



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
CURSO DE CIÊNCIAS RURAIS**

BRUNA VARGAS ANDRIOLLI

**MICROPROPAGAÇÃO DE LAVANDA (*Lavandula x intermedia* Emeric ex
Loisel., Lamiaceae) VARIEDADE GROSSO PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO
ESSENCIAL**

**CURITIBANOS
Novembro / 2014**

Bruna Vargas Andriolli

**Micropropagação de lavanda (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.,
Lamiaceae) variedade Grosso para extração de óleo essencial**

Projeto apresentado como exigência da disciplina de Projetos em Ciências Rurais à obtenção do título de Bacharel em Ciências Rurais, do Curso de Ciências Rurais, ministrado pela Universidade Federal de Santa Catarina sob orientação dos professores Dr^a. Adriana Terumi Itako e Dr. Lírio Luiz Dal Vesco.

Novembro / 2014

RESUMO

As plantas de lavanda pertencem à família **Lamiaceae**, uma das maiores do grupo das Angiospermas e são amplamente distribuídas. Dentre o gênero *Lavandula*, que conta com mais de 30 espécies e as variedades de maior importância mundial na extração do óleo essencial, a variedade Grosso (*Lavandula x intermedia*) destaca-se em área cultivada na região do Mediterrâneo. O óleo essencial das lavandas tem alto valor econômico devido a sua fragrância e a nossa atração por seus princípios ativos medicinais, bem como suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas. As condições edáficas e climáticas afetam diretamente o desenvolvimento das plantas e a composição do óleo essencial. A propagação convencional da lavanda baseia-se em estaquia e plantio de sementes, porém ambas as técnicas apresentam deficiências. Como alternativa a essas limitações, o presente trabalho tem como objetivo a realização de um experimento que teste a viabilidade da produção de óleo essencial de *Lavandula*, por métodos alternativos de cultivo *in vitro*. Serão proliferados brotos por organogênese direta e culturas celulares provenientes de segmentos foliares. Os tratamentos constituem-se de duas formulações salinas (MS e QL) com diferentes combinações de fitorreguladores. A partir do material vegetal desenvolvido, amostras serão submetidas à extração e análise do óleo essencial. Esse projeto possibilitará a identificação de técnicas de cultivo para otimizar e reduzir custos na extração do óleo essencial, bem como a publicação de dados sobre as técnicas empregadas, contribuindo com pesquisas posteriores.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, organogênese, culturas celulares, produção em escala.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. JUSTIFICATIVA.....	6
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1. Classificação da Lavanda.....	7
3.2. Descrição botânica do gênero <i>Lavandula</i>	8
3.3. Óleo essencial.....	9
3.4. Finalidades e usos.....	10
3.5. Micropropagação.....	11
4. HIPÓTESE.....	13
5. OBJETIVOS.....	13
5.1. Objetivo geral.....	13
5.2. Objetivos específicos.....	13
6. METODOLOGIA.....	14
6.1. Material vegetal e ambiente de cultivo.....	14
6.2. Elaboração dos meios de cultura.....	14
6.3. Indução a proliferação de brotos por organogênese direta.....	15
6.4. Proliferação (Alongamento dos brotos).....	16
6.5. Indução do enraizamento, aclimatização e estabelecimento à campo.....	16
6.6. Indução e proliferação de culturas celulares.....	17
6.7. Extração e análise da composição do óleo essencial das plantas e das culturas celulares desenvolvidas.....	18
6.8. Análise de eficiência do processo produtivo.....	18
6.9. Análise estatística.....	18
7. RESULTADOS ESPERADOS.....	19
8. CRONOGRAMA.....	19
9. ORÇAMENTO.....	20
10. REFERÊNCIAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

As primeiras evidências de uso da lavanda, remontam ao tempo dos gregos, egípcios e romanos, até chegar aos dias atuais. Sua popularidade é por causa de nossa atração por seus princípios ativos medicinais, bem como suas características inseticidas e até mesmo suas propriedades na desinfecção de ambientes. É tradicionalmente usada pela humanidade desde a medicina e perfumaria até a culinária (MCGIMPSEY & PORTER, 1999).

As espécies de lavanda pertencem a família **Lamiaceae**, que contém aproximadamente 260 gêneros e 6970 espécies. Apresenta ampla distribuição, são cosmopolitas e mais freqüentes nas regiões do Mediterrâneo e Oriente Médio. O gênero *Lavandula* apresenta aproximadas 30 espécies e seu habitat natural é na Europa, África e Ásia (MENDES, 2007). Dentro desse gênero encontram-se as variedades de maior importância mundial na extração do óleo essencial. A variedade Grosso (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.) é de destaque em área cultivada na região do Mediterrâneo (DAL VESCO et al, 2007).

O interesse econômico em óleos essenciais de diversas plantas tem aumentado ao longo dos anos, observam-se desenvolvimentos na engenharia genética para produção desse composto. Porém, existem muitas limitações na área, como o desconhecimento das vias biossintéticas dos metabólitos secundários e do número de genes que codificam as enzimas envolvidas nessas vias (MENDES, 2007).

