízes de milho e verificaram que o *Tagetes minuta* foi mais fitotóxico no tempo de 24 horas, devido ao componente químico ocimenone presente neste óleo. Da mesma forma, Jiménez-Osornio et al. (1996) estudando a atividade alelopática de *Chenopodium ambrosioides* L. verificaram que o óleo essencial apresentou efeito inibitório de 50% na germinação *Phaseolus acutifolius* e também atribuíram este fato a presença de componentes químicos presentes nesta espécie.

Sikkema et al. (1995) relatam que interações com monoterpenos de hidrocarboneto cíclico provocam alterações na estrutura e função das membranas o qual pode impedir o crescimento e atividade das células.

## **6 CONCLUSÕES**

O extrato aquoso de manjerição apresentou efeito inibitório apenas para o índice de velocidade de germinação do tomate e para comprimento de raízes da alface e da melissa.

O óleo essencial do manjerição apresentou potencialidades alelopáticas inibitórias em sementes de alface, tomate e melissa para o índice de velocidade de germinação, comprimento das raízes e porcentagem de germinação.

## **7 AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry**. Allured: Illinois, 2001. 421 p.

ALMEIDA, F.S. de. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 60 p.

ALVES, M.C.S.; M. FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, nov. 2004.

BLANK, A.F.; SOUZA, V.M. de; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; PAULA, J.W.A. de; ALVES, P.B. Maria Bonita: cultivar de manjerição tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.12, p.1811-1813, nov. 2007.

GONZALEZ, H.R.; MEDEROS, D.M.; SOSA, I.H. Efectos alelopáticos de restos de diferentes espécies de plantas medicinales sobre la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) em condiciones de laboratorio. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, La Habana, v.7, n.2, p.67-72, May./Aug. 2002.

HRUSKA, A.F.; DIRR, M.A.; POKORNY, F.A. Investigation of anthocyanic pigments and substances inhibitory to seed germination in the fruit pulp of *Liriope muscari*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.107, p.468-473, 1982.

JIMÉNEZ-OSORNIO, F.M.V.Z. J.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, Inglaterra, v.24, n.3, p.195-205, 1996.

LABORIAU, L.G.; VALADARES, M.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.48, n.2, p.236-284, 1976.

LUSTOSA, F.L.F.; OLIVEIRA, S.C.C.; ROMEIRO, L.A. Efeito alelopático de extrato aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.849-851, jul. 2007. Suplemento.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M.E.A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.20, n.1, p.61-69, 2006.

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

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version of the NIST/ EPA/NIH Mass Spectral Database**. Gaithersburg, MD: U. S. Department of Commerce, 1998.

PERIOTTO, F.; CRISTINA, S.; PEREZ, J.G. de A.; LIMA, M.I.S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.18, n.3, p.425-430, 2004.

PESSOTTO, G.P.; PASTORINI, L.H. Análise da germinação de alface (*Lactuca sativa* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sob a influência alelopática do funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.990-992, 2007. Suplemento.

PICCOLO, G.; ROSA, D.M.; MARQUES, D.S.; MAULI, M.M.; FORTES, A.M.T. Efeito alelopático de capim limão e sabugueiro sobre a germinação de guaxuma. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.3, p.381-386, jul./set. 2007.

RABELO, M.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.G.; MIRANDA, A.V.; MATOS, F.J.A.; CRIDDLE, D.N. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae). **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.36, n.4, p.521-524, Apri. 2003.

RODRIGUES, L.R. de A.; RODRIGUES, T. de J. D.; REIS, R.A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Guaíba: FCAVJUNESP/FUNEP, 1999. 18 p.

SANTANA, D.G.; RANAL, M. A.; MUSTAFA, C. V.; SILVA, R. M. G. Germination measurements to evaluate allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**, Hisar, v.17, p.43-52, 2006.

SAS INSTITUTE. **Property software release 8**. Cary: [s.n.], 1999. 956 p.

SCRIVANTI, L. R.; ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A. Tagetes minuta and schinus areira essential oils as allelopathic agents. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.31, n.6, p.563-572, June 2003.

SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.59, n.2, p.201-222, 1995.

SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KAUR, S.; RAMEZANI, H.; KOHLI, R.K. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis*. **Annals of Applied Biology**, Loundon, v.141, n.2, p.111-116, Oct. 2002.

SOARES, G.L.G.; VIEIRA, T.R. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. "Grand rapids") por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.7, n.1, p.180-197, 2000.

SOUZA, C.S.M.; SILVA, W.L. de P.; GUERRA, A.M.N. de M.; CARDOSO, M.C.R.; TORRES, S.B. Alelopatia do extrato aquoso de folhas de aroeira na germinação de sementes de alface. **Revista Verde**, Mossoró, v.2, n.2, p.96-100, jun./dez. 2007.

SOUZA FILHO, A.P.S.; SANTOS, R.A.; SANTOS, L.S.; GUILHON, G.M.P.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, Viçosa, v.24, n.4, p.649-656, out./dez. 2006.

TEIXEIRA, J.P.F.; MARQUES, M.O.M.; FURLANI, P.R.; FACANALLI, R. Essential oil contents in two cultivars of basil cultivated on NFT-hydroponics. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.569, p.203-208, 2002.

WANDSCHEER, A.C.D.; PASTORINI, L.H. Interferência alelopática de *Raphanus raphanistrum* L. sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicon* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.949-953, jul. 2008.

ZABARAS, D.; WYLLIE, S.G. The effect of mechanical wounding of the composition essential oil from *Ocimum minimum* L. leaves. **Molecules**, Australia, v.6, p.79- 86, Jan. 2001.

