

O Potencial de Plantas Aromáticas e Medicinais Endémicas da Região da Beira Interior. Conservação e Valorização

Inês Raquel Cristo Barrocas

20210849

Orientadores

Professor Coordenador Doutor José Carlos Dias Duarte Gonçalves

Doutora Joana Lopes Domingues

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciada em Biotecnologia Alimentar, realizado sob a orientação científica do Professor Coordenador Doutor José Carlos Dias Duarte Gonçalves, do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Doutora Joana Lopes Domingues, do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior.

**“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”**

Ricardo Reis

Agradecimentos

Ao terminar esta fase da minha vida não posso deixar de agradecer a todos aqueles que sempre me incentivaram, apoiaram e contribuíram, de uma ou outra forma, para que este trabalho fosse possível.

Em primeiro lugar, ao Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, na pessoa do Professor José Carlos Gonçalves não só por todas as aprendizagens enquanto Bolseira de Iniciação à Investigação, mas também pela sua orientação e disponibilidade.

À Doutora Joana Domingues, por disponibilizar o seu tempo, dar-me liberdade para ter autonomia e pela enorme simpatia e companheirismo demonstrado. Gostaria de expressar a minha profunda admiração e gratidão pelo seu esforço e dedicação que proporcionou na minha formação.

À Professora Doutora Fernanda Delgado, por toda a orientação no âmbito do Projeto Plants4Ageing e pela sua energia contagiante.

Às minhas colegas de trabalho Alice e Anabela pelas trocas de conhecimento e boa disposição que fizeram com que o tempo voasse.

Às estagiárias Marta e Mafalda por toda a ajuda e momentos de convívio.

Finalmente, desejo expressar a minha maior gratidão a todos quantos, aqui não mencionados, contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Bem Haja!

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto “PLANTS4AGEING: Potencial das Plantas Aromáticas e Medicinais no Envelhecimento Cardiovascular”. Promove – Projetos de I&D Mobilizadores, promovido pela Fundação La Caixa em parceria com o BPI e a FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia I.P. Projeto I&D mobilizador PD21-00003.



Resumo

Este trabalho surgiu no âmbito do projeto Plants4Ageing: Potencial de Plantas Aromáticas e Medicinais no Envelhecimento Cardiovascular. A escolha das espécies deveu-se à presença de compostos no óleo essencial capaz de controlar a senescência celular. As plantas aromáticas e medicinais têm sido objeto de intensos estudos científicos, em virtude do notável potencial biológico dos óleos essenciais que elas produzem.

Pretendeu-se estudar o potencial de três espécies da família *Lamiaceae* endêmicas da região da Beira Interior, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*, *Lavandula pedunculata* e *Thymus mastichina*. Desta forma, os objetivos passaram pela conservação através da macropropagação (propagação vegetativa) e micropropagação (estabelecimento e multiplicação), e pela valorização através do estudo da caracterização química. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação e a sua composição volátil foi analisada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

De acordo com os resultados deste trabalho, na micropropagação obtiveram-se melhores taxas de multiplicação para a *L. luisieri* ($5,53 \pm 2,13$), *L. pedunculata* ($4,60 \pm 2,21$), *T. mastichina* ($1,33 \pm 0,55$) com o meio de cultura MS suplementado $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ m-Topolin, $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ 6-benzilaminopurina, respetivamente. Na propagação vegetativa as percentagens de estacas enraizadas foram de 2,5%, 13 % e 2,5%, respetivamente. Por fim, a caracterização química do óleo essencial de *L. luisieri* apresentou, nos dois anos, como composto maioritário a fenchona (35,2%). De salientar a presença de compostos derivados do necrodano, como o acetato de *trans*- α -necrodilo (12,3%), assim como o acetato de lavandilo (7,1%) que surgiram como principais constituintes do óleo essencial. Todavia, para *L. pedunculata*, nos dois anos analisados, a fenchona (63,8%) foi o composto maioritário. Já o óleo essencial de *T. mastichina* apresentou elevadas percentagens de área relativa dos compostos 1,8 cineol (64,9%, 2024) e linalol (53,1%, 2023).

Palavras chave

Espécies endêmicas, micropropagação, óleo essencial, perfil volátil, propagação vegetativa.

Abstract

This work was carried out as part of the Plants4Ageing project: Potential of Aromatic and Medicinal Plants in Cardiovascular Ageing. The species were chosen because of the presence of compounds in the essential oil that can control cellular senescence. Aromatic and medicinal plants have been the subject of intense scientific study due to the remarkable biological potential of the essential oils they produce.

The aim was to study the potential of three species of the *Lamiaceae* family endemic to the Beira Interior region, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*, *Lavandula pedunculata* and *Thymus mastichina*. The objectives were conservation through macropropagation (vegetative propagation) and micropropagation (establishment and multiplication), and valorisation through the study of chemical characterisation. The essential oils were obtained by hydrodistillation and their volatile composition was analysed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

According to the results of this work, in micropropagation, the best multiplication rates were obtained for *L. luisieri* (5.53 ± 2.13), *L. pedunculata* (4.60 ± 2.21), *T. mastichina* (1.33 ± 0.55) with MS culture medium supplemented with 0.5 mg l^{-1} m-Topolin, 0.1 mg l^{-1} 6-benzylaminopurine, respectively. In vegetative propagation, the percentages of rooted cuttings were 2.5%, 13% and 2.5% respectively. Finally, the chemical characterisation of the essential oil of *L. luisieri* showed fenchone (35.2%) to be the main compound in both years, with the presence of compounds derived from necrodane, such as trans- α -necrodiyl acetate (12.3%), as well as lavandyl acetate (7.1%) appearing as the main constituents of the essential oil. However, for *L. pedunculata*, in the two years analysed, fenchone (63.8%) was the main compound. The essential oil of *T. mastichina* showed high percentages of relative area of the compounds 1,8 cineol (64.9%, 2024) and linalol (53.1%, 2023).

Keywords

Endemic species, essential oil, micropropagation, , vegetative propagation, volatile profile.

Índice geral

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
Índice geral.....	XI
Índice de figuras.....	XIII
Índice de tabelas.....	XV
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	XVII
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	2
3. Plantas aromáticas e medicinais.....	2
3.1 <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> (Rozeira).....	3
3.1.1 Descrição.....	3
3.1.2 Distribuição e habitat.....	3
3.1.3 Utilizações.....	3
3.2 <i>Lavandula pedunculata</i> (Mill.) Cav.....	4
3.2.1 Descrição.....	4
3.2.2 Distribuição e habitat.....	4
3.2.3 Utilizações.....	4
3.3 <i>Thymus mastichina</i> L.....	4
3.3.1 Descrição.....	4
3.3.2 Distribuição e habitat.....	5
3.3.3 Utilizações.....	5
4. Micropropagação.....	5
4.1 Princípios básicos da micropropagação.....	5
4.2 Fases da micropropagação por proliferação de meristemas.....	6
4.3 Material e Métodos.....	7
4.3.1 Micropropagação: estabelecimento.....	7
4.3.2 Micropropagação: multiplicação.....	8
4.4 Resultados e discussão.....	9
4.4.1 Micropropagação: estabelecimento.....	9
4.4.2. Micropropagação: multiplicação.....	11
5. Propagação vegetativa - estacaria.....	15