Os métodos de propagação da lavanda mais convencionais são através de sementes, que muitas vezes apresentam dormência e necessitam de manuseio delicado e demorado, ou também por estacas. Ambos não se consolidam como técnicas eficientes. No Brasil, já se verifica algum mercado constituído com demanda regular por lavanda, embora a produção seja limitada ao cultivo da planta com interesse exclusivo em suas flores (MCGIMPSEY & PORTER, 1999).

A micropropagação é a fiel propagação de um genótipo selecionado por meio das técnicas da cultura *in vitro*. Essa tecnologia é associada com a produção em larga escala com preços competitivos, de plantas geneticamente idênticas à planta matriz, o que é extremamente importante para a propagação de genótipos selecionados de espécies produtoras de óleos essenciais (ANDRADE, 2002).

Através da micropropagação, plantas podem ser cultivadas em meio de cultivo específico, sob condições assépticas e ambiente controlado. A técnica oferece diversas

vantagens: possibilidade de multiplicação em larga escala e em curto período de tempo, a utilização de espaço reduzido para obtenção de elevada quantidade de plantas, a obtenção de plantas livres de doenças e pragas, elevada precisão em cronogramas de produção e a homogeneidade das plantas obtidas (GUERRA et al, 1999).

2. JUSTIFICATIVA

A lavanda é uma planta de grande potencial econômico, pode servir como alternativa de renda para agricultores e tem possibilidades distintas no ramo da fitoterapia. Frente a essas questões, é desconcertante como seu processo produtivo é pouco desenvolvido no Estado de Santa Catarina e a carência de investimentos de pesquisa sobre a lavanda pode se destacar como o principal fator limitante.

Em experimentos, foi observada a grande capacidade de adaptação da variedade Grosso na região de Curitibanos. Segundo Souza (2013), é uma das cidades mais antigas do estado e que possui consolidação nas indústrias madeireira e agrícola.

Diante da problemática quanto a demora na produtividade da lavanda, as influencias climáticas, a não eficiência nos métodos reprodutivos, a elevada importação de óleo essencial pelo país, que muitas vezes torna o produto pouco acessível economicamente, além disto, há poucas informações de pesquisa sobre a variedade Grosso no Estado de Santa Catarina. A partir deste projeto busca-se estudar a possibilidade de uso de métodos alternativos de obtenção de óleo essencial. Para tanto, o uso de diferentes métodos de propagação, utilizando o sistema de micropropagação, podem fornecer um produto final de boa qualidade e, de mais eficiência em relação ao tempo e processo na uniformidade da obtenção do óleo essencial. Esta nova tecnologia que pode servir como um meio para reduzir as importações do óleo essencial de Lavanda do país, uma fonte alternativa de renda para agricultores da região, ou como modelo de pesquisa para se tomar como base em eventuais estudos posteriores.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Classificação da Lavanda

Segundo classificação atual conforme o Sistema APG (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2009), as plantas de lavanda pertencem à Ordem Lamiales, à Família **Lamiaceae** e ao gênero **Lavandula**.

As lavandas pertencem à família **Lamiaceae**, uma das maiores do grupo das Angiospermas, com aproximadamente 260 gêneros e 6970 espécies. O gênero *Lavandula*, conta com mais de 30 espécies que abrangem seis seções: *Lavandula*, *Stoechas*, *Dentata*, *Pterostoechas*, *Chaetostachys*, e *Subnuda*. Entre as quais, a seção *Lavandula* contém as lavandas mais cultivadas em todo o mundo (MCGIMPSEY & PORTER, 1999).

A família **Lamiaceae** possui ampla distribuição, são cosmopolitas, entretanto são mais frequentes nas regiões mediterrâneas, no Oriente Médio e nas montanhas tropicais. É composta por ervas, arbustos e árvores, que se encaixam à mesma família por apresentam caules jovens quadrangulares, grande número de tricomas glandulares ricos em terpenos e flores com 5 pétalas (JUDD et al, 2002).

Os cultivares da lavanda verdadeira *Lavandula angustifolia* e do lavandin (*L. intermedia*), que é uma planta híbrida de *L. angustifolia* e *L. latifolia*, possuem destaque comercial. É possível diferenciar os cultivares de lavandin daqueles de *L. angustifolia* quando em floração, pois apresentam maior porte e ainda pelo seu óleo essencial que possui notas menos doces (MCGIMPSEY & PORTER, 1999).

Além disto, na família **Lamiaceae** existem algumas espécies aromáticas com algum interesse econômico, sendo utilizadas para a extração de óleos essenciais (*Mentha*, *Lavandula*, *Ocimum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*), que são utilizados depois ao nível aromático e medicinal, em cosméticos, como condimento, entre outros (LORENZI & MATOS, 2002).

Entre as principais variedades do gênero *Lavandula*, estão Abrialli, Grosso, Impress Purple, e Super. Os principais constituintes do óleo da variedade Grosso são monoterpenos tais como linalol e acetato de linalilo (PANIZZA & TOGNONI, 1988).