## **CAPITULO V**

### **EMBALAGEM E AMBIENTE DE ARMAZENAMENTO NO TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA DROGA VEGETAL E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *OCIMUM BASILICUM* L. 'MARIA BONITA'**

## 1 RESUMO

ROSADO, Luciana Domiciano Silva. Embalagem e ambiente de armazenamento no teor e composição química da droga vegetal e do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. 'Maria Bonita. In: \_\_\_\_\_ **Micropropagação, pós-colheita e efeito alelopático do manjeriço 'Maria Bonita'**. 2009. p.59-84. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da embalagem de armazenamento no teor e composição química da droga vegetal, assim como avaliar o efeito dos diferentes ambientes de armazenamento na composição química do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L.. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 2 x 5 no primeiro ensaio, com 4 repetições. Os tratamentos do primeiro ensaio foram: dois tipos de embalagem (sacos de papel Kraft e sacos de polietileno) em 5 tempos de armazenamento (0, 3, 6, 9 e 12 meses). No segundo ensaio testaram-se 3 ambientes de armazenamento (geladeira, freezer e temperatura ambiente) nos seguintes tempos de armazenamento (2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses) na composição química do óleo essencial de manjeriço. Cada repetição constou de uma amostra composta. Para avaliar o teor de óleo essencial nos diferentes tratamentos foi realizado o teste de F ( $P < 0,05$ ) e análise de regressão. As embalagens não influenciaram no teor de óleo essencial. Com o passar do tempo de armazenamento, há uma redução do teor percentual de óleo essencial. Cada mês após a coleta das folhas secas armazenadas, ocorre um decréscimo de 0,1027 e 0,0974% no teor percentual de óleo essencial armazenados em papel e plástico respectivamente. Não houve diferença significativa na composição química do óleo entre os ambientes de armazenamento.

**Palavras-chaves:** Manjeriço, planta medicinal, pós-colheita, ambiente de armazenamento

\* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

## 2 ABSTRACT

ROSADO, Luciana Domiciano Silva. Packing and storage environment in the content and chemical composition of the vegetal drug and of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. 'Maria Bonita'. In: \_\_\_\_\_ **Micropropagation, post harvest and allelopathic effect of basil 'Maria Bonita'**. 2009. 59-84p. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

The purpose of this work was to evaluate the effect of the package storage on the chemical composition and content of the plant drug as well as to evaluate the effect of different storage environments on the oil of *Ocimum basilicum* L. Completely randomized complete design in a factorial scheme 2 x 5 was used in the first trial with 4 replications. The treatments of the first trial were: two types of packages (brown bags and plastic bags) in 5 times of storage (0, 3, 6, 9 and 12 months) In the second trial, 3 storage environments were tested (refrigerator, freezer and room temperature) in the following storage times (2, 4, 6, 8, 10 and 12 months) on the chemical composition of basil essential oil. Each replication consisted of a compound sample. To evaluate the essential oil content in the different treatments, F test ( $P < 0.05$ ) and regression analysis were conducted. The packages did not influence the essential oil content. As the storage time past by, there was a reduction in the essential oil percent content. Every month after the leaves had been collected, a decrease of 0.0374% and 0.0974 occurs in the percent content of essential oil stored in paper and plastic, respectively. There was no significant difference in the chemical composition of the oil among the storage environments.

**Index terms:** Basil, post-harvest, medicinal plants.

\* Major Professor: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA



### 3 INTRODUÇÃO

Entre as espécies arbustivas medicinais, destaca-se o *Ocimum basilicum* L., uma espécie com várias formas de utilização. Hoje em dia seu principal produto de interesse é o óleo extraído de suas folhas e inflorescências, apresentando um componente químico, linalol, largamente utilizado nas indústrias de cosméticos, como fixador de fragrâncias e como erva aromática, na medicina tradicional é freqüentemente usado como analgésico e antiinflamatório (Peanna et al., 2002).

Suas folhas são ainda utilizadas como medicinal, agindo contra problemas nas vias respiratórias, contra infecções bacterianas e parasitas intestinais, além de melhorar a digestão dos alimentos (Matos & Lorenzo, 2003).

A qualidade da planta medicinal é, primeiramente, determinada em função da sua base genética, do ambiente onde se desenvolve e do sistema produtivo adotado. Mas, as características que as plantas adquirem com o tempo podem receber influência desde a colheita até o armazenamento (Castro et al., 2004; Magalhães, 2001).

É de fundamental importância ter conhecimento sobre os processos pós-colheita, como secagem e armazenamento, aos quais podem interferir na qualidade do produto final. A armazenagem incorreta pode levar à perda de material, seja por motivos de ordem física ou biológica, podendo causar fermentações indesejáveis e contaminações por toxinas, que depreciam a qualidade do produto e dificultam sua comercialização.

De acordo com Silva & Casali (2000), a escolha de embalagens para armazenar as plantas depende da espécie, da quantidade e do destino da produção. Em cada espécie, estando seca ou fresca, existirá um ponto ótimo entre embalagem e tempo de armazenamento.

Existem poucas informações a respeito do prazo máximo de conservação de plantas medicinais secas e do óleo essencial a fim de se manter

a conservação dos princípios ativos. Por isso é importante que se conheça bem o comportamento de cada espécie, durante a fase de armazenamento (Martins et al., 1994).

Vale ressaltar que o padrão de qualidade dos óleos essenciais é uma das exigências do mercado consumidor, e quando o armazenamento é mal conduzido, pode causar sérias implicações sobre a qualidade do produto comercializado, uma vez que durante o armazenamento o teor de princípios ativos tende a diminuir qualitativamente e quantitativamente (Petrovick et al., 1997; Reis & Mariot, 2001).

Tendo em vista o promissor mercado brasileiro de plantas medicinais e a necessidade de conhecimentos específicos em relação às alterações na composição química do óleo essencial e da droga vegetal do manjeriço, o presente estudo tem por objetivo avaliar as consequências do uso de diferentes embalagens e ambientes de armazenamento sobre a qualidade final no teor e composição química do óleo essencial do *O. basilicum* L.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

##### **Experimento 1: Avaliação do tempo e embalagens de armazenamento da droga vegetal no teor e composição química do óleo essencial de manjeriço ‘Maria Bonita’.**

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) - da Universidade Federal de Lavras – (UFLA).

Foram utilizadas sementes de *O. basilicum* L. ‘Maria Bonita’ pré-estabelecidas *in vitro*, as quais foram inoculadas em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 12 mL do meio semissólido (6mg L<sup>-1</sup> de ágar) e MS (Murashige & Skoog, 1962). Após 30 dias as plantas cultivadas *in vitro* foram aclimatizadas

em bandejas de isopor de 128 células contendo o substrato comercial Plantmax®. Posteriormente, as plantas foram transplantadas para vasos de 10 L com areia, Plantmax® e matéria orgânica na proporção de (1:1:1), mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente. Plantas com cerca de 2 meses de idade tiveram suas folhas colhidas aleatoriamente, às 8 horas da manhã, durante o período de floração e submetidas a triagem para retirada de material estranho.

As folhas inteiras de manjeriço foram colocadas em papel Kraft e levadas para o processo de secagem: secagem em estufa de circulação forçada mantida a 38°C. Amostras de 18 gramas das folhas foram armazenadas e separadas nos respectivos tratamentos, saco de papel (Kraft) e em sacos plásticos (polipropileno). Posteriormente armazenadas em local fresco e seco em ambiente escuro com (temperatura de 26°C e umidade relativa de 60%). E para a extração do óleo essencial os tempos de armazenamento foram; (0; 3, 6, 9 e 12 meses).

Amostras de 18g de folhas secas foram transferidas para balões de destilação de 2 L, contendo 1,5 L de água destilada. A extração do óleo essencial foi realizada pelo processo de hidrodestilação durante 90 min a partir da ebulição. Logo em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido, em funil de separação, realizando-se três lavagens do hidrolato com três porções de 15 mL de diclorometano por 10 min cada. As frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de magnésio anidro, deixando-o agir por 30 min, posteriormente, o sal foi removido por filtração simples e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente sob capela de exaustão de gases. Diante da massa obtida, determinou-se o teor percentual do óleo essencial pela fórmula:  $(T\% = \text{Massa do óleo (g)} / 18\text{g} \times 100)$ .

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa conforme procedimentos descritos no Capítulo 3.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em parcela subdividida sendo a parcela as embalagens (2) e a subparcela os tempos de armazenamento (5), totalizando 10 tratamentos com 4 repetições.

Os resultados de teores foram expressos em porcentagem na matéria seca e analisados pelo software Sisvar<sup>®</sup> Ferreira (2000)- versão 4.3. As médias entre os tratamentos foram submetidas à análise de variância pelo teste de F ( $p < 0,05$ ) e análise de regressão.

### **Experimento 2: Influência dos diferentes ambientes e tempo de armazenamento na composição química do óleo essencial de manjeriço ‘Maria Bonita’.**

Amostras de 100g de massa fresca de folhas foram transferidas para balões de destilação de 2 L, acrescentando 1 L de água destilada. Foram realizadas doze extrações do óleo essencial das folhas de manjeriço, obtendo-se no final uma amostra composta. Os procedimentos de extração e análise de composição química do óleo essencial foram descritas anteriormente.

Amostras do óleo essencial das folhas do manjeriço foram armazenadas em frascos, nos respectivos tratamentos, geladeira (4 °C), freezer (-20 °C) e ambiente (25 °C) e vedadas com papel alumínio para evitar a incidência da luz. Para a análise cromatográfica, os tempos de armazenamento foram: 0, 2, 4, 6, 8 10 e 12 meses. A análise da composição química foi a mesma citada no experimento 1.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Experimento I: Avaliação das embalagens e tempo de armazenamento da droga vegetal no teor e composição química do óleo essencial de manjeriço ‘Maria Bonita’.**

Avaliando-se os tipos de embalagens, papel kraft e polietileno observou-se que não existe diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as embalagens. Indicando que ambas podem ser utilizadas no armazenamento do manjeriço (Tabela 1).

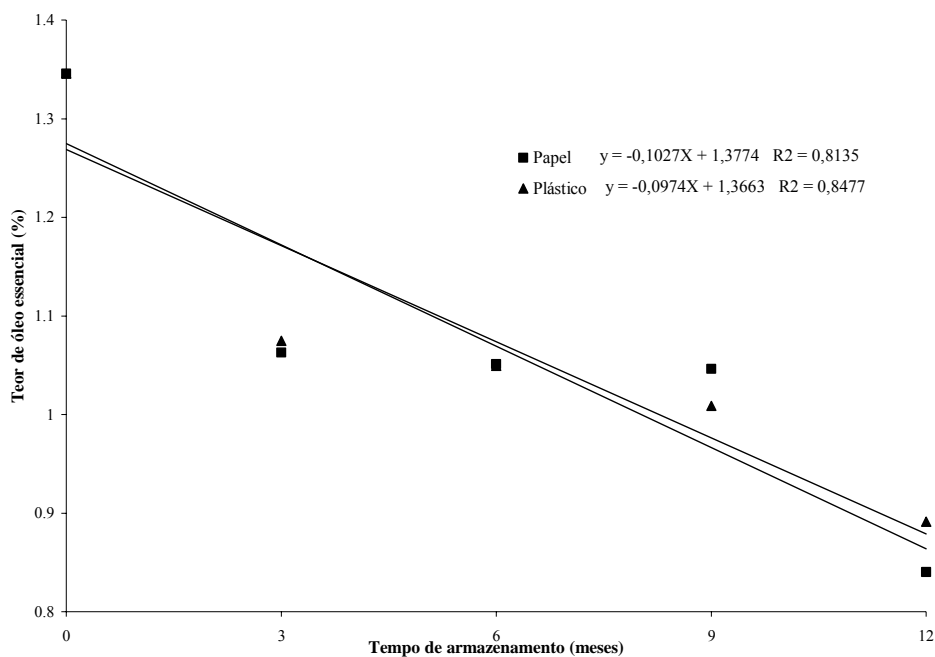
**TABELA 1:** Teor (%) médio de óleo essencial em folhas inteiras de *Ocimum basilicum* L. sob diferentes embalagens de armazenamento durante 12 meses. Lavras, MG. 2009.