5.1 Estado da arte	15
5.2 Material e métodos	16
5.3 Resultados e discussão	17
6. Óleos essenciais e hidrolatos.....	19
6.1 Estado da arte	19
6.2 Material e métodos	20
6.2.1 Material vegetal	20
6.2.2 Obtenção de extratos vegetais	20
6.2.3 Caracterização dos compostos voláteis.....	21
6.2 Resultados e discussão	22
7. Conclusão	26
8. Referências bibliográficas.....	26

Índice de figuras

Figura 1- <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> (Jardim do CBPBI, junho 2024).	3
Figura 2- <i>L. pedunculata</i> (Jardim do CBPBI, março 2024).	4
Figura 3- <i>T. mastichina</i> (Jardim do CBPBI, junho 2024).	4
Figura 4- Estabelecimento de <i>L. pedunculata</i>	9
Figura 5- Percentagem de explantes viáveis, inviáveis e contaminações para as espécies em estudo.	10
Figura 6- Resposta dos explantes após 1 mês em cultura <i>in vitro</i> : a) <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e b) <i>T. mastichina</i>	11
Figura 7- Diferentes afídeos encontrados nas <i>Lavandula</i> sp.	11
Figura 8- Atuais culturas stock de a) <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> ; b) <i>L. pedunculata</i> e c) <i>T. mastichina</i>	11
Figura 9- Influência de BAP na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	12
Figura 10- Influência de m-Topolin na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>L. pedunculata</i> . .	12
Figura 11- Influência de diferentes citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>T. mastichina</i>	13
Figura 12- Multiplicação de <i>L. pedunculata</i> sem Regulador de Crescimento.	14
Figura 13- Multiplicação de <i>L. pedunculata</i> com 0,5 mg l ⁻¹ de m-Topolin.	14
Figura 14- Explante de <i>L. pedunculata</i> parcialmente vitrificado.	14
Figura 15- Sistema radicular das espécies em estudo: a) <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> ; b) <i>L. pedunculata</i> ao 1° mês; c) <i>L. pedunculata</i> ao 2° mês; d) <i>T. mastichina</i> induzido com IBA; e) <i>T. mastichina</i> induzido com CLONEX.	18
Figura 16- Larva encontrada no sistema radicular de <i>L. pedunculata</i>	19
Figura 17- Processo de secagem natural das espécies <i>L. pedunculata</i> , <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>T. mastichina</i> recolhidas na Reserva Natural da Serra da Malcata.	20
Figura 18- Hidrodestilação de <i>T. mastichina</i>	21

Índice de tabelas

Tabela 1- Taxonomia das espécies em estudo (Flora ibérica).....	2
Tabela 2- Protocolo de desinfecção e composição dos meios de cultura utilizados para o estabelecimento das espécies em estudo.	8
Tabela 3- Concentrações de IBA na indução da rizogénese para os géneros <i>Lavandula</i> e <i>Thymus</i>	16
Tabela 4- Percentagem de enraizamento de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	17
Tabela 5- Percentagem de enraizamento de <i>L. pedunculata</i>	17
Tabela 6- Percentagem de enraizamento de <i>T. mastichina</i>	17
Tabela 7- Volume do HD e rendimento de OE obtidos para as espécies analisadas.	22
Tabela 8- Identificação e quantificação relativa de compostos dos OEs e HD de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	23
Tabela 9- Identificação e quantificação relativa de compostos dos OEs e HD de <i>L. pedunculata</i>	24
Tabela 10- Identificação e quantificação relativa de compostos dos OEs e HD de <i>T. mastichina</i>	25

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

2ip	6-(γ - γ -Dimethylallylamino)-purina
atm.	Atmosfera
BAP	6-Benzilaminopurina
CBPBI	Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
CMreb	Comprimento do maior rebento
FDA	Food and Drug Administration
GA ₃	Ácido giberélico
GC	Cromatografia Gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a detetor de espectrometria de massa
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
HD	Hidrolato
HgCl ₂	Bicloreto de mercúrio
IBA	Ácido Indole-3-Butírico
IPCB	Instituto Politécnico de Castelo Branco
IR	Índice de Retenção
kin	Cinetina
L.	Lineu
m	Massa
Mill.	Miller
min.	Minutos
MS	Meio de Murashige & Skoog
NaOCl	Hipoclorito de sódio
<i>n</i> -hex	<i>n</i> -hexano
Nraiz	Número de raízes
Nreb	Número de rebentos
OE	Óleos Essenciais
PAM	Plantas Aromáticas e Medicinais
pH	Potencial de Hidrogénio
ppm	Partes por Milhão
RC	Regulador de Crescimento
Rep	Repetição
rpm	Rotações por minuto
seg.	Segundos
subsp.	Subespécie
TM	Taxa de multiplicação
Tr	Tempo de retenção
V	Volume

1. Introdução

Este trabalho de estágio surgiu no âmbito do projeto Plants4Ageing, Potencial de Plantas Aromáticas e Mediciniais (PAM) no envelhecimento cardiovascular. Este projeto é liderado pela Universidade de Coimbra em consórcio com outras entidades, nomeadamente o Instituto Politécnico de Castelo Branco (IPCB) e o Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI).

Para este projeto selecionaram-se seis espécies de PAM: orégão (*Origanum vulgare* subsp. *virens* (Hoffmanns. & Link) Bonnier & Layens); alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.); funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.); tomilho bela-luz (*Thymus mastichina* L.); rosmaninho-maior (*Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav.); e rosmaninho-menor (*Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira).

A escolha das espécies teve por base ensaios prévios que já mostraram resultados promissores, bem como dados bibliográficos que apontam para os usos cardiovasculares destas plantas (Neves et al., 2009; Novais et al., 2004).

Os três objetivos fundamentais do projeto passam pelo:

- 1) Desenvolvimento de um extrato/composto encapsulado com potencial no combate ao envelhecimento cardiovascular;
- 2) Otimização de técnicas de cultura *in vitro* para a preservação e produção em larga escala das espécies selecionadas;
- 3) Promoção da literacia científica com envolvimento público na ciência e formação no setor das PAM.

O projeto Plants4Ageing baseia-se em quatro pilares fundamentais: Conservação, Valorização, Formação e Promoção.

No CBPBI, no que diz respeito ao primeiro pilar, a conservação das plantas consistiu na herborização; na micropropagação, isto é, propagação *in vitro*, através das fases estabelecimento, multiplicação, aclimatização e enraizamento; e na macropropagação, ou seja, propagação *ex vitro*, por via seminal ou por estacaria.

No segundo pilar valoriza-se a investigação na área da biotecnologia associada a setores produtivos como o das PAM. Acrescenta-se valor às PAM da região da Beira Interior, promovendo o seu uso como uma ferramenta económica e que contribua para o desenvolvimento sustentável. Neste sentido, no CBPBI realizou-se a colheita e secagem das plantas. Parte do material vegetal foi expedido para a Universidade de Salamanca para avaliação dos extratos, e a restante para a hidrodestilação no CBPBI. Através deste processo obtiveram-se o óleo essencial (OE), o hidrolato e o extrato aquoso da decocção. Por fim, realizou-se a caracterização química do perfil volátil do OE através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

O terceiro e quarto pilares basearam-se na formação e promoção da literacia científica.

O presente relatório encontra-se estruturado da seguinte forma:

- Objetivos
- Plantas Aromáticas e Medicinais
- Micropropagação (material e métodos, resultados e discussão)
- Propagação vegetativa (material e métodos, resultados e discussão)
- Óleos essenciais e hidrolatos (material e métodos, resultados e discussão)
- Conclusão
- Referências bibliográficas

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos a conservação das espécies através da micropropagação (estabelecimento e multiplicação *in vitro*) e de estacaria, e a valorização através da caracterização do perfil volátil dos diferentes óleos essenciais e hidrolatos, extraídos por hidrodestilação de três espécies, *L. stoechas* subsp. *luisieri*, *L. pedunculata* e *T. mastichina*, endêmicas da região da Beira Interior.

3. Plantas Aromáticas e Medicinais

Neste trabalho selecionaram-se plantas aromáticas e medicinais (PAM) endêmicas da região da Beira Interior com capacidade de retardar o envelhecimento cardiovascular. Deste ponto de vista foram selecionadas três espécies com resultados mais promissores na atividade anti-inflamatória, *L. stoechas* subsp. *luisieri* (rosmaninho-menor), *L. pedunculata* (rosmaninho-maior) e *T. mastichina* (tomilho bela-luz) (Tabela 1).

Tabela 1- Taxonomia das espécies em estudo (Flora ibérica).

Ordem	Família	Género	Espécie	Subespécie	Classificador	Nome Comum
Lamiales	Lamiaceae	<i>Lavandula</i>	<i>Lavandula stoechas</i>	<i>luisieri</i>	Rozeira	rosmaninho-menor
			<i>Lavandula pedunculata</i>	-	(Mill.) Cav.	rosmaninho-maior
		<i>Thymus</i>	<i>Thymus mastichina</i>	-	L.	tomilho bela-luz

As PAM têm sido muito estudadas devido ao potencial biológico dos óleos essenciais (OE) e outros extratos (Domingues et al., 2023b; Taghouti et al., 2019).

Atualmente, a procura por compostos derivados de plantas pela indústria alimentar, farmacêutica e cosmética tem aumentado, porque são aceites pelos consumidores como relativamente seguros e saudáveis em comparação com os seus homólogos sintéticos (Costa et al., 2013).

Para além de melhorarem as propriedades organoléticas dos produtos alimentares, sabe-se que as PAM também contribuem para a sua conservação. Na indústria

alimentar, por exemplo, os antioxidantes são muito utilizados para este fim. Estes compostos previnem ou retardam as reações de oxidação, de modo a manter a qualidade dos alimentos por períodos mais longos e a prolongar o prazo de validade (Delgado et al., 2014).

É aconselhável que o uso de plantas medicinais seja sempre realizado com prudência e muitas vezes sob vigilância médica. Especial atenção deve ser dada a mulheres grávidas e a crianças menores de seis anos, que não devem consumir produtos à base de plantas, sem aconselhamento médico (Tavares et al., 2010).

3.1 *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira)

3.1.1 Descrição

A *L. stoechas* subsp. *luisieri* apresenta-se como um arbusto perene (Upson & Andrews, 2004). Morfologicamente, é um caméfito lenhoso, tomentoso e aromático podendo atingir os 50 cm. As inflorescências são espigas cilíndricas pálido-purpúreas (Figura 1), curtamente pedunculadas (5-15 mm) ou sésseis com brácteas férteis. Floresce de março a julho (Arantes, 2020; Jorge, 2014; Morales, 2010).



Figura 1- *L. stoechas* subsp. *luisieri* (Jardim do CBPBI, junho 2024).

3.1.2 Distribuição e habitat

É muito comum no Sudoeste de Espanha e no Centro e Sul de Portugal. É uma planta termófila, típica dos sargaçais de solos xistosos ou calcários, bastante secos (Arantes, 2020). A espécie ocorre preferencialmente entre as cotas de 400-700 m. A ocupação do solo não parece ser um fator limitante à sua distribuição (Delgado, 2010).

3.1.3 Utilizações

A *L. stoechas* subsp. *luisieri* tem sido tradicionalmente utilizada como expetorante, estimulante, espasmolítico e laxante, para aliviar dores de cabeça e enxaquecas, e pelas suas propriedades desinfetantes (Zuzarte et al., 2022). Esta planta produz metabolitos secundários exclusivos, nomeadamente terpenos no óleo essencial e compostos fenólicos com elevado potencial biológico. Algumas investigações etnobotânicas sugerem o uso desta espécie para o tratamento da indigestão, azia, dores de cabeça, circulação sanguínea, e também atua como sedativo, antidermatite, asma e bronquite nasal descongestiva (Domingues, et al., 2023a). O OE apresenta atividade antimicrobiana, antifúngica, anticancerígeno, carminativo (relaxamento muscular), antidepressivo, eficaz contra queimaduras e picadas de mosquito (Araújo, 2012).

3.2 *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav.



Figura 2- *L. pedunculata* (Jardim do CBPBI, março 2024).

3.2.1 Descrição

É uma planta ornamental (Costa et al., 2013), perene que pode atingir até 70 cm (Morales, 2010). Esta distingue-se da *L. stoechas* subsp. *luisieri* sobretudo pela forma das brácteas e pelo comprimento do pedúnculo (Figura 2). A *L. pedunculata* apresenta hastes florais muito longas (5-24 cm) e brácteas férteis mais ou menos obtriangulares. Morfologicamente é um caméfito lenhoso ou nanofanerófito tomentoso. Floresce de março a julho (Arantes, 2020; Jorge, 2014; Morales, 2010).

3.2.2 Distribuição e habitat

É endémica da Península Ibérica e norte de África, cresce em carrascais, tomilhais, sargaçais, piornais, estevais, zimbrais, arrelvados pobres e etapas de substituição de azinhais, carvalhais de carvalho português e sobreirais. Aparece também em terrenos baldios, dunas litorais, em solos siliciosos e xistosos, e adapta-se a altitudes de 0 a 1700 m (Arantes, 2020).

3.2.3 Utilizações

Esta planta tem interesse para a indústria alimentar, medicinal, industrial, cosmética e farmacêutica (Lopes, 2017). A *L. pedunculata* tem sido utilizada tradicionalmente no tratamento de bronquite, tosse, asma, dores de cabeça, ansiedade, insónia, acidentes vasculares cerebrais e dispepsia, e como analgésico (Zuzarte et al., 2022). Tem propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, antioxidantes, antitumoral, anti-histamínica, anti-inflamatória e anticolinesterases. A espécie *L. pedunculata* tem sido utilizada popularmente como agente terapêutico com ação antissética, para limpeza de feridas, recorrendo a lavagem das mesmas com extratos aquosos (infusões) deste material vegetal (Lopes, 2017).

3.3 *Thymus mastichina* L.

3.3.1 Descrição

T. mastichina é vulgarmente conhecido como tomilho belaluz (Figura 3). Esta planta aromática apresenta-se como um arbusto semilenhoso que atinge até 50 cm de altura. É caracterizado por folhas simples e opostas e por grupos de flores bilabiadas em cabeça ou capítulos que florescem de abril a junho (Arantes, 2020; Rodrigues et al., 2020). Os cálices (com mais de 5 mm) terminam com inflorescências maiores que 10 mm de diâmetro e com brácteas oblonga-ovadas ou elípticas (Arantes, 2020; Morales, 2010).



Figura 3- *T. mastichina* (Jardim do CBPBI, junho 2024).

3.3.2 Distribuição e habitat

É uma espécie endêmica da Península Ibérica, encontrando-se difundida de norte a sul de Portugal (geralmente no interior) com grande plasticidade ecológica, e está presente geralmente em clareiras de matos xerofíticos, bermas e taludes de estradas, campos de cultivo abandonados, pinhais, sobreirais, zonas pedregosas e afloramentos rochosos. Prefere substratos siliciosos, arenosos, xistosos, calcários, e podem ocorrer até 330 m de altitude (Arantes, 2020).

3.3.3 Utilizações

T. mastichina pode ser utilizado fresco ou seco e as suas folhas são tradicionalmente utilizadas como condimento/aromatizante, no tempero de pratos tradicionais e saladas, na conservação de azeitonas, na aromatização do azeite e como substituto do sal. Esta planta medicinal e aromática também é utilizada como fonte de óleo essencial nas indústrias cosmética e de perfumaria. Infusões com partes secas da planta têm sido usadas para aliviar constipações, tosse, irritações na garganta e dores abdominais, enquanto infusões com partes frescas da planta têm sido usadas para o tratamento da indigestão e dores de estômago (Rodrigues et al., 2020).

As suas propriedades aromáticas agradáveis desempenham um papel interessante na substituição de ingredientes sintéticos geralmente introduzidos em processos industriais (Kessler et al., 2022).

O *T. mastichina* é conhecido pelo seu forte aroma a eucalipto e tem sido utilizado para diversos problemas de saúde devido aos seus efeitos antissépticos, digestivos, antirreumáticos e antitússicos. Em relação às atividades biológicas relatadas em diferentes estudos, o óleo essencial e/ou extratos de *T. mastichina* também apresentam atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, inseticida, repelente, antiviral, anti-inflamatória e demonstrou resultados no tratamento da doença de Alzheimer (Leal et al., 2017; Rodrigues et al., 2020).

4. Micropropagação

4.1 Princípios básicos da micropropagação

Os avanços nas abordagens biotecnológicas proporcionam um conjunto de técnicas que contribuem para a resolução de problemas de extinção ou erosão genética, nomeadamente de plantas (Leal et al., 2017). A micropropagação é possível porque as células vegetais têm a capacidade de regenerar e originar novas plantas por um processo conhecido por totipotência (Neves, 2020).

A micropropagação assume uma importância cada vez maior na clonagem de plantas utilizadas para a extração de compostos químicos. A micropropagação pode garantir uma produção de plantas em larga escala em condições controladas, num curto período e isentas de doenças, a fim de evitar a exploração de populações silvestres (Gonçalves & Romano, 2013), assim como a conservação de espécies que se encontrem ameaçadas ou em perigo de extinção (Neves, 2020). Embora esta técnica

seja mais dispendiosa, comparativamente a técnicas de propagação convencionais, permite obter uma maior uniformidade de plantas e por sua vez dos seus metabolitos secundários (Zuzarte et al., 2010).

Das três técnicas de micropropagação normalmente utilizadas, a proliferação de meristemas axilares da parte aérea é a mais adequada para a clonagem de plantas, uma vez que a propagação por organogénese ou por embriogénese somática pode induzir variabilidade entre as plantas regeneradas (Zuzarte et al., 2010).

O princípio básico da micropropagação *in vitro* é fornecer um meio de cultura com todos os componentes essenciais para o desenvolvimento de uma planta. A eficiência do protocolo de micropropagação *in vitro* é influenciada por vários fatores, especialmente a composição do meio base e o teor em reguladores de crescimento. De acordo com as necessidades fisiológicas da planta são adicionados ao meio de cultura uma fonte de carbono (sacarose), macronutrientes, micronutrientes, vitaminas (ácido nicotínico, piridoxina e tiamina, entre outras), o inositol e a glicina, e reguladores de crescimento (auxinas, citocininas, giberelinas), e um agente gelificante (agar). O pH do meio é ajustado para determinado tipo de espécie (Neves, 2020).

4.2 Fases da micropropagação por proliferação de meristemas

A micropropagação por proliferação de meristemas, caracteriza-se por ter cinco fases principais na sua execução: (i) a seleção da planta-mãe e a devida preparação do explante; (ii) o estabelecimento; (iii) a multiplicação; (iv) o enraizamento (que pode ser executado *in vitro* ou *ex vitro*); e, (v) a aclimatização (Ramalho, 2022).

A **seleção da planta-mãe** e a preparação do explante é das fases mais importantes para todo o processo, pois, as restantes dependem das condições de preparação da mesma, relativamente às contaminações por fungos e/ou bactérias. Dessa forma, há que garantir que a planta-mãe selecionada apresenta um bom estado fisiológico e sanitário. Estas componentes são fundamentais para o alcance do sucesso no estabelecimento dos explantes (Canhoto, 2010).

Relativamente à segunda fase, o **estabelecimento** da cultura passa por selecionar e preparar os explantes que se pretendem estabelecer. Deve ser realizada a desinfeção do material vegetal, com diferentes substâncias desinfetantes como álcool, hipoclorito de sódio ou bicloreto de mercúrio, bem como com fungicidas (por exemplo o Mancozebe). Após lavagem dos explantes com água destilada esterilizada colocam-se em meio de cultura esterilizado, em ambiente assético. Após esta etapa de desinfeção, deve-se ter em consideração alguns fatores como a temperatura e a luz em que os explantes crescem. Ambos os fatores influenciam diretamente o crescimento e desenvolvimento dos explantes (Ramalho, 2022).

A fase da **multiplicação** tem como objetivo multiplicar os explantes de forma a obter um maior número de novos explantes, ou seja, gerar clones, mantendo a estabilidade genética da planta-mãe. Deste modo, nesta fase é necessário ter em conta a formulação do meio de cultura. A metodologia passa por retirar os explantes obtidos

na etapa anterior, segmentá-los e colocá-los em novo meio de cultura. De forma a garantir o êxito desta fase, pode recorrer-se ao uso de reguladores de crescimento, como por exemplo as citocininas que promovem os processos de divisão e de diferenciação celular.

A fase seguinte consiste no **enraizamento**. Esta fase pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes, sendo que pode ser realizada *in vitro* ou *ex vitro*. Recorre-se ao uso de reguladores de crescimento, geralmente auxinas, para estimular a iniciação radicular, colocando depois a planta em substrato (Ramalho, 2022).

A última fase do processo da micropropagação é a **aclimatização**, que visa otimizar as plantas de condições *in vitro* para *ex vitro*, para, de seguida, irem para a estufa e, por fim, para o campo. Nesta fase, as plantas adaptam-se gradualmente às condições exteriores, nomeadamente luz, temperatura e humidade relativa. É neste momento que as plantas desenvolvem estratégias para se adaptarem mais facilmente ao exterior, entre as quais o desenvolvimento de estomas, a indução de mecanismos para controlar a transpiração e a perda de água e, o aumento da taxa de fotossíntese. Por outras palavras, esta fase é essencial para as plantas se adaptarem e tornarem autossuficientes fotossinteticamente (Canhoto, 2010).

4.3 Material e métodos

4.3.1 Micropropagação: estabelecimento

Para o estabelecimento *in vitro* recolheu-se o material vegetal das plantas-mãe, presentes no Jardim do CBPBI. Os segmentos caulinares foram sujeitos a um processo de desinfeção da superfície com bicloreto de mercúrio (HgCl_2) ou com hipoclorito de sódio (NaOCl). Na Tabela 2 encontram-se detalhados os protocolos de desinfeção aplicados e respetivos meios de cultura. Após as lavagens com água destilada esterilizada, os segmentos foram colocados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g l^{-1} de sacarose e nalguns casos com 10 mg l^{-1} de ácido ascórbico. O ácido ascórbico foi utilizado para minimizar as frequentes oxidações que normalmente podem ocorrer. O pH foi ajustado de acordo com as características de cada espécie após a adição de 7 g l^{-1} de agar. Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos a 1 atm. Os explantes foram preparados com 2 a 3 gomos axilares, o equivalente a 1-1,5 cm, com corte em bisel. Foram introduzidos em tubos de ensaio com 13 ml de meio de cultura e mantidos numa câmara bioclimática a $25/22 \text{ }^\circ\text{C}$, dia e noite, respetivamente, com um fotoperíodo de 16 horas dia/8 horas noite. As manipulações do material vegetal foram realizadas em condições assépticas numa câmara de fluxo laminar.

Na avaliação dos ensaios consideraram-se a percentagem de explantes viáveis, inviáveis e as contaminações.

Tabela 2- Protocolo de desinfecção e composição dos meios de cultura utilizados para o estabelecimento das espécies em estudo.

Espécie	<i>L. stoechas subsp. luisieri</i>	<i>L. pedunculata</i>	<i>T. mastichina</i>
Protocolo de desinfecção	25 min. Água corrente	Material recolhido ficou 2 dias em água	25 min. Água corrente
	15 min. Mancozebe (0,5 g l ⁻¹)	25 min. Água corrente	10 min. Mancozebe (0,5 g l ⁻¹)
	30 seg. Etanol 70%	45 seg. Etanol 70%	30 seg. Etanol 70%
	5 min. HgCl ₂ (250 mg l ⁻¹) + gotas de Tween 20	15 min. Mancozebe (1 g l ⁻¹)	10 min. NaOCl (1:3) + gotas de Tween 20
	3 Passagens por água destilada estéril (3 min. cada)	8 min. HgCl ₂ (250 mg l ⁻¹) + gotas de Tween 20	3 Passagens por água destilada estéril (3 min. cada)
5 min. Ácido ascórbico (0,5 g l ⁻¹)	3 Passagens por água destilada estéril (3 min. cada)	5 min. Ácido ascórbico (0,5 g l ⁻¹)	

Repicou-se para Meios de Cultura diferentes

Meio de Cultura	MS	MS	MS
Vitaminas	1 mg l ⁻¹ Tiamina	1 mg l ⁻¹ Tiamina	0,1 mg l ⁻¹ Tiamina
	1 mg l ⁻¹ Piridoxina	1 mg l ⁻¹ Piridoxina	0,5 mg l ⁻¹ Piridoxina
	1 mg l ⁻¹ Ácido nicotínico	1 mg l ⁻¹ Ácido nicotínico	0,5 mg l ⁻¹ Ácido nicotínico
	1 mg l ⁻¹ Ácido ascórbico	10 mg l ⁻¹ Ácido ascórbico	
	1 mg l ⁻¹ Pantotenato de cálcio	1 mg l ⁻¹ Pantotenato de cálcio	
Reguladores de Crescimento	1 mg l ⁻¹ Glicina	1 mg l ⁻¹ Glicina	2 mg l ⁻¹ Glicina
	0,2 mg l ⁻¹ BAP	0,2 mg l ⁻¹ BAP	1,0 mg l ⁻¹ Kin + 0,3 mg l ⁻¹ GA3
pH	5,7 - 5,8	5,7 - 5,8	5,8

4.3.2 Micropropagação: multiplicação

Na multiplicação, o material vegetal foi repicado a partir da cultura estabelecida anteriormente. As manipulações do material vegetal foram realizadas em condições assépticas numa câmara de fluxo laminar. Os explantes foram cortados em tamanhos apropriados com 2 a 3 gomos axilares e cultivados em meio previamente esterilizado. O meio de cultura utilizado foi formulado por Murashige e Skoog (1962) suplementado com vitaminas, sacarose e agar igual ao utilizado no estabelecimento. Foi autoclavado a 121 °C durante 20 min a 1 atm. Todas as culturas foram colocadas numa câmara bioclimática sob um fotoperíodo de 16/8 horas a 25/22 °C, respetivamente. O período entre repicagens (subcultivo) foi de quatro semanas.

A cada modalidade do ensaio corresponde uma concentração do regulador de crescimento, isto é, para *L. stoechas subsp. luisieri*, controlo e 0,2 mg l⁻¹ de BAP, para *L.*

pedunculata, controlo e 0,5 mg l⁻¹ de m-Topolin e para *T. mastichina*, 0,1 mg l⁻¹ de BAP e as concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 mg l⁻¹ de Zip. Distribuiu-se 50 mL de meio por frasco. Em cada frasco foram colocados 7 explantes com 35 explantes por modalidade. Os parâmetros avaliados na fase de multiplicação foram o número de rebentos (Nreb), o comprimento do maior rebento (CMreb) apresentado em cm, a taxa de multiplicação (TM) e o número de raízes (Nraiz). A taxa de multiplicação corresponde ao número de explantes secundários gerados a partir de um único explante. Apesar do objetivo da multiplicação não ser induzir a rizogénese, em alguns casos, observou-se a formação de raízes, pelo que este parâmetro foi considerado para avaliação. Para se proceder à análise dos resultados calcularam-se a média e o desvio padrão dos parâmetros avaliados, utilizando uma Folha de Cálculo do Microsoft Excel.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Micropropagação: estabelecimento

Após ter-se efetuado o estabelecimento dos explantes das 3 espécies em estudo – *L. stoechas* subsp. *luisieri*, *L. pedunculata* (Figura 4) e *T. mastichina* fez-se a contagem de explantes viáveis e inviáveis, e de contaminações (fungos ou bactérias). Os resultados obtidos estão representados na Figura 5.



Figura 4- Estabelecimento de *L. pedunculata*.

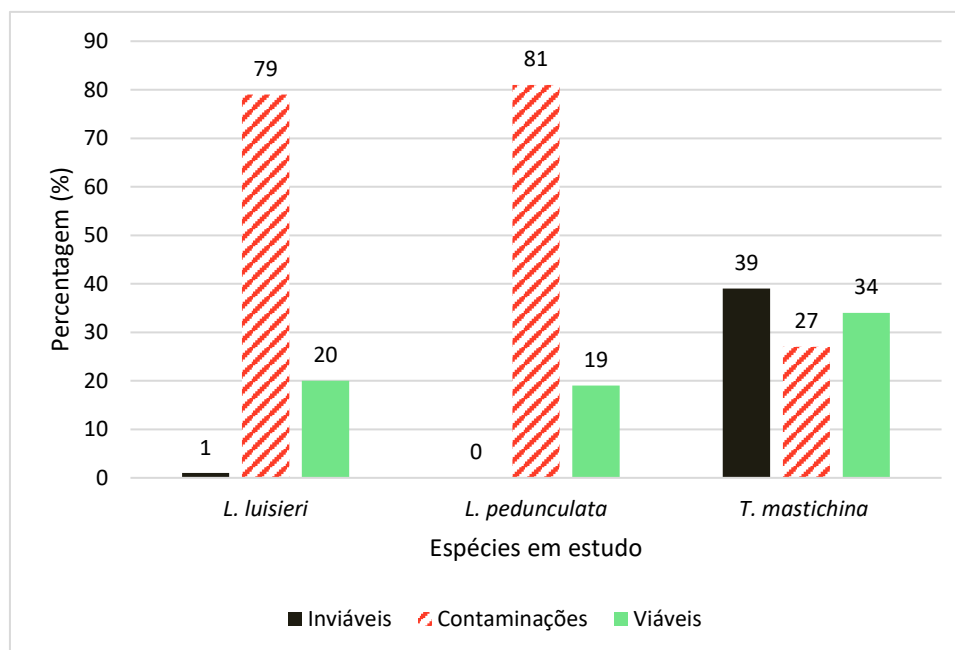


Figura 5- Percentagem de explantes viáveis, inviáveis e contaminações para as espécies em estudo.

Inicialmente foram inoculados cerca de 80 explantes (140 para *L. pedunculata*) de cada espécie. Ao longo das primeiras 4 semanas de estabelecimento *in vitro*, teve-se particular atenção aos explantes contaminados e oxidados. Assim, as percentagens de contaminações foram registadas, tendo-se obtido os seguintes valores 79% (*L. stoechas* subsp. *luisieri*), 81% (*L. pedunculata*) e 27% (*T. mastichina*).

A fase de estabelecimento é necessária para o sucesso das culturas *in vitro*. Para que ocorra sucesso nas outras fases da micropropagação é preciso que o material seja completamente desprovido de organismos patogénicos. A contaminação é um problema que tem prejudicado a condução de vários ensaios *in vitro*. Principalmente pela contaminação bacteriana e fúngica. As contaminações por bactérias acontecem, geralmente, devido a contaminação endógena dos explantes enquanto que a contaminação por fungos ocorre em virtude da deficiente manipulação das culturas e à presença de esporos no ambiente onde as repicagens são realizadas (Neves, 2020).

Verificou-se que a metodologia utilizada para a desinfeção dos explantes não foi a mais eficiente para o estabelecimento. Observou-se que o estabelecimento de *T. mastichina* teve os melhores resultados, apenas 27% de contaminações, apesar do elevado número de mortes (39%) em relação às restantes espécies. Além disso, tal como se pode observar na Figura 6, b) em comparação com a Figura 6, a) os explantes após 1 mês em cultura *in vitro* desenvolveram-se mais. Este protocolo distingue-se do das *Lavandula* sp. pela utilização do agente desinfetante, o hipoclorito de sódio na proporção de 3:1 (v/v). Em contrapartida, com o estabelecimento da *L. stoechas* subsp. *luisieri* e a *L. pedunculata* observou-se que a percentagem de contaminações foi a mais elevada, igual ou superior a 79%. Possivelmente, a etapa final do protocolo com a imersão dos explantes no ácido ascórbico durante 5 min, após a desinfeção, pode ter sido um veículo de contaminação aquando da realização da filtração com filtros hepa

(0,2 μm NYLON), quer por saturação do filtro ou pela contaminação cruzada dentro da câmara de fluxo laminar.

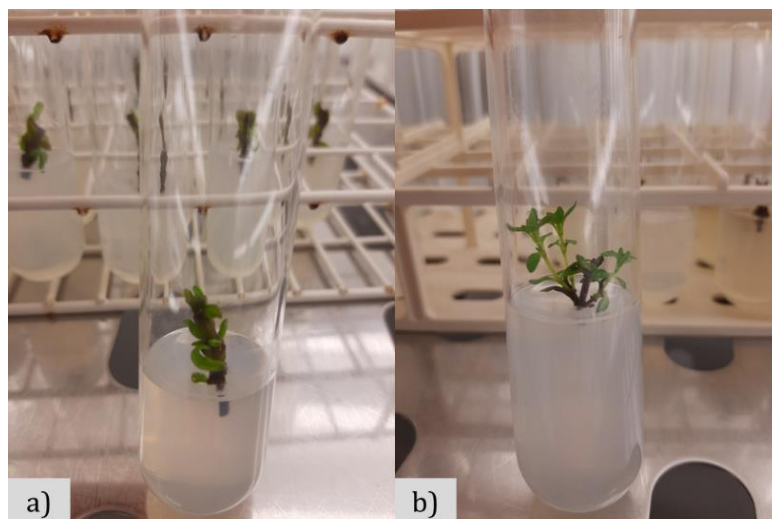


Figura 6- Resposta dos explantes após 1 mês em cultura *in vitro*: a) *L. stoechas* subsp. *luisieri* e b) *T. mastichina*.

Para ensaios futuros, propõe-se a impermeabilização da zona de corte com parafina, com o objetivo de reduzir a entrada dos agentes desinfetantes e testar diferentes combinações de concentração de desinfetante e tempo de desinfecção.

Verificou-se o aparecimento de oxidação (escurecimento no meio de cultura) em alguns explantes. Esta barreira foi facilmente ultrapassada através da troca de meio. Segundo Neves (2020) a oxidação fenólica é altamente dependente da espécie e do genótipo.

Verificou-se também que as plantas-mãe da *L. stoechas* subsp. *luisieri* e da *L. pedunculata*, à data do estabelecimento, estavam a iniciar a floração e possuíam afídeos (Figura 7). A floração pode ter condicionado o estabelecimento, já que os insetos podem ser vetores de doenças e vírus (contaminações endógenas) e podem causar o enfraquecimento da planta (Valério, 2010) potenciando o número de contaminações *in vitro* mesmo após a desinfecção.



Figura 7- Diferentes afídeos encontrados nas *Lavandula* sp..

4.4.2. Micropropagação: multiplicação

Com a finalidade de manter uma cultura stock e evitar colheitas nas populações selvagens foram multiplicadas *in vitro* as espécies em estudo (Figura 8).

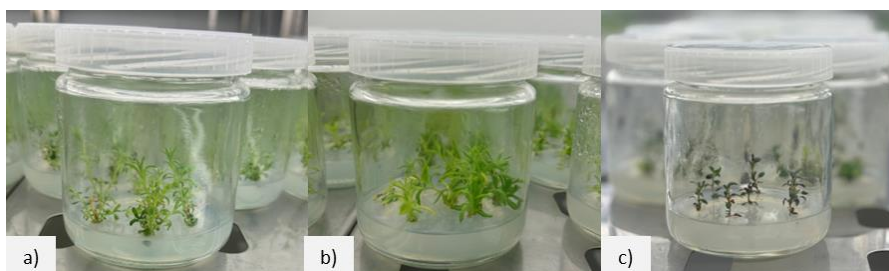


Figura 8- Atuais culturas stock de a) *L. stoechas* subsp. *luisieri*; b) *L. pedunculata* e c) *T. mastichina*.

No que se refere à multiplicação *in vitro* realizaram-se as avaliações com o intuito de testar uma concentração de BAP (0,2 mg l⁻¹) para *L. stoechas* subsp. *luisieri* (Figura 9), uma concentração de m-Topolin (0,5 mg l⁻¹) para *L. pedunculata* (Figura 10) e diferentes concentrações de citocininas para o *T. mastichina* (Figura 11). Para todas as espécies, avaliaram-se o número de rebentos (Nreb), o comprimento do maior rebento (CMreb em cm), a taxa de multiplicação (TM) e o número de raízes (Nraiz). Os resultados foram obtidos através da média de cada parâmetro ± o desvio padrão.

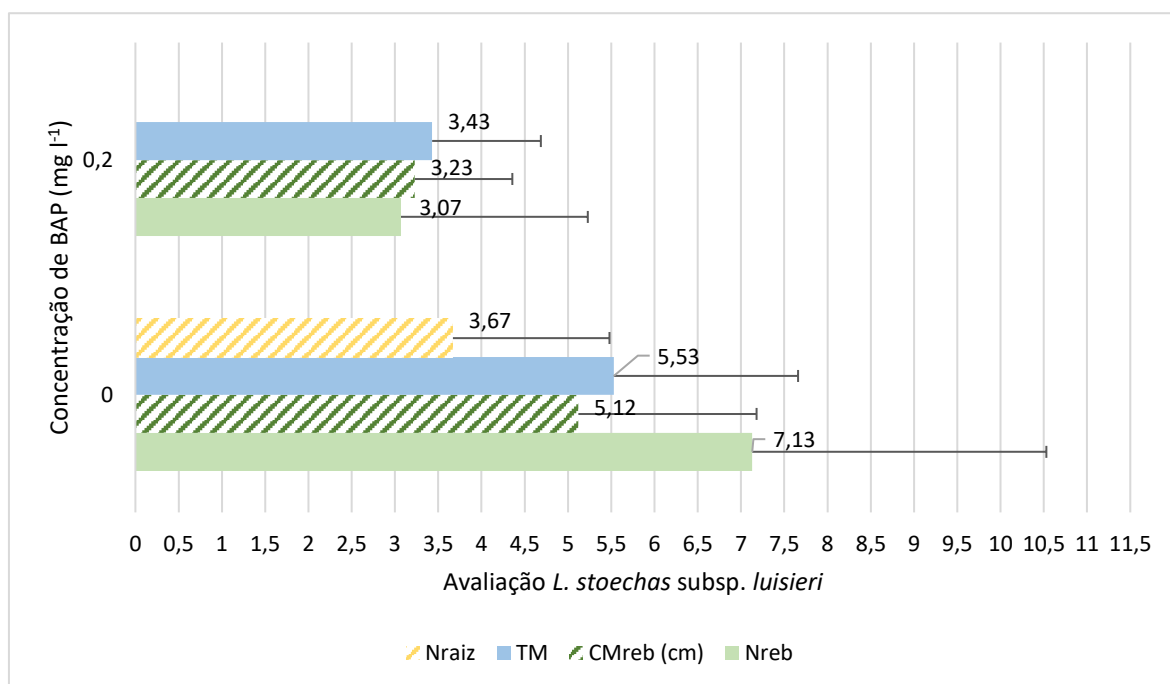


Figura 9- Influência de BAP na multiplicação *in vitro* de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

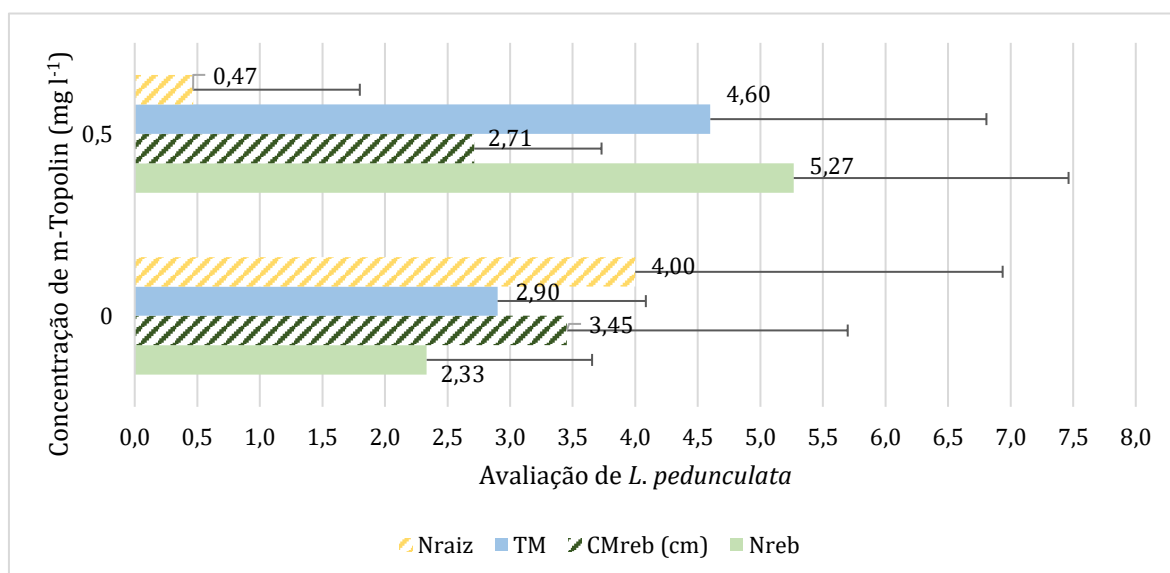


Figura 10- Influência de m-Topolin na multiplicação *in vitro* de *L. pedunculata*.

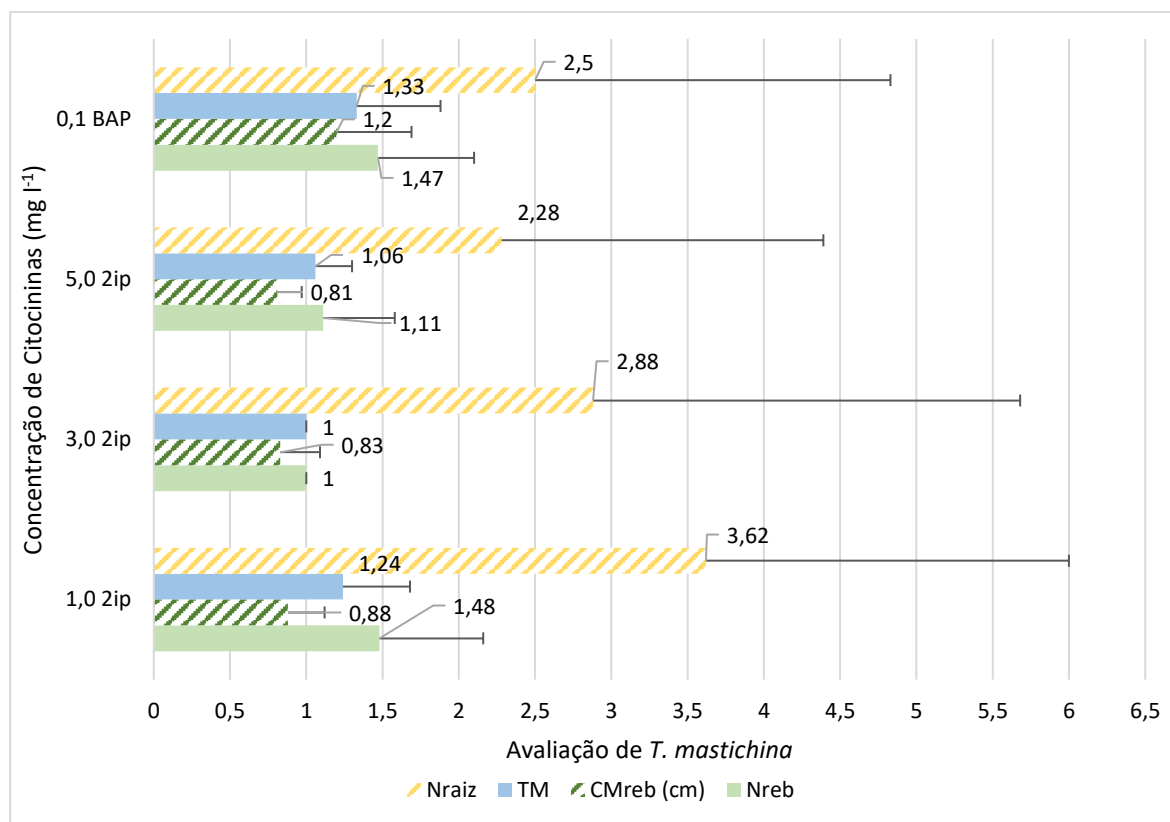


Figura 11- Influência de diferentes citocininas na multiplicação *in vitro* de *T. mastichina*.

À medida que a concentração aumenta o número de raízes diminui (esta evidência é mais clara no *T. mastichina* por se ter usado diferentes concentrações de 2ip). De acordo com Rokosa & Kulpa, (2020) a inibição da formação de um sistema radicular é um efeito típico da ação das citocininas.

Em relação à *L. stoechas* subsp. *luisieri* o controlo [sem RC] apresenta melhores resultados tanto para o número de rebentos ($7,13 \pm 3,40$) como para a taxa de multiplicação ($5,53 \pm 2,13$). Verificou-se um alongamento dos rebentos na permanência em meio MS sem RC (o mesmo se verificou com o ensaio de *L. pedunculata*). Isto é semelhante ao que foi reportado por Zuzarte et al. (2021) em *L. pedunculata*.

Pode-se referir que para *L. pedunculata*, na ausência de RC houve formação de raízes e um alongamento dos rebentos (Figura 12) (isto é, um aumento do CMreb) já referenciado anteriormente. Com a adição de $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de m-Topolin o número de rebentos e a taxa de multiplicação, aumentou consideravelmente (Figura 13) para cerca de $5,27 \pm 2,20$ e $4,60 \pm 2,21$, respetivamente. Porém, surgiu a presença de explantes parcialmente vitrificados (Figura 14).



Figura 12- Multiplicação de *L. pedunculata* sem Regulator de Crescimento.

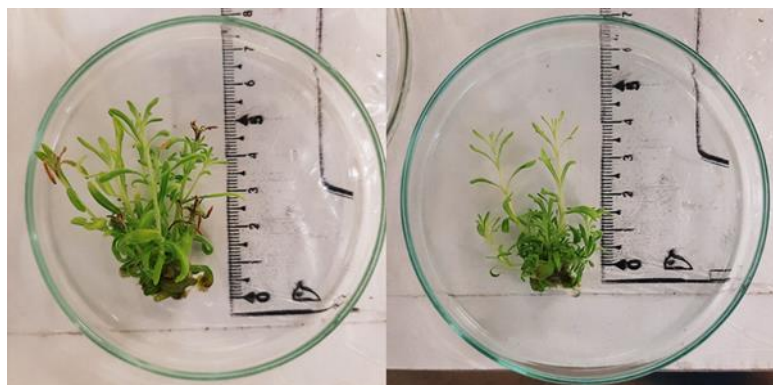


Figura 13- Multiplicação de *L. pedunculata* com 0,5 mg l⁻¹ de m-Topolin.

A vitrificação ou hiperhidricidade é um fenómeno que apresenta sérios problemas na formação de rebentos, aumentando a fragilidade do material em causa. Os sintomas de vitrificação são provocados por desordens fisiológicas, que ocorrem, frequentemente nas culturas *in vitro* de muitas espécies e são atribuídas, principalmente, à idade do material utilizado como explante (Gonçalves et al., 2009), o que, no caso, não se aplica, pois trata-se de material jovem. Contudo a vitrificação pode ser originada por outros motivos, a baixa concentração de agar no meio de cultura, o tipo de agar ou a concentração de sacarose no meio é baixa (Gonçalves et al., 2009). Estes autores reportam também hiperhidricidade na espécie *L. stoechas* subsp. *luisieri* sob altas concentrações de BAP (Gonçalves et al., 2009).



Figura 14- Explante de *L. pedunculata* parcialmente vitrificado.

No caso do *T. mastichina* foram testadas diferentes concentrações de 2ip (1, 3 e 5 mg l⁻¹) e ainda 0,2 mg l⁻¹ de BAP. Entre as concentrações de 2ip não se verificaram grandes diferenças no que diz respeito ao Nreb, CMreb e TM. A concentração de 0,2 mg l⁻¹ de BAP destaca-se como sendo a melhor por potenciar bons resultados para os mesmos parâmetros. Com base na literatura existem vários artigos publicados que apontam a concentração de 0,1 mg l⁻¹ de BAP como o melhor RC para a multiplicação

desta espécie em estudo (Fraternale, 2003; Leal et al., 2017). O mesmo foi possível comprovar com o ensaio.

5. Propagação vegetativa - estacaria

5.1 Estado da arte

As plantas podem ser propagadas sexualmente ou assexuadamente. A reprodução por meio de sementes costuma ser lenta e as plantas apresentam grande variação em diversas características, como taxa de crescimento e composição do óleo essencial. Portanto, técnicas de propagação vegetativa são as mais eficazes para produzir um grande número de indivíduos apresentando um genótipo de interesse. Quando plantas propagadas são utilizadas para extração de metabolitos, como óleos essenciais, outros fatores podem interferir e limitar o rendimento das plantas. Entre esses fatores estão as condições climáticas, a disponibilidade de água e a suscetibilidade a doenças. A propagação através de sementes não garante a uniformidade genética da descendência e a propagação por estacas é difícil para algumas espécies (Zuzarte et al., 2010).

A propagação vegetativa caracteriza-se por ser um processo mediante o qual certos órgãos vegetativos ou parte de um órgão vegetativo (caule, gomo, folha ou raiz) se separam do indivíduo ou que sobrevivem à própria planta (tubérculos, bolbos, rizomas e estolhos), e quando colocados em condições favoráveis, dão lugar a novos indivíduos. A nova planta obtida, clone, é geneticamente igual à planta que lhe deu origem (Póvoa & Delgado, 2014).

Existem diferentes métodos de propagação vegetativa, sendo focado neste trabalho apenas a estacaria. A estacaria descreve-se através da indução da formação de raízes (rizogénese) e rebentos a partir de uma porção do caule de forma a obter uma nova planta (Póvoa & Delgado, 2014). Embora a utilização de estacas seja um dos métodos de propagação mais fáceis e mais bem-sucedidos, uma baixa capacidade de enraizamento adventício pode resultar em perdas económicas significativas. O desenvolvimento de raízes adventícias é uma fase crítica da propagação vegetativa, uma vez que estas raízes desempenham funções cruciais, incluindo a aquisição de água e nutrientes, a fixação a um substrato e o armazenamento de reservas alimentares. Estas funções facilitam a adaptação das plantas ao ambiente e permitem um maior desenvolvimento. Apesar dos progressos recentes nas técnicas de propagação vegetativa, não existe um método universal para todas as espécies que possa produzir uma capacidade de enraizamento ótima. Assim, é importante desenvolver métodos adequados para propagar com êxito diferentes espécies a partir de estacas de caule (Inoue et al., 2023).

A formação de raízes adventícias a partir das estacas é complexa e o sucesso depende de múltiplos fatores. Um dos fatores mais importantes que influenciam a capacidade de enraizamento é a fase de crescimento das estacas. A posição (apical, intermédia e/ou basal) a partir da qual as estacas são retiradas influencia a capacidade de enraizamento e o subsequente crescimento e sobrevivência dos rebentos (Inoue et al., 2023).

As auxinas promovem o desenvolvimento de raízes adventícias em estacas de caule, promovendo a formação de primórdios radiculares, o que é reforçado sob uma maior disponibilidade de auxinas. O ácido indole-3-butírico (IBA) é uma importante auxina que promove o enraizamento, a qualidade e o vigor, pelo que é amplamente utilizado na propagação vegetativa. O tempo médