

Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura

Érika Soares Reis^{1*}, José Eduardo Brasil Pereira Pinto², Luciana Domiciano Silva Rosado² e Ricardo Monteiro Corrêa¹

¹Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, Rod. Bambuí/Medeiros, Km 5, 38900-000, Bambuí, Minas Gerais, Brasil. ²Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: erikasreis@yahoo.com.br

RESUMO. Com o objetivo de avaliar o efeito do meio de cultura no teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis*, foi realizado o presente trabalho, que avaliaram três concentrações do meio de cultura MS. O experimento foi implantado em delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições, e cada repetição foi representada por uma amostra de 20 g de plântulas frescas. A extração do óleo foi realizada em aparelho de Clevenger modificado com duração de 1h e 30 min. e a análise química foi realizada por cromatografia gasosa. Observou-se que o teor e a composição química do óleo essencial de *M. officinalis* foram influenciados pela concentração de sais do meio MS. As plântulas que se desenvolveram nos meios MS e MS/4 apresentaram maior teor de óleo essencial, e os componentes majoritários foram o geraniol (25,23 e 16,21%, respectivamente) e o neral (24,5 e 20,53%, respectivamente). Já o componente majoritário presente no óleo de plântulas de melissa cultivadas em meio MS/2 foi o acetato de nerila (18,69%).

Palavras-chave: *Melissa officinalis*, planta medicinal, óleo essencial, cultura de tecidos.

ABSTRACT. Content and chemical composition of the essential oil of *Melissa officinalis* L. *in vitro* under the influence of the culture medium. The present work was carried out with the objective of evaluating the effect of the culture medium in the content and chemical composition of the essential oil of *Melissa officinalis*, evaluating three concentrations of the MS culture medium. The experiment was performed in a completely randomized design, with 7 repetitions, where each repetition was represented by 20 g of fresh biomass. Oil extraction was accomplished using a Clevenger modified device for 1 hour and 30 minutes, and the chemical analysis was accomplished by gas chromatography. It was observed that the content and chemical composition of the essential oil of *M. officinalis* was influenced by the concentration of MS medium. The plants grown in the MS medium and MS/4 presented higher content of essential oil, and the major components of these plants were geraniol (25.23 and 16.21%, respectively) and nerol (24.5 and 20.53%, respectively). The major component present in the oil of melissa plants cultivated in MS/2 was neryl acetate (18.69%).

Key words: *Melissa officinalis*, medicinal plant, essential oil, tissue culture.

Introdução

Planta originária da região que circunda o Mediterrâneo e também a Ásia, *Melissa officinalis* L., conhecida popularmente como erva-cidreira, é uma planta da família Lamiaceae, arbustiva, que pode atingir de 20 a 80 cm de altura. Os caules, ramificados a partir da base, formam touceiras. As folhas são verde-intensas na parte superior e verde-claras na parte inferior. As flores, quando surgem, são brancas ou amareladas, podendo tornar-se rosadas com o passar do tempo (LAUNERT, 1989). Toda a planta emana um odor semelhante ao do limão, que se torna mais intenso depois que a planta seca.

Estudos recentes sugerem que além de possuir

propriedades antibacterianas, *M. officinalis* pode modular várias medidas de comportamento, como um moderado sedativo em transtorno do sono, na atenuação de sintomas de distúrbios nervosos, inclusive a redução de excitabilidade, ansiedade, e tensão (KENNEDY et al., 2003). Apresenta propriedades antiespasmódicas, carminativas, estomáquicas, diaforéticas, sedativas, antidepressivas, vermífugas e aumenta o fluxo biliar (HUANG et al., 2008). Extratos de *Melissa officinalis* apresentam atividade antioxidante (TAGASHIRA; OHTAKE, 1998; TOPAL et al., 2008). Além disso, pesquisas tem indicado que *M. officinalis* possui ação antivirótica contra o vírus da herpes (HSV) (SCHNITZLER et al., 2008).

Segundo Stefanini et al. (2006) a qualidade do óleo essencial tem grande importância e depende do estágio de desenvolvimento da planta, como também de nutriente, da qualidade do solo ou meio de cultura, temperatura, entre outros fatores.

Os rendimentos em óleo essencial de *M. officinalis*, obtidos por hidrodestilação, são habitualmente muito baixos (0,02 a 0,40%) e tornam-se, assim, pertencente a uma das classes mais preciosas de óleo essencial, apresentando alto preço, comparado aos preços do óleo essencial de rosas e de flor de laranjeira (SORENSEN, 2000).

Estudos da composição química do óleo essencial obtido de folhas de *M. officinalis in vitro* indicam a presença dos componentes majoritários citrionelal (2-40%) e citral (mistura de neral e geranial: 10-30%), seguidos pelo β -cariofileno, germancreno D, ocimeno e citrionelol (SILVA et al., 2005).

A composição do meio de cultura pode afetar vários fatores no cultivo *in vitro* de determinada espécie de planta. Além de facilitar a propagação das plantas, as técnicas de cultivo *in vitro* podem auxiliar vantajosamente no estudo da produção, acúmulo e metabolismo de importantes metabólitos secundários (HIPOLYTE, 2000; PANAGIOTOPOULOS et al., 2000).

Vários trabalhos têm sido realizados com diferentes espécies medicinais, com a finalidade de determinar a produção e a composição química do óleo essencial de plantas cultivadas *in vitro*.

Guedes et al. (2003) estudaram a produção de óleo essencial de plantas de *Hypericum androsaemum* L. cultivadas em meio que continha os macronutrientes de Margara N30K (MARGARA, 1989) e os micronutrientes e constituintes orgânicos do meio de Murashige e Skoog (1962), com exceção da tiamina, da qual foi usado 0,8 mg L⁻¹.

Estudando a produção de óleo essencial de brotos de sálvia (*Salvia officinalis*) *in vitro*, Gomes e Ferreira (2003) utilizaram como meio de cultura básico o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com diferentes combinações de citocininas, e observaram que o tipo e a concentração da citocinina influenciaram o acúmulo de óleo essencial.

De acordo com as pesquisas levantadas para este trabalho, infere-se que o conhecimento da capacidade de produção e acúmulo de óleo essencial de brotos de *M. officinalis in vitro*, não foi ainda suficientemente estudado. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar a produção e a composição química do óleo essencial de *M. officinalis* L. a partir de brotos cultivados *in vitro*.

Material e métodos

Material vegetal e condições de cultivo

Inicialmente, sementes de *M. officinalis* foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 0,8% por 20 min. e, posteriormente, foram levadas para a câmara de fluxo laminar e lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

Após a realização do processo de assepsia, as sementes foram colocadas em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 12 mL de meio de cultura com um quarto da concentração dos sais do MS. As plântulas, inicialmente, foram multiplicadas em meio MS, a partir de segmentos nodais e apicais, a fim de obter o estande ideal para a extração de óleo essencial. A partir da obtenção do número de plântulas ideal (obtido com seis subcultivos, em um período de aproximadamente seis meses), estas foram multiplicadas em segmentos nodais e apicais os quais foram inoculados nos respectivos meios de cultura que representaram os tratamentos.

Foram estudadas diferentes concentrações de sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), tais como: MS com a concentração completa dos sais, MS com a metade da concentração dos sais (MS/2) e MS com um quarto da concentração dos sais (MS/4).

Extração, teor e composição química do óleo essencial

Cada amostra foi composta por 20 g de plântulas frescas (aproximadamente 180 plântulas com cerca de 6 cm de comprimento cada).

Depois de pesada, a amostra foi imediatamente vertida em balão de 1 L, contendo 300 mL de água destilada, e levada ao aparelho de Clevenger Modificado para a hidrodestilação, durante 1h e 30 min. de duração. O hidrolato coletado foi particionado com diclorometano, na proporção de ¼ do total obtido, dividido em três vezes. Como dessecante, foi adicionado sulfato de magnésio anidro, deixando-o agir por 24h; após esse período, a solução foi filtrada. Em seguida, o sal foi removido por filtração simples utilizando papel de filtro, e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente, em capela de exaustão de gases; posteriormente, determinou-se sua massa residual.