<b>Embalagem</b>	<b>(%) Teor de óleo essencial</b>
Plástico	1,06 a
Papel	1,05 a

\*As médias não diferem entre si, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

Resultado obtido por Silva (2005), estudando o efeito das embalagens de vidro, plástico e papel Kraft no período de doze meses de armazenamento de calêndula (*Calêndula officinalis* L.) concluiu que as três embalagens mantiveram o teor de óleo essencial.

O teor de óleo essencial obteve uma resposta linear decrescente em relação ao tempo de armazenamento. A equação ajustada mostra que, para cada mês de extração da droga vegetal das folhas secas de manjeriço, nas condições mencionadas de armazenamento, ocorreu decréscimo de 0,1027% e 0,0974% no teor percentual de óleo, armazenadas no papel e plástico, respectivamente (Figura 1).



**FIGURA 1:** Teores médios (%) de óleo essencial de *Ocimum basilicum* L em função das diferentes embalagens nos diferentes tempos de armazenamento. Lavras, MG, 2009.

Este resultado é de grande importância, uma vez que o óleo essencial utilizado pelas indústrias deve ser utilizado num período relativamente curto, pois estes sofrem perdas por volatilização, durante o período de armazenamento.

Resultados semelhantes foram observados por Martinazzo (2006), trabalhando com armazenamento e qualidade de folhas de *Cymbopogon citratus*, onde eles observaram o efeito de diferentes embalagens (pacote de polipropileno, envolto por dois pacotes de papel Kraft, pacote de polipropileno e dois pacotes de papel Kraft, envolto por um pacote de polipropileno) e tempos de armazenamento (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 meses) e verificou que o teor de óleo

essencial do produto seco decaiu linearmente, independentemente da embalagem utilizada durante os doze meses.

Já Chagas (2007) estudando o efeito do tempo de armazenamento (0, 6 e 12 meses) com hortelã-japonesa (*Mentha arvensis* L.) obteve uma redução gradual do teor de óleo essencial da hortelã, em função do tempo de armazenamento, ocorrendo um decréscimo de 0,0357% no teor percentual de óleo essencial.

Segundo West, (1990) as espécies de *Mentha* pertencentes à família Lamiaceae, a mesma do manjeriço, armazenadas por longo tempo, estas sofreram mudanças na ultraestrutura das glândulas, sendo a produção de óleo essencial reduzida.

Blanco et al. (2001), também constatou uma redução nos teores de óleo essencial, em função do aumento do tempo de armazenamento de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), apresentando uma perda de 5% a 7%, até os 12 meses de armazenamento.

Resultados distintos foram observados por Silva (2005), avaliando o efeito das embalagens em 12 meses de armazenamento no teor do óleo essencial de carqueja (*Baccharis genistelloides* var. *trimeria* (Less.) Baker L.), no qual concluiu que as embalagens de vidro e kraft mantiveram o teor de óleo ao longo de um ano de armazenamento e que embalagem de polietileno proporcionou maiores perdas no teor de óleo e nas três embalagens houve decréscimo da substância gleeoel, composto majoritário desta espécie.

Com relação às características organolépticas, evidenciou-se que a cor do óleo essencial de manjeriço obtida pelo tratamento armazenado em sacos de polipropileno apresentou-se mais viscoso (aspecto amarelado) diferente do papel no qual apresentou menos viscosidade (aspecto esbranquiçado), porém o odor foi característico em ambas os tratamentos. Segundo Pinto & Bertolucci, (2002)

os óleos essenciais são pouco estáveis principalmente em presença de ar, luz, calor, umidade e metais, sendo a maioria deles opticamente ativos.

Pelos resultados obtidos, percebe-se que os óleos essenciais contido nas folhas secas armazenadas em embalagens de polietileno sofreram transformações durante o período de armazenamento, e que estas, estão relacionadas a tais fatores, com exceção da luz, uma vez que as folhas foram armazenadas em ambiente escuro. Segundo Blanco (2001) a análise das características organolépticas, pode ajudar na determinação do período máximo que uma erva seca pode ser armazenada, mantendo a qualidade necessária para ser usada na indústria de alimentos.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos Silva et al. (1999), avaliando a qualidade de três plantas medicinais, orégano, mil folhas e salsa, secas em câmara com desumidificador e armazenadas por seis meses a um ano em embalagens de vidro, saco de papel e polietileno de baixa densidade, no qual concluíram que a qualidade microbiológica das plantas foi melhor preservada em embalagem de vidro.

Ao longo do período de armazenamento houve o surgimento de alguns carunchos aos 9 meses, provavelmente atraídos pelo aroma do manjeriço. A embalagem de papel kraft protegeu melhor a droga vegetal, enquanto o polietileno permitiu a degradação do produto.

No que se refere à composição química do óleo essencial em função dos diferentes tipos de embalagem em tempos de armazenamento, notou-se poucas diferenças entre os tratamentos (Tabela 2).