3.2. Descrição botânica do gênero *Lavandula*

As espécies pertencentes ao gênero são arbustos ou subarbustos eretos e aromáticos com caules majoritariamente lenhosos. As folhas são opostas, simples, inteiras, dentadas, pinadas ou bipinadas (Figura 1). Os tricomas das folhas são geralmente ramificados e conectados a glândulas. A inflorescência é uma espiga terminal, simples ou ramificada, densa e compacta ou comprida e larga com pedúnculo retangular ou quadrado. Podem apresentar-se na cor verde, vermelha, roxa ou branca. As brácteas férteis são opostas, alternas ou espiraladas, imbricadas ou dispostas em fileiras verticais. As brácteas estéreis formam uma grande pluma ou estrutura semelhante acima da espiga (PLATT, 2009).

As folhas possuem coloração cinza quando jovens tornando-se verde na fase adulta, medindo cerca de 5 a 6 cm de comprimento por 0,4 a 0,5 cm de largura. O fruto da lavanda é um aquênio e as sementes, são pequenas, são de cor preta, lisas e exalam o mesmo perfume característico da planta. A planta de lavanda tem altura entre 0,5 a 0,8 m, podendo ultrapassar 1 metro em algumas espécies. É importante destacar a influência da região e do clima sobre o desenvolvimento das plantas (MCGIMPSEY & PORTER, 1999).



Figura 1. Representação de uma planta de *Lavandula*.
Fonte: <www.herboristerie-grenoble.com>.

3.3. Óleo essencial

As plantas produzem uma quantidade vasta e diversa de compostos orgânicos, a maioria dos quais não aparentam participar diretamente no crescimento e no desenvolvimento das mesmas. Essas substâncias são tradicionalmente referidas como metabólitos secundários, sendo também conhecidos por produtos secundários ou produtos naturais (Croteau, 2000 citado por MENDES, 2007). A distribuição dessas substâncias, é restrita a um número reduzido de famílias, um gênero ou mesmo poucas espécies e a sua concentração varia de planta para planta (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos distintos: terpenos, fenóis e alcalóides. Alguns apresentam elevada volatilidade, sendo conhecidos como compostos voláteis ou componentes dos óleos essenciais (FACCHINI, 2001).

Óleo essencial é um termo que designa substâncias aromáticas, geralmente de odor agradável e intenso, na maioria em forma líquida, encontradas em diferentes órgãos vegetais. Evaporam rapidamente, quando expostos ao ar à temperatura ambiente, por isso também são chamados de óleos voláteis ou etéreos. Apresentam sabor ácido e picante. Quando extraídos recentemente são incolores ou ligeiramente amarelados, portanto não são muito estáveis e alteram-se principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (BISSET, 1994).

Os constituintes dos óleos essenciais podem existir sob a forma de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, aminas, entre outros. Apesar da complexidade da composição química dos óleos essenciais, as substâncias de natureza terpênic (mono-, sequi- e diterpenos) são os constituintes majoritários. Os demais compostos dividem-se em fenilpropanóides, ácidos gordos e ésteres (BASER, 1995).

Nas plantas, os óleos essenciais podem ser encontrados em canais secretores, idioblastos, tricomas secretores, bolsas e osmóforos. Em muitos casos encontram-se glicosilados, ocorrendo a separação por hidrólise da ligação glicosídica. Podem estar também associados a gomas (óleo-gomo-resina) ou resinas (óleo-resinas) e a libertação do óleo essencial destas combinações naturais pode ocorrer por destilação (BASER, 1995).

A composição de um óleo é determinada pela espécie vegetal que o produz e pela parte do vegetal em que se encontra (folhas, cascas, sementes, etc.) e pode variar segundo: estágio de desenvolvimento da espécie, a concentração de cada um dos

constituintes do óleo essencial do vegetal, condições ambientais, forma de obtenção, entre outros (BISSET, 1994).

Conforme relatado por Machado et al (2013), a lavanda é uma planta de reconhecida importância devido ao óleo essencial contido em suas flores e folhas, que é usado para a fabricação de remédios, pomadas, perfumes, cosméticos e produtos de limpeza (Tabela 1). Seu óleo essencial possui propriedades antiséptica, antiinflamatória, analgésica, antifúngica e bactericida, pois é rico em terpenos (Tabela 2).

Tabela 1. Algumas propriedades e modo de utilização do óleo essencial de lavanda.

Medicinal	Emocional	Dermatológico
Cicatrizante (T) Queimaduras (T) Leucorréia (B-A-M)	TPM (A-M-B) Insônia (A-B-M) Estados Nervosos (A-B)	Eczema (O) Regenerador Celular (O) Acne (O)
As letras indicam o modo mais eficiente de utilização:		
A - Aromatizador (+ ou - 9 gotas) B - Banhos (6 a 10 gotas na banheira com óleo vegetal) C - Compressas (5 a 10 gotas em 1/2 Lt. d'água) I - Inalação (2 gotas em um lenço ou inalador com água)		M - Massagem (50 gotas em 100 ml de óleo vegetal) O - Óleo aplicação (20 gotas em 50 ml de óleo vegetal) T - Uso tópico (em partes iguais com óleo de calêndula) BA - Banho de assento (10 gotas em 2 litros d'água)

Fonte: <www.bysamia.com.br>.

Tabela 2. Principais constituintes do óleo essencial de lavanda.