As análises químicas foram realizadas em aparelho de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro quadrupolar de massas (CG-EM), Shimadzu QP5050A (Kyoto, Japão), nas seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida, modelo CBP-5 (30 mm de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μ m de espessura do filme em 5% de fenilmetilpolisiloxano) (Shimadzu, Japão), com fluxo de 1 mL min.⁻¹ de Hélio como gás de arraste; aquecimento com

temperatura programada (60°C com gradiente de 3°C min.⁻¹ até 240°C e, em seguida, com um gradiente de 10°C min.⁻¹ até 270°C, mantendo-se constante por 7 min., com tempo total de corrida de 70 min.). A energia de ionização do detector foi de 70 eV, o volume de injeção da amostra de 0,5 µl foi diluído em diclorometano (grau ultrarresíduo, Baker, EUA) e uma razão de injeção de 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220 e 240°C, respectivamente.

A análise foi conduzida no modo varredura, à velocidade de 1,0 varredura s⁻¹, com um intervalo de massas de 40-400 m z⁻¹. A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma total de íons (TIC). A identificação dos constituintes foi realizada por comparação automática e manual dos espectros de massas com os das bibliotecas NIST/EPA/NHI (NIST, 1998), por comparação dos espectros de massas e Índices de Retenção (IR) com os da literatura (ADAMS, 2001) e co-injeção com padrões autênticos. Os Índices de Retenção foram calculados por meio da co-injeção com uma mistura de hidrocarbonetos, C₈-C₃₂ (Sigma, EUA), e com aplicação da equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos compostos de variações da concentração dos sais do meio MS, cada um com sete repetições, e cada repetição foi representada por uma amostra de 20 g de plântulas frescas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software SISVAR.

Resultados e discussão

Verificou-se que houve diferença significativa no teor de óleo essencial ($p \leq 0,05$) para as diferentes concentrações do meio MS (Figura 1).

Pode-se observar que as plântulas presentes nos meios MS e MS/4 apresentaram maior teor de óleo essencial. Este resultado mostra que, possivelmente, plântulas presentes no meio MS produziram maior teor de óleo essencial, pela presença de uma concentração ideal de nutrientes para o seu metabolismo, e o teor de óleo diminuiu no meio MS/2 pela redução da concentração de nutrientes neste meio. Já para o meio MS/4, provavelmente pela deficiência de nutrientes, para promover a sua defesa em uma situação de estresse, a plântula produziu maior teor de óleo essencial, visto que o seu comprimento foi diminuindo com a redução da concentração do meio MS (dados não-publicados).

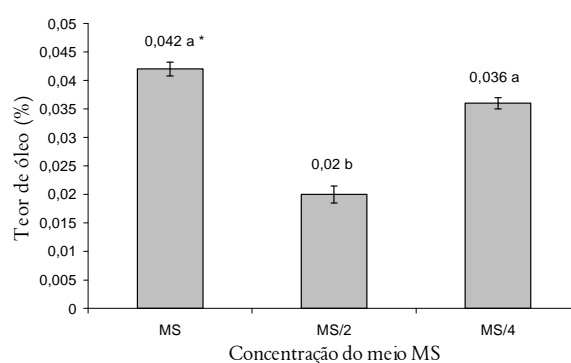


Figura 1. Teor de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em função das diferentes concentrações do meio MS.

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade. As barras em evidência indicam o erro-padrão da média.

Mann (1987) afirma que as rotas dos metabólitos secundários das plantas só são ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais.

A adaptabilidade das plantas, em condições de estresse, é influenciada pela duração e magnitude do estresse, além da variabilidade genética. A concentração de princípios ativos nas plantas depende do controle genético e também das interações genótipo e ambiente, que podem ser desencadeadas em condições de estresse, ou seja, excesso ou deficiência de algum fator do meio ambiente, como água, luz, temperatura, nutrientes, dentre outros (ANDRADE; CASALI, 1999).

Andrade e Casali (1999) ainda afirmam que o efeito do estresse sobre os produtos do metabolismo secundário das plantas medicinais parece variar bastante com o tipo, a intensidade e a duração do estresse, podendo aumentar ou diminuir o teor de óleos essenciais.