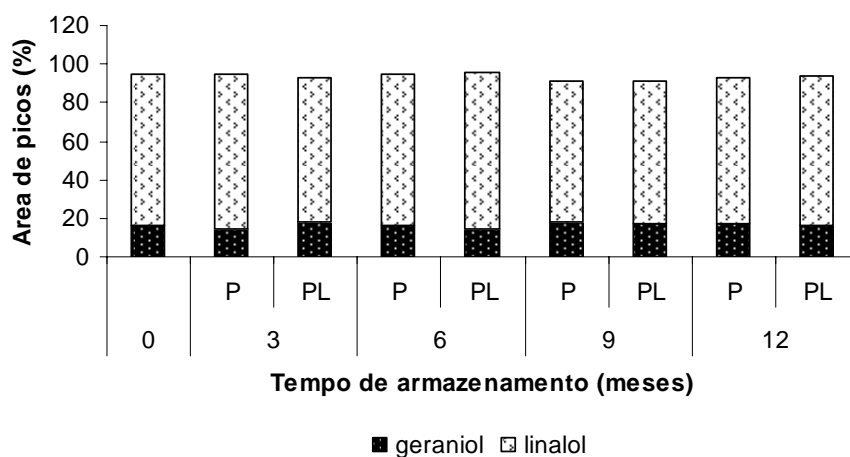


**TABELA 2:** Componentes identificados no óleo essencial de manjeriço, com o respectivo índice de retenção (GC-MS) de acordo com os diferentes tipos de embalagem (P-papel e PL- plástico) nos diferentes tempos de armazenamento. Lavras, MG, 2009.

Constituintes	IK	Tempo de armazenamento em meses em papel e plástico GC-MS (%)									
		0		3		6		9		12	
		P	PL	P	PL	P	PL	P	PL	P	PL
1,8-cineol (MO)	1032	1,12	0,96	0,18	0,77	0,55	0,48	1,44	0,51	0,73	
linalol (MO)	1099	78,35	79,75	74,65	78,48	81,41	73,04	73,56	76,14	77,09	
$\alpha$ -terpineol (MO)	1194	0,59	0,66	0,71	0,39	0,64	0,82	0,87	0,96	0,81	
geraniol (MO)	1250	15,94	14,69	18,43	16,28	14,43	18,26	17,25	16,74	16,57	
acetato de isobornila (S)	1284	-	0,2	0,16	-	-	0,22	0,21	-	-	
acetato de geranila (S)	1378	1,7	1,37	1,51	0,91	0,94	2,19	2,38	2,05	1,61	
$\alpha$ -trans-bergamoteno (S)	1432	0,7	0,86	1,43	0,87	0,45	1,29	1,07	0,99	0,99	
$\gamma$ -cadineno (S)	1512	0,2	0,22	0,48	-	-	0,51	0,4	0,47	0,5	
epi- $\alpha$ -cadinol (S)	1641	1,4	1,29	2,25	2,3	1,08	2,72	2,38	1,69	1,98	
$\gamma$ -muuroleno (S)	1480	-	-	0,21	-	-	0,27	0,25	0,49	-	
1,10-di-epi-cubenol (S)	1614	-	-	-	-	-	0,19	0,17	-	-	
<b>Total dos monoterpenos (MO)</b>		96,0	95,06	93,97	95,92	97,03	92,6	93,12	94,35	95,2	
<b>Total dos sesquiterpenos (S)</b>		4,0	3,94	6,04	4,08	2,47	7,39	6,86	5,69	5,08	
<b>Total dos Picos</b>		100,0	99,0	100,01	100,00	99,5	99,99	99,98	100,04	100,1	

Por meio da cromatografia gasosa (CG), obteve-se o perfil cromatográfico de cada tratamento. Foram detectados 11 componentes químicos na amostra do óleo essencial. Análises de GC- MS e GC- FID identificaram a presença de monoterpenos (1,8-cineol, linalol,  $\alpha$ - terpineol, geraniol,) e sesquiterpenos (acetato de isobornila, acetato de geranila,  $\alpha$ -trans-bergamoteno,  $\gamma$ -cadieno, epi-  $\alpha$ -cadinol,  $\gamma$ -muuroleno, 1,10-di-epi-cubenol).

Os constituintes majoritários encontrados nos dois tipos de embalagem foram linalol e geraniol. Observa-se, que não houve uma considerável modificação na concentração destes dois componentes químicos, em função do tipo de embalagem e tempo de armazenamento, (Figura 2).



**FIGURA 2:** Porcentagem da área relativa dos picos cromatográficos correspondentes ao conteúdo dos principais constituintes majoritário nas diferentes embalagens (P-papel e PL-plástico) e tempo de armazenamento (0, 3, 6, 9 e 12 meses) dos componentes majoritários do óleo essencial de manjeriço. Lavras, MG, 2009.

Quando se realizou o armazenamento das folhas secas de manjeriço nas embalagens de papel e plástico, para o composto linalol, as porcentagens das áreas de picos foram (76,85 e 76,67%) e para o componente químico geraniol foi

(16,49% e 16,67%) respectivamente. Não foram observadas reduções significativas destes compostos no decorrer do tempo de armazenamento quando comparado ao tempo controle, para as embalagens em estudos.

Os dados obtidos das determinações qualitativas e quantitativas dos componentes principais presentes no óleo essencial de *O. basilicum* estão apresentados na (Tabela 2).

Os teores de óleo essencial identificados no presente trabalho, apresentam pequenas diferenças em relação aos teores encontrados por Blank et al. (2007), linalol (73,60%), geraniol (12,08%) e 1,8- cineol (6,4%).

Como não houve diferença no percentual dos componentes químicos entre as diferentes embalagens, acredita-se que os fatores (oxigênio, luz, temperatura, umidade e calor) não apresentaram influência na composição química do óleo essencial ao longo do tempo de armazenamento.

Resultados semelhantes foram obtidos por Misharina et al. (2003) avaliando amostras de óleo essencial de folhas manjerona (*Majorana hortensis*) armazenadas durante doze meses em condições de escuro e claro e observaram mudanças insignificantes na composição do óleo essencial e nas características organolépticas quando estes foram armazenados no escuro, enquanto que em condições de luz estes sofreram alterações no teor de óleo e nas características organolépticas.