Constituintes	Teores aproximados	Terapêutica
Linalol	40 a 50 %	Bactericida, fungicida, antidepressivo
Acetato de Linalila	30 a 48 %	Antiinflamatório
Limoneno 1,8	5 %	Antioxidante, anticancerígeno
Acetato de Citronelila	16%	Bactericida

3.4. Finalidades e usos

A primeira causa de nossa atração pela lavanda são os seus princípios ativos medicinais, bem como aqueles relacionados com as suas características inseticidas e até para a desinfecção de ambientes. A lavanda é tradicionalmente usada pela humanidade desde a medicina até na perfumaria e remonta à Grécia antiga e ao Egito. Na era

moderna, o óleo essencial da lavanda foi largamente comercializado nas décadas que antecederam os anos 70 e 80, quando a sua produção apresentou ligeiro declínio. Nos anos 90, houve uma recuperação em função do início da produção em alguns países do Leste Europeu e na China, e, em especial com planos de estímulo à cultura na França (MCGIMPSEY & PORTER, 1999).

As plantas de lavanda são cultivadas comercialmente com o objetivo de produção em escala industrial para a obtenção de óleo essencial. É obtido através da destilação de folhas e flores para a fabricação de cosméticos, fármacos, fitoterápicos, perfumes finos, sabonetes, vinagres aromáticos, condimentos, tabacos e produtos de panificação, geralmente em níveis inferiores a 45 ppm. São utilizadas na medicina popular devido às suas diversas propriedades terapêuticas. Além disso, a lavanda também pode ser usada na confecção de artesanatos na forma de sachês perfumados, frascos, velas e itens decorativos (BIASI & DESCHAMPS, 2009; LORENZI & SOUZA, 2001).

Plantas medicinais e aromáticas também são consideradas ornamentais, devido à exuberância de folhas e flores quando utilizadas individuais ou em conjuntos, além de variedade de perfumes que as mesmas produzem. Por isso, as plantas medicinais passam a apresentar dupla finalidade em um jardim doméstico ou até mesmo em projetos paisagísticos: embelezar um determinado ambiente e fornecer material vegetal com propriedades terapêuticas à família deste local (Demattê & Coan, 1999 citados por RIVA, 2012).

3.5. Micropropagação

A cultura de tecidos de plantas é considerada uma técnica bastante promissora para a agricultura. A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é indiscutivelmente a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel em 1960, ao multiplicar orquídeas através da cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, que se diferenciavam e originavam embriões. A sucessiva divisão destes protocormos possibilitou acelerar o processo de propagação de orquídeas. Aproximadamente uma década depois, Smith e Murashige conseguiram obter plantas

inteiras a partir de meristemas apicais em meio contendo sais minerais e vitaminas enriquecidas com fitorreguladores (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

A cultura de tecidos vegetais (Figura 2), é feita de um explante, que é todo segmento de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*. Pode ser um fragmento de raiz, caule, folha ou de qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração. A regeneração só é possível devido à totipotência das células vegetais, que sob estímulo apropriado vão manifestar a potencialidade de iniciar um novo indivíduo multicelular (ANDRADE, 2002).

A eficácia da regeneração *in vitro* é determinada pelo genótipo da planta matriz, fatores ambientais *in vitro* e o meio de cultura, porém outros fatores físicos importantes incluem umidade relativa, teor de etileno e dióxido de carbono da fase gasosa do tubo de cultivo (GONÇALVES & ROMANO, 2013).

Espécies do gênero *Lavandula* vêm sendo propagadas com sucesso pela micropropagação. A partir desta tecnologia, é possível produzir em larga escala plantas geneticamente idênticas à planta matriz, o que é extremamente importante para a propagação de genótipos selecionados de espécies produtoras de óleos essenciais. Entretanto, diversos fatores interferem na regeneração das plantas *in vitro*, entre eles estão o tipo de meio de cultura, seguido do suplemento de reguladores de crescimento, concentração de sacarose, tipo de explante, entre outros (ANDRADE et al, 1999).