Os componentes majoritários do óleo essencial de *M. officinalis*, obtido de plântulas presentes no meio MS e MS/4, foram o geranial (25,23 e 16,21%, respectivamente) e o neral (24,5 e 20,53%, respectivamente). Já o componente majoritário presente no óleo de plântulas de melissa cultivadas em meio MS/2 foi o acetato de nerila (18,69%), indicando que também o meio influenciou a composição química do óleo essencial de *M. officinalis* L. (Tabela 1), e é importante salientar que o melhor meio para o crescimento de *M. officinalis* é o meio MS sem a adição de reguladores de crescimento.

A utilização do cultivo de brotos *in vitro* para estudos de óleo essencial não tem sido suficientemente explorada. Não foram encontrados trabalhos relacionando a produção e composição de óleo essencial com a concentração do meio MS para

M. officinalis. Porém, Silva et al. (2005) estudaram a composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro*, cultivada em meio MS, em pesquisa voltada para a influência dos reguladores de crescimento AIA (ácido indol acético) e BAP (benzilaminopurina). Os autores observaram que tratamentos com 11,42 $\mu\text{M L}^{-1}$ de AIA e 8,87 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BAP resultaram em aumentos de 1,7 e 2,2 vezes na proporção de neral e geranial, respectivamente.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de plântulas *Melissa officinalis* cultivadas em diferentes concentrações do meio MS.

Componente	IR	Componente no óleo essencial (%)		
		MS	MS/2	MS/4
Desconhecido	1141	2,24	0	1,45
Citronelal	1152	3,35	0,1	2,00
Angelato de prenila	1193	2,37	2,1	3,72
Neral	1240	24,5	4,3	20,53
Geranial	1270	25,23	5,44	16,21
Desconhecido	1296	0,10	0,8	0,10
Acetato de nerila	1363	6,48	18,69	2,60
Trans-6-hidroxi- α -terpineol	1374	0,10	10,19	8,77
Desconhecido	1404	2,24	2,4	3,73
Desconhecido	1426	3,45	2,2	2,90
Desconhecido	1529	11,92	3,68	11,55
Óxido de cariofileno	1585	5,04	3,61	6,59

Estudos de Gomes e Ferreira (2003), na produção de óleo essencial de brotos *in vitro* de *Salvia officinalis*, testaram o efeito de oito combinações de reguladores de crescimento adicionados ao meio MS. Houve alto acúmulo de óleo essencial no tratamento que continha a combinação de 2,0 mg L⁻¹ de cinetina e 0,05 mg L⁻¹ de 2,4-D e os resultados indicaram que o tipo e a concentração do regulador de crescimento não influenciaram a composição química do óleo essencial de brotos *in vitro* de sálvia.

Sudriá et al. (1999), estudando também a influência de reguladores de crescimento no conteúdo de óleo essencial de plântulas de *Lavandula dentada*, concluíram que o meio que continha 0,1 mg L⁻¹ de BA (benziladenina) proporcionou maior conteúdo de óleo. Este resultado foi relacionado com a maior ocorrência de tricomas glandulares nas plântulas presentes nesse meio de cultura.

Pesquisas de Guedes et al. (2003), com óleo essencial de plantas *in vivo* e *in vitro* de *Hypericum androsaemum* L., indicaram que o conteúdo de óleo essencial obtido a partir de brotos cultivados *in vitro* foi seis vezes menor quando comparado com plantas cultivadas *in vivo*. Os autores atribuíram este resultado à imaturidade dos brotos cultivados *in vitro* e também às condições de crescimento das plântulas.

Já Arikat et al. (2004), que também compararam o rendimento de óleo essencial de plantas *in vivo* e *in vitro* de *Salvia fruticosa*, observaram que as plântulas *in vitro* apresentaram maior rendimento em relação às plantas *in vivo* e que os constituintes majoritários

detectados no óleo das plantas *in vivo* e *in vitro* foram similares, sendo eles: α -pireno, 1,8-cineol, camphor e borneol.

Assim, há a necessidade de maior estudo do rendimento de óleo essencial de plântulas *in vitro* para as diferentes espécies e deve-se, igualmente, fazer o estudo comparativo com o rendimento de óleo essencial obtido de plantas *in vivo*.

Conclusão

Os diferentes meios de cultura influenciaram a produção de óleo essencial de *Melissa officinalis*. Os meios MS e MS/4 promoveram a formação de plântulas com maior teor de óleo essencial. A composição química do óleo essencial foi influenciada pela concentração do meio MS. O neral e o geranial formam os componentes majoritários do óleo obtido de plântulas presentes no meio MS e MS/4; o acetato de nerila, de plântulas presentes no meio MS/2.