Baritoux et al. (1992) avaliaram no manjericão o efeito, da secagem a 45 °C e armazenagem em embalagens compostas por laminado de alumínio polietileno poliamido. Onde eles verificaram redução do óleo essencial durante o período de três, seis e sete meses de armazenamento. Observaram também que o conteúdo de methylchavicol e eugenol diminuiu drasticamente depois de secar e armazenar, enquanto o de linalol e 1,8 cineol aumentados ao longo do mesmo período, concluindo que a perda de óleo essencial ocorreu, principalmente, pela

evaporação e aumento de monoterpenos oxigenados devido à hidrólise dos glicosídeos durante a destilação.

**Experimento II: Influência dos diferentes ambientes e tempo de armazenamento na composição química do óleo essencial de manjeriço 'Maria Bonita'.**

Quanto aos constituintes presentes no óleo essencial de manjeriço, foram identificados 9 componentes, independentemente do tratamento (ambiente, geladeira e freezer).

Análises de GC- MS identificaram a presença de monoterpenos ( $\beta$ -pineno, 1-octen-3-ol, 1,8-cineol, linalol,  $\alpha$ -terpineol e geraniol) e sesquiterpenos (acetato de geranila,  $\alpha$ -trans-bergamoteno e epi-  $\alpha$ -cadinol). Identificaram-se dois compostos majoritários, o linalol e o geraniol. Os demais compostos podem ser considerados minoritários: 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -pineno, 1-octen-3-ol, acetato de geranila,  $\alpha$ -trans-bergamoteno, e epi-  $\alpha$ -cadinol.

As porcentagens de área correspondentes ao composto linalol, geraniol e 1,8-cineol não apresentaram diferenças consideráveis entre os diferentes ambientes e tempo de armazenamentos utilizados, (Tabela 3).

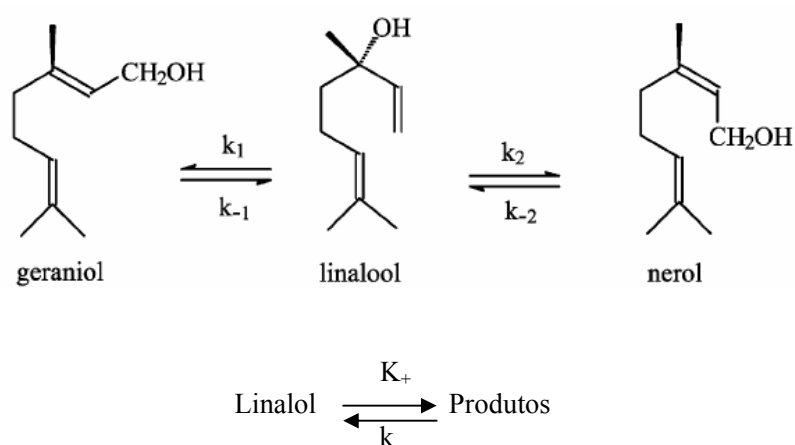
**TABELA 3:** Componentes identificados no óleo essencial de manjeriço, com o respectivo índice de retenção (GC-MS). Lavras, MG, 2009.

Constituintes	IK	Tempo de armazenamento em meses do óleo essencial de manjeriço 'Maria Bonita' GC-MS (%)																			
		Ambiente								Geladeira								Freezer			
		0	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12	
b-pineno (M)	976	0,17	0,10	-	-	0,45	-	0,04	0,13	-	-	0,13	-	-	0,09	-	-	-	-	-	
1-octen-3-ol (M)	979	0,7	0,59	-	-	-	0,44	0,62	0,72	-	-	0,49	0,4	0,47	0,58	-	-	-	0,48	0,64	
1,8-cineol (M)	1032	4,75	4,24	3,84	3,86	4,48	3,35	3,47	4,34	4,91	5,09	4,73	3,78	3,03	3,93	4,25	3,09	4,84	4	3,65	
linalol (M)	1099	75,01	74,58	85,4	79,96	76,68	76,44	76,8	74,32	86,2	78,44	75,51	77,4	76,91	74,85	85,82	81,12	73,22	77,59	77,54	
a-terpineol (M)	1194	0,6	0,63	-	0,45	0,51	0,53	0,55	0,61	-	0,45	0,56	0,48	0,55	0,61	0,35	0,49	0,61	0,47	0,49	
geraniol (M)	1250	16,79	17,88	10,3	14,69	16,22	17,53	16,6	17,47	8,4	15,22	16,77	16,3	16,98	17,71	9,1	14,06	18,12	15,79	16,06	
acetato de geranila (S)	1378	0,35	0,40	-	-	0,32	0,34	0,42	0,42	-	-	0,28	0,42	0,55	0,47	-	-	0,38	0,41	0,39	
$\alpha$ -trans-bergamoteno (S)	1432	0,64	0,60	0,47	0,46	0,56	0,52	0,52	0,69	0,47	0,37	0,63	0,61	0,56	0,68	0,47	0,54	0,71	0,62	0,58	
epi- $\alpha$ -cadinol (S)	1641	0,76	0,87	-	0,59	0,8	0,74	0,76	0,89	-	0,43	0,9	0,64	0,83	0,95	-	0,69	0,99	0,63	0,67	
<b>Total dos picos dos monoterpenos (M)</b>		98,02	98,02	98,8	99,01	98,5	98,3	98,1	97,59	99,5	99,14	98,19	98,3	97,94	97,77	99,5	98,76	96,75	98,33	98,38	
<b>Total dos picos dos sesquiterpenos (S)</b>		1,75	1,87	0,5	1,05	1,7	1,6	1,7	2	0,47	0,8	1,81	1,67	1,94	2,1	0,47	1,23	2,08	1,66	1,64	
<b>Total dos Picos</b>		99,75	99,89	99,5	100,1	100	99,9	99,8	99,59	100	99,9	100	99,9	99,88	99,87	99,6	99,99	98,88	99,9	100	

Foi observado que no quarto mês de armazenamento houve um aumento na área de pico do linalol e uma redução dos picos do geraniol para todos os diferentes ambientes de armazenamento, provavelmente este fato esteja relacionado com alguma reação química.

O aumento ou a redução de alguns componentes químicos pode estar relacionado com reações de oxidação, redução e rearranjos durante o processo de armazenamento, possivelmente estes fatos estejam relacionado com a temperatura. A necessidade de novos trabalhos para elucidar as possíveis causas desta variação é de suma importância, visto a grande complexidade envolvida.

Semikolenov, et al. (2003) relatam em seu trabalho que o processo de isomerização do linalol é uma reação reversível e dois isômeros (geraniol e nerol). O equilíbrio constante do linalol  $/(geraniol+nerol)$  como também isomerização de geraniol/nerol depende ligeiramente de temperatura, (Figura 3).



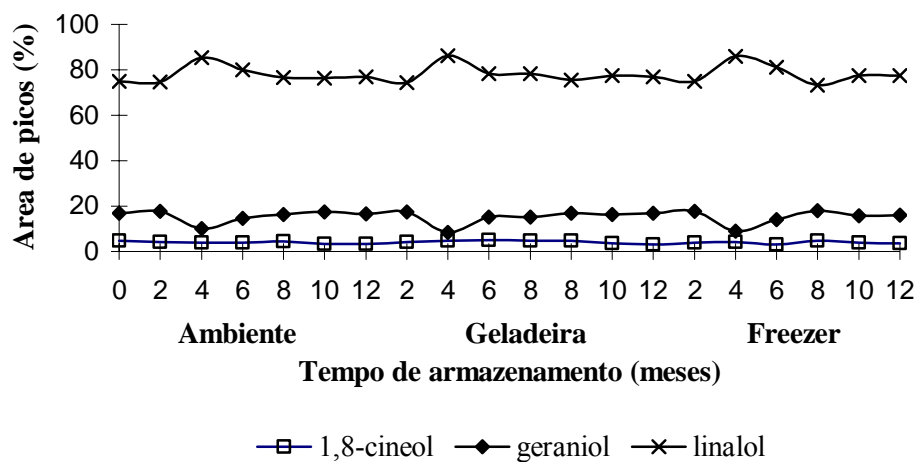
**FIGURA 3:** Reação de isomerização das estruturas químicas dos componentes linalol em outros produtos. Lavras, MG, 2009. Fonte: Semikolenov et al. (2003).

Segundo Sakamura (1987), em estudo realizado com o armazenamento de gengibre (*Zingiber officinale* “Oshoga”), observou diminuição na quantidade de óleo essencial, aumento no conteúdo de neral e geranial e redução do acetato de geranila. O autor considera que, o acetato de geranila tenha sido hidrolisado em geraniol e este oxidado para geranial e neral.

Shalaby et al. (1988), verificaram que houve diferença no conteúdo de óleo essencial de *Mentha arvensis* L., sendo observado a presença de dezoito componentes, e destes, treze foram identificados, sendo que a maior proporção foi de menthol. E que tais componentes variaram conforme o período de armazenamento.

Com relação às características organolépticas não foram observadas alterações, uma vez que a cultivar ‘Maria Bonita’ apresentou aroma agradável e forte, característico da planta, coloração incolor e baixa viscosidade do óleo.

No estudo dos perfis cromatográficos, as únicas substâncias que mantiveram ao longo do tempo, com maior porcentagem de área, foram o linalol, geraniol e 1,8- cineol, logo o monitoramento ao longo do tempo foi realizado nestes componentes, (Figura 4).



**FIGURA 4:** Porcentagem da área relativa dos picos cromatográficos correspondentes aos (1,8-cineol, geraniol e linalol) do óleo essencial de manjericão cv. Maria Bonita nos diferentes ambientes e tempos de armazenamento. Lavras, MG. 2009.

## 6 CONCLUSÕES

O tipo de embalagem não influenciou no teor e composição química do óleo essencial do manjericão ‘Maria Bonita’.

Com o passar do tempo de armazenamento, há uma redução do teor percentual de óleo essencial da droga vegetal.

Os diferentes ambientes de armazenamento não influenciaram na composição química do óleo essencial durante o período de 12 meses de armazenamento.

Os componentes majoritários do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. nos devidos tratamentos foram o linalol e o geraniol



## 7 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry**. Allured: Illinois, 2001. 421 p.

BARITAU, O.; RICHARD, T.J.; DERBESY, M. Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil: part I: Basil, *Ocimum basilicum* L. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v.7, p.267-271, 1992.

BLANCO, M.C.S.G.; MING, L.C.; MARQUES, M.M.O.; BOVI, O.A. Influência de épocas de colheita na produção de óleo essencial de alecrim. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 5., 2001, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Unesp, 2001. p.74.

BLANK, A.F.; SOUZA, V.M. de; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; PAULA, J.W.A. de; ALVES, P.B. Maria Bonita: cultivar de manjeriço tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.12, p.1811-1813, dez. 2007.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2000. 113 p.

CHAGAS, J.H. **Propagação, adubação orgânica, níveis de irradiância, idade e época de colheita e armazenamento na produção de biomassa seca e teor de óleo essencial em plantas de *Mentha arvensis* L.** 2007. 135 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

MATOS, F.J.A.; LORENZO, H. **Plantas medicinais do Brasil:** nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 544 p.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 1994. 220 p.

MARTINAZZO, A.P. **Secagem, armazenamento e qualidade de folhas de *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf.** 2006. 140 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MAGALHÃES, P.M. Colheita e secagem de plantas medicinais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 41., Brasília. **Anais eletrônicos...** Brasília, 2001. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp?id=2753>>. Acesso em: 18 jul. 2008.