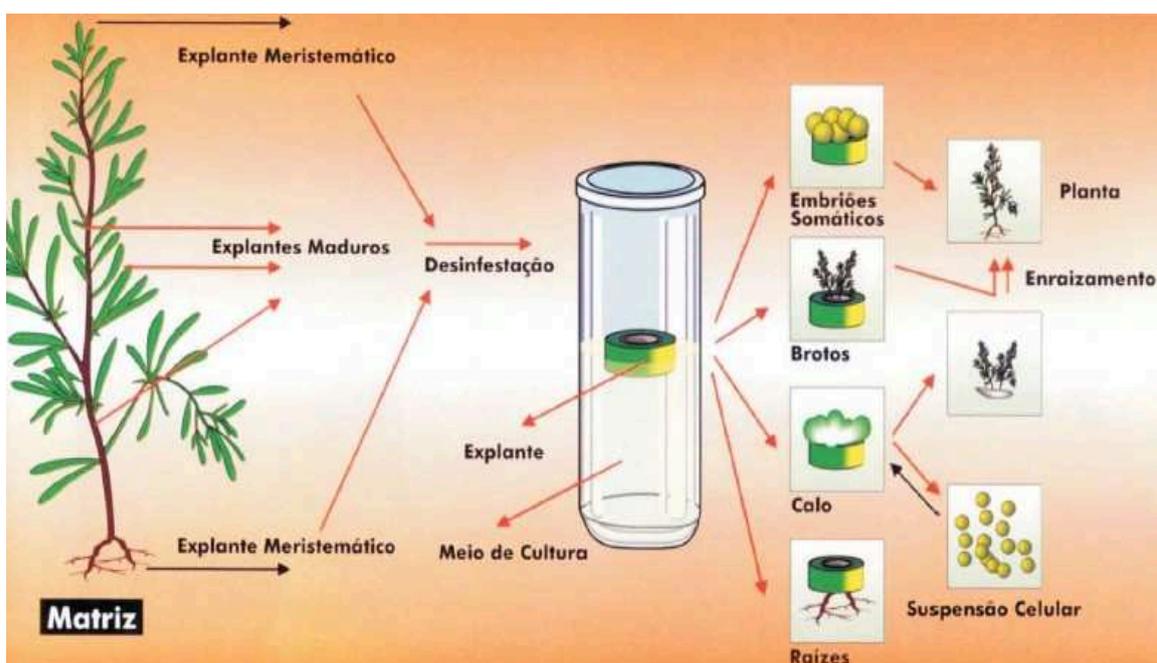


Figura 2. Princípio geral da cultura de tecido vegetal.
Fonte: Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 58.

4. HIPÓTESE

Métodos alternativos de cultivo *in vitro* de Lavanda são eficientes quanto à otimização de tempo no processo produtivo e qualidade do óleo essencial.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Promover a micropropagação de Lavanda para extração de óleo essencial como estratégia à reprodução convencional, visando redução de tempo no processo produtivo e qualidade do óleo essencial.

5.2. Objetivos específicos

- Diagnosticar plantas saudáveis à campo ou em vasos para a excisão e realização do protocolo de assepsia, dos explantes;
- Elaborar diferentes meios de cultura para indução de organogênese direta e indireta;
- Induzir a proliferação de brotos em escala por organogênese direta a partir de segmentos nodais;
- Induzir a proliferação de culturas celulares a partir de segmentos foliares e internos;
- Induzir o enraizamento e aclimatizar as mudas para estabelecer à campo;
- Extrair e analisar a composição do óleo essencial das plantas e das culturas celulares desenvolvidas;
- Analisar a eficiência do processo produtivo;
- Publicar em eventos científicos e revistas indexadas.

6. METODOLOGIA

6.1. Material vegetal e ambiente de cultivo

Uma pequena população de Lavanda (*L. intermedia*) variedade Grosso aponta bom desenvolvimento na Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitibanos, próximo à casas de vegetação ao lado do prédio.

Será realizada uma diagnose visual à campo das plantas de Lavanda, variedade Grosso, para detecção de algum tipo de estresse, ataque de praga ou doença, que possa vir a prejudicar o protocolo de reprodução. Serão então selecionadas as plantas saudáveis, que não apresentem sinais e nem sintomas de doenças. Mudanças destas plantas serão transplantadas para vasos e conduzidas em casa de vegetação, sob controle de temperatura e umidade, para promover a proliferação de brotações jovens para utilizar como fonte de explantes para o cultivo *in vitro*.

Os explantes livres de microorganismos indesejáveis, serão inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura previamente preparado, então devem ser devidamente fechados com papel alumínio e plástico filme e direcionados para a sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, escuro por 8 horas e temperatura de 25°C.

6.2. Elaboração dos meios de cultura

Serão produzidos diferentes meios de cultivo para a implantação dos dois métodos de micropropagação, sendo eles: Proliferação meristemática a partir de segmentos nodais e cultura celular proveniente da dediferenciação de explantes de folhas.

O meio de cultivo produzido para desenvolvimento de brotos a partir de segmentos nodais, será composto por meio MS com menor concentração de nutrientes que sua composição original, como indica Dias et al. (2002), solução de ferro, vitaminas de Morel, sacarose, fitorreguladores com maior concentração de citocinina (BAP 2,0 µM), para indução de brotos, água destilada, ágar e NaOH e HCl a 0,5N para ajuste do pH indicado de 5,8.

O meio de cultura básico utilizado no cultivo *in vitro* será composto pela formulação salina MS (Murashige & Skoog, 1962) e QL (Quoirin et al., 1977) adicionados de vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), 30 g L⁻¹ de sacarose e

com 7,5 g L⁻¹ de Agar-agar. Após o ajuste do pH para 5,8, os meios serão transferidos para tubos de ensaio (22 x 150mm) ou frascos do tipo conserva (340 ml) e hermeticamente fechados com papel alumínio e plástico filme e submetidos a autoclavagem a 121 °C, a 1,3 atm., por 15-20 minutos. O processo de inoculação das culturas deve ser realizado em uma câmara de fluxo laminar. E as culturas serão mantidas em ambiente de câmara BOD com temperatura de 25 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 14 horas.