Referências

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured, 2001.
- ANDRADE, F. M. C.; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário**. Viçosa: UFV, 1999.
- ARIKAT, N. A.; JAWAD, F. M.; KARAM, N. S.; SHIBLI, R. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.) **Scientia Horticulturae**, v. 100, n. 1-4, p. 193-202, 2004.
- GOMES, P. C. S.; FERREIRA, M. F. Essential oils produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2260-2266, 2003.
- GUEDES, A. P.; AMORIM, L. R.; VICENTE, A. M. S.; RAMOS, G.; FERREIRA, M. F. Essential oils from plants and *in vitro* shoots of *Hypericum androsaemum* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 399-1404, 2003.
- HIPPOLYTE, I. *In vitro* rosmarinic acid production. In: KINTZIOS, S. E. (Ed.). **Sage: the Genus Salvia**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000.
- HUANG, L.; ABUHAMDAH, S.; HOWES, M. J. R.; ELLIOT, M. S. J.; BALLARD, C.; HOLMES, C.; BURNS, A.; PERRY, E. K.; FRANCIS, P. T.; LEES, G.; CHAZOT, P. L. Pharmacological profile of essential oils derived from *Lavandula angustifolia* and *Melissa officinalis* with anti-agitation properties: focus on ligand-gated channels. **Journal of Pharmacy And Pharmacology**, v. 60, n. 11, p. 1515-1522. 2008.
- KENNEDY, D. O.; WAKE, G.; SAVELEV, S.; TILDESLEY, N. T. J.; PERRY, E. K.; WESNES, K. A.; SCHOLEY, A. B. Modulation of mood and cognitive

- performance following acute administration of single doses of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) with human CNS nicotinic and muscarinic receptor-binding properties. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 1871-1881, 2003.
- LAUNERT, E. **The HamLyn guide to edible medicinal plants of Britain and Northern Europe**. London: HamLyn, 1989.
- NIST-National Institute of Standards and Technology. **PC version of the NIST/EPA/NIH mass spectral database**. Gaithersburg: U.S. Department of Commerce, 1998.
- MANN, J. **Secondary metabolism**. 2. ed. Oxford: Clarendon, 1987.
- MARGARA, J. **Bases de la multiplication vegetative. les méristèmes et l'organogénese**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1989.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PANAGIOTOPOULOS, E.; SKAPETI, M.; KAPETANOS, C. Production of secondary metabolites using liquid culture of *Salvia* plants: up to-date reports and scale-up potential. In: KINTZIOS, S. E. (Ed.). **Sage: the Genus Salvia**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000.
- SCHNITZLER, P.; SCHUHMACHER, A.; ASTANI, A.; REICHLING, J. *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. **Phytomedicine**, v. 15, n. 9, p. 734-740, 2008.
- SILVA, S.; SATO, A.; LAGE, C. L. S.; GIL, R. A. S. S.; AZEVEDO, D. A.; ESQUIBEL, M. A. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1387-1390, 2005.
- SORENSEN, J. M. *Melissa officinalis*. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 10, n. 1/2, p. 7-15, 2000.
- STEFANINI, M. B.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A.; MOURA, L. S.; MARCHESE, J. A. Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* var. *dulcis* in the season of the year. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. esp., p. 86-90, 2006.
- SUDRIÁ, C.; PIÑOL, M. T.; PALAZÓN, J. CUSIDÓ, R. M.; VILA, R.; MORALES, C.; BONFILL, M.; CAÑIGUERAL, S. Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of culture *Lavandula dentata* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 58, n. 3, p. 177-184, 1999.
- TAGASHIRA, M.; OHTAKE, Y. A new antioxidative 1,3-Benzodioxole from *Melissa officinalis*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, n. 6, p. 555-558, 1998.
- TOPAL, U.; SASAKI, M.; GOTO, M.; OTLES, S. Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 7-8, p. 619-634, 2008.
- VAN DEN DOOL, D. H.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, [s. n], p. 463-471, 1963.

Received on January 25, 2008.

Accepted on April 3, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.