MISHARINA, T.A.; POLSHKOV, A.N.; RUCHKINA, E.L.; MEDVEDEVA, I.B. Changes in the composition of the essential oil of marjoram during storage. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v.39, n.3, p.353-358, 2003.

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

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version of the NIST/ EPA/NIH Mass Spectral Database.** Gaithersburg, MD: U. S. Department of Commerce, 1998.

PEANA, A.T.; D'AQUILA, P.S.; PANIN, F.; SERRA, G.; PIPPIA, P.; MORETTIM, D.L. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, Jena, v.9, n.8, p.721-726, 2002.

PETROVICK, P.R.; ORTEGA, G.G.; BASSANI, V.L. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A. (Still) long way for the Brazilian medicinal plants. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.49, n.5-6, p.364-9, 1997.

PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais.** Lavras: UFLA, 2002. p.47 .

REIS, A.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, M.O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 3. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2001. cap.3, p.39-60.

SAKAMURA, F. Changes in volatile constituents of *Zingiber officinale* rhizomes during storage and cultivation. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.8, p.2207-2212, 1987.

SEMIKOLENOV, V.A.; ILYNA, I.I.; MAKSIMOVSKAYA, R.I. Linalool to geraniol/nerol isomerization catalyzed by (RO)<sub>3</sub>VO complexes: studies of kinetics and mechanism. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. Amsterdam, v.204-205, p.201-210, Sept. 2003.

SHALABY, A.S.; EL-GAMASY, A.M.; EL-GENGAIHI, S.E.; KHATTAB, M.D. Post harvest studies on herb and oil of *Mentha arvensis* L. **Egyptian Journal of Horticulture**, Dokki, v.15, n.2, p.213-224, 1988.

SILVA, F. **Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de plantas medicinais submetidas a processos de secagem e armazenamento**. 2005. 52 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2000, 153 p.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D.; LIMA, R.R.; ANDRADE, N. Qualidade pós colheita de *Achillea millefolium* L., *Origanum vulgare* L. e *Petroselinum crispum* (miller) A.W. Hill em três embalagens. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.2, n.1, p.37-41, 1999.

WEST, C.A. Terpene biosynthesis and metabolism. In: DENNIS, D.T.; TURPIN, D.H. (Eds.). **Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. London: [s.n.], 1990. p.353-370.

## **APÊNDICE**

Apêndice 1 – Resumo da análise de variância do comprimento das brotações (CP); da biomassa fresca (BFPA) e seca da parte aérea (BSPA) e; biomassa fresca (BFC) e seca de calos (BSC), submetidos as diferentes combinações de ANA e BAP (mg L<sup>-1</sup>). Lavras, MG, 2009.

F.V.	G.L.	Quadrados médios				
		CP (cm)	BFPA (g)	BSPA (g)	BFC (g)	BSC (g)
Tratamento	8	3.2871*	0.7178*	0.0042*	11.6224*	0.0445*
Resíduo	36	0.3171	0.0661	0.0002	0.2848	0.0014
Média		1.5229	0.8319	0.0669	1.1242	0.0718
C.V. (%)		36.98	30.92	25.17	47.47	53.64

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Apêndice 2 – Resumo da análise de variância da biomassa fresca e seca de calos de manjerição em função de diferentes concentrações de ácido 2,4-D. Lavras, MG, 2009.

F.V.	G.L.	Quadrados médios	
		Biomassa fresca (g)	Biomassa seca (g)
Tratamento	3	3.0156*	0.0542*
Resíduo	16	0.0305	0.0027
Média		1.2857	0.2076
C.V. (%)		13.59	25.02

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Apêndice 3 – Resumo da análise de variância do teor (%) médio de óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. em função de métodos de secagem e processamento da folha. Lavras, MG, 2009.

F.V.	G.L.	Quadrado médio
		Teor de óleo essencial (%)
Fragmentação (F)	1	0,1465 <sup>ns</sup>
Secagem (S)	1	0,1537 <sup>ns</sup>
F x S	1	0.1244*
Resíduo	22	0.0250
Média		0.9348
C.V. (%)		16.93

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>ns</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice 4 – Resumo da análise de variância do índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento das raízes (CR) e porcentagem de germinação (GER) da alface, tomate e melissa sob o efeito diferentes doses nas formas de aplicação (extrato aquoso e óleo essencial) do manjeriço. Lavras, MG, 2009.

F.V.	G.L.	Quadrados médios								
		Alface			Tomate			Melissa		
		IVG	CR	GER	IVG	CR	GER	IVG	CR	GER
Forma (F)	1	1258,4141*	2,6693*	4841,28*	120,3110*	132,0962*	4531,52*	704,0252*	0,0560*	3362,00*
Doses (D)	4	163,2656*	10,1592*	4744,48*	105,3784*	10,1705*	4485,28*	58,1743*	9,5942*	3354,32*
F x D	4	160,8379*	3,7722*	4950,88*	35,6744*	10,0007*	4346,72*	24,6491*	2,09818*	4591,60*
Resíduo	40	1,0791	0,2297	6,24	2,5639	1,5256	16,32	3,6867	0,1566	171,52
Média		18,7088	2,2403	88,61	10,4628	3,8522	84,56	10,0476	2,4659	76,52
C.V. (%)		5,55	21,40	2,82	15,30	32,06	4,78	19,11	16,05	17,12

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>ns</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apêndice 5 – Resumo da análise de variância do teor (%) médio de óleo essencial em folhas inteiras de *Ocimum basilicum* L. sob diferentes embalagens de armazenamento durante 12 meses. Lavras, MG. 2009.

F.V.	G.L.	Quadrado médio
		Teor de óleo
Embalagens (E)	1	0,1226 <sup>ns</sup>
Erro A	6	0,0210
Tempos de armazenamento (T)	4	3,4974*
E x T	4	0,0460 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,0178
Média		0,4828
C.V. (%)	Parcela	30,01
	Subparcela	27,65

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. <sup>ns</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.