6.3. Indução a proliferação de brotos por organogênese direta

Segmentos nodais e ápices caulinares com 1,5 a 2,0 cm de comprimento, com um a dois segmentos nodais, pela excisão de ramos de plantas matrizes conduzidas em ambiente controlado serão a fonte de explantes para a indução de brotos. Para o estabelecimento asséptico das culturas *in vitro*, será realizado o processo de desinfecção dos explantes: Lavagem em água corrente e 2-3 gotas de Tween 20 (sufactante); em câmara de fluxo laminar, submetendo-os seqüencialmente à exposição e agitação em recipiente contendo álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos e três enxágües com água autoclavada. Seguido de uma redução dos explantes contendo um segmento de nó com duas gemas axilares cada, eliminando eventual excesso de folha que pode vir a oxidar e/ou necrosar durante o desenvolvimento das culturas.

Para a indução de brotos, os segmentos nodais serão inoculados em tubos de ensaio (22 x 150 cm), contendo 10 ml de meio de cultura com diferentes combinações de fitorreguladores.

O desenho experimental será um bifatorial com 8 tratamentos: duas formulações salinas (MS e QL) combinados com a suplementação de Benzilaminopurina – BAP (0; 5; 1,0 e 1,5 µM). Cada unidade experimental será constituída de cinco tubos de ensaio contendo um explantes, de 0,8 a 1,0 cm contendo duas gemas por explante e repetidos quatro vezes em forma de blocos ao acaso. Após duas, três, quatro e cinco semanas de cultivo, serão coletados dados de altura de brotos (cm), número de brotos e números de nós por explantes. Dados relevantes durante o cultivo serão registrados por fotomicrografia.

6.4. Proliferação (Alongamento dos brotos)

Brotações induzidas e estabelecidas *in vitro*, serão repicadas para promover a proliferação de brotações múltiplas e o alongamento de brotos (preparação para a aclimatização) pelo subcultivo em meio de cultura. Será selecionado o melhor meio salino e a melhor concentração de BAP do meio de indução. Dados de altura de brotos (cm), número de brotos e números de nós por explantes serão coletados em cinco semanas de cultivo. Dados mais relevantes durante o cultivo foram registrados por fotomicrografia.

6.5. Indução do enraizamento, aclimatização e estabelecimento à campo

Após um período de aproximadamente 40 dias dos explantes em sala de crescimento, os tubos de ensaio serão retirados do local e levados para dentro da câmara de fluxo laminar para efetuar a repicagem dos brotos com altura superior a 1 cm, para estimular o enraizamento.

O desenvolvimento de raízes em explantes de lavanda, ocorre facilmente com o meio MS ausente de auxinas, porém essas se fazem necessárias para uma alta frequência de indução radicular (CALVO & SEGURA, 1989).

Para a fase de aclimatização dos brotos em condições *ex vitro*, serão isoladas as brotações mais vigorosas que serão imersas em diferentes concentrações de solução de AIB (0, 25, 50, 100 ppm) para promover o enraizamento das microestacas e a aclimatização concomitantemente. As microestacas serão transplantadas para bandejas de isopor de 128 células com substrato numa mistura na proporção de 1:2:1 de: Plantmax HT ®; Casca de arroz carbonizada e areia média. As bandejas ficarão acondicionadas em casa de vegetação com umidade e temperatura controladas, onde o turno de rega é automático de hora em hora, diariamente das 8h as 16h, por aproximadamente 2,5 minutos e a temperatura média é de 23°C, onde a máxima chega a 29°C e a mínima 19°C.

Após 60 dias de aclimatização, as brotações serão separadas em microestacas e transferidas das bandejas para tubetes de plástico contendo a mesma mistura de substrato e mantidas na condição a campo, próximas das casas de vegetação do

Campus. O clima é classificado como subtropical de tipo úmido e as chuvas são predominantes da primavera.

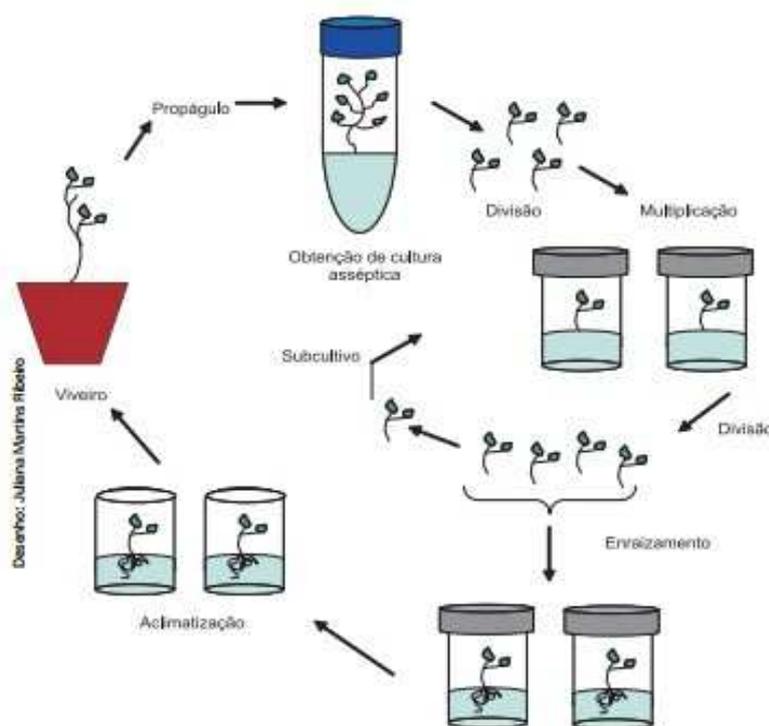


Figura 3. Esquema geral da obtenção de plantas a partir da micropropagação.

Fonte: Documentos / Embrapa Semiárido ISSN 1808-9992.

6.6. Indução e proliferação de culturas celulares

O material vegetativo coletado será levado para o laboratório para a confecção dos explantes, que serão constituídos por segmentos de folhas jovens de lavanda. Após a produção dos explantes, deve ser realizada a desinfecção dos mesmos, submetendo-os sequencialmente à exposição e agitação em recipiente contendo álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos e enxágüe com água destilada 3 vezes.

O material desinfetado será inserido em tubos de ensaio contendo o meio de cultura previamente preparado, então serão fechados com papel alumínio e plástico filme e direcionados para a sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, escuro por 8 horas e temperatura de 25°C.

O desenho experimental será um bifatorial com 12 tratamentos: duas formulações salinas (MS e QL) combinados com a suplementação com diferentes concentrações e combinações de fitorreguladores: ácido naftalenoacético - ANA (0; 0,1; 1 µM) com BAP (0 e 1 µM). Cada unidade experimental será constituída de cinco tubos

de ensaio contendo dois explantes foliares de 1,0 a 5,0 cm cada, e repetidos três vezes em forma de blocos ao acaso. Após duas, três e quatro semanas de cultivo serão coletados dados de diâmetro dos calos, número de brotos e números de nós por explantes. Dados relevantes durante o cultivo, quanto a qualidade e tipo celulares, serão registrados por fotomicrografia.

6.7. Extração e análise da composição do óleo essencial das plantas e das culturas celulares desenvolvidas

A extração do óleo essencial será realizada com aparelho graduado Clevenger, por hidrodestilação com água destilada. O material vegetal utilizado será composto por influorescências recém coletadas e folhas. As influorescências serão hidrodestiladas por 4 horas e as folhas por 2,5 horas. Estas amostras de óleo servirão de padrão comparativo com o óleo produzido pelas culturas celulares.

As culturas celulares passarão pelo mesmo procedimento de hidrodestilação. O óleo total extraído será armazenado em frascos de vidro e armazenado à -20°C até o momento da análise.

A análise química do óleo essencial será realizada pelo Departamento de Engenharia química e Engenharia de alimentos da UFSC, Campus Florianópolis.

6.8. Análise de eficiência do processo produtivo

A análise será realizada comparando os dados obtidos da produção de óleo essencial pela organogênese direta e pelas culturas celulares. A composição do óleo, o tempo até atingir a etapa de extração do mesmo e a sobrevivência dos explantes, serão os fatores de comparação e análise.

6.9. Análise estatística

Os dados coletados de cada parâmetro serão submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste Student-Newman-Keuls (SNK-5%) de separação de médias,

quando necessário os dados originais serão transformados em $(x+0,5)^{0,5}$ ou $\log(x+1)$, segundo as recomendações de Compton (1994).

7. RESULTADOS ESPERADOS

Ao final da execução do projeto espera-se que sejam obtidos bons resultados quanto o tempo de alcance à produtividade e a composição do óleo essencial. Os métodos de produção testados serão importantes ferramentas para desenvolvimento de estudos posteriores, bem como, servirão de modelo exemplo para agricultores e indústrias que trabalham com a obtenção de óleo essencial de lavanda.

8. CRONOGRAMA

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO (2015)												
ATIVIDADE	MÊS											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Coleta de plantas	X											
Produção de meios de cultura		X	X	X	X	X						
Indução e estabelecimento das culturas <i>in vitro</i>		X										
Multiplicação de brotos			X	X	X	X						
Indução e proliferação de culturas celulares				X	X	X						
Indução radicular e aclimatização						X						
Estabelecimento à campo							X	X	X	X	X	X
Extração e análise do óleo essencial							X			X		
Análise de dados e elaboração do trabalho escrito										X	X	X
Publicar em eventos científicos e revistas indexadas												X

9. ORÇAMENTO

MATERIAL PERMANENTE			
DESCRIÇÃO	QUANTIDADE (un)	VALOR UNITÁRIO (R\$)	VALOR TOTAL (R\$)
B.O.D	1	3.000,00	3.000,00
Refrigerador biplex 350 L	1	1.400,00	1.400,00
Ar condicionado	1	1.600,00	1.600,00
TOTAL MATERIAL PERMANENTE:			6.000,00
MATERIAL DE CONSUMO			
Vidrarias diversas de laboratório (erlemmeyer, Becker, bastão de vidro, tubos de ensaio e outros)	-	-	2.500,00
Frasco de vidro tipo conserva de 268mL e 340mL com tampa	1.000	1,00	1.000,00
Placa de Petri	200	4,00	800,00
Instrumentações diversas de laboratório (pinças, cabos de bisturi, lâminas, tesouras, papel filme e outros)	-	-	3.500,00
Reagentes químicos para meio de cultura (macronutrientes, micronutrientes, ágar, fitorreguladores, e outros)	-	-	2.000,00
Insumos de casa de vegetação (bandejas, substrato e ferramentas diversas)	-	-	1.500,00
Alcool 70%	100 L	7,00	700,00
TOTAL MATERIAL DE CONSUMO:			12.000,00
PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS			
Instalação da sala de crescimento (lâmpadas, fios, suportes e outros)	-	-	3.000,00
Instalação aparelho graduado Clevenger para extração de óleo	-	-	3.000,00
Análise de óleo essencial por laboratório da instituição	2	-	1.000,00
TOTAL PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS:			7.000,00
RECURSOS HUMANOS			
Bolsa de iniciação científica (12 meses)	1	420,00	5.040,00
TOTAL RECURSOS HUMANOS:			5.040,00
<u>TOTAL GERAL:</u>			<u>30.040,00</u>

CONTRAPARTIDA DO ORÇAMENTO			
DESCRIÇÃO	QUANTIDADE (un)	VALOR UNITÁRIO (R\$)	VALOR TOTAL (R\$)
Capela de fluxo laminar	1	4000,00	4000,00
Autoclave	1	47500,00	47500,00
Destilador de água	1	52000,00	52000,00
pHmetro	2	1100,00	2200,00
Balança analítica (0.001)	1	4500,00	4500,00
Balança semianalítica (0.01)	2	2500,00	5000,00
Microondas	1	300,00	300,00
Refrigerador biplex350 L	1	1400,00	1400,00
Microscópio estereoscópio binocular com zoom	1	3500,00	3500,00
TOTAL CONTRAPARTIDA ORÇAMENTO:			120.400,00

10. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, LB; ECHEVERRIGARAY, S; FRACARO, F.; PAULETTI, GF.; ROTA L. The effects of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.56, p. 79–83, 1999.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16p. (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 58).
- APG - ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009.
- BASER, K. H. C. 1995. Analysis and quality assessment of essential oils. In: Silva KT (ed). A manual on the essential oil industry. United Nations Industrial Development Organization. Viena. pp 155-172.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. *Plantas Aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial*. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160 p
- BISSET, N.G. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals - A handbook for practice on a scientific bases. Stuttgart: CRC Press, London. Medpharm,1994.
- CALVO, M. C.; SEGURA, J. 1989. *In vitro* propagation of Lavender. **HortScience** 24: 375–6.
- COMPTON M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.37, p.217-242, 1994.
- DAL VESCO, Lírio Luíz et al. Micropropagação de Lavanda cultivar Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur). **Revista Brasileira de Orticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, p. 716-720, 2007.
- DIAS, M. C.; ALMEIDA, R.; ROMANO, A. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through *in vitro* axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue Organ Culture** v.68: 99-102, 2002.
- FACCHINI, P. J. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 29-66.
- GONÇALVES, S.; ROMANO, A. 2013. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances** 31: 166-174.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, 1990. P. 99-169.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v. 34, n. 9, p. 1.557-1.563, 1999.

JUDD, W.; CAMPBELL, C.; KELLOGG, E.; STEVENS, P.; DONOGHUE, M. 2002. Plant systematics: a phylogenetic approach. 2 ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. pp. 466-468, 470-473.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. **Plantas ornamentais do Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2001. 1120 p.

MACHADO, M. P.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L. A. 2013. Application of IBA on *in vitro* and *ex vitro* rooting microcutting of *Lavandula angustifolia* Miller. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 4, n. 2, pp. 153-161.

MCGIMPSEY, J. A.; PORTER, N.G. Lavender: a growers guide for commercial production. New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited, 1999.

MENDES, Marta Daniela de Sá. Caracterização química e molecular de espécies das famílias Lamiaceae e Apiaceae da flora aromática de Portugal. 2007. 57 f. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa. 2007.

MOREL, G.M.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons **American Journal of Botany**, v. 38, p.138-140, 1951.

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

PANIZZA, M.; TOGNONI, F. 1988. Clonal Propagation, Callus Formation and Plant Regeneration of Lavandin. **Scientia Horticulturae** 37: 157-163.

PLATT, E. S. 2009. *Lavender*: How to grow and use the fragrant herb. 2nd. ed. Mechanicsburg PA: Stackpole books. 157 p.

QUISEN, C. R.; ANGELO, S. C. P. **Manual de procedimentos de laboratório de cultura de tecidos da Embrapa**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 48p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 61).

QUOIRIN M.; LEPOIVRE R.; BOXUS P., Un premier bilan de dix années de recherche sur les culture de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. C.R. **Recherches Agronomiques**, p. 93-117, 1977.

RIVA, Alcione Dalla. Caracterização morfológica e anatômica de *lavandula dentata* e *l. angustifolia* e estudos de viabilidade produtiva na região centro norte, RS. 2012. 185 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de produção vegetal) – Faculdade de Agronomia e Medicina veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 2012.

SOUZA, Salézio João. Economia Diversificada em Curitibaanos. Disponível em: <<http://www.curitibanos.sc.gov.br/cms/pagina/ver/codMapaItem/15372#.VFO22jTFM>> Acesso em: 23 de set. 2014.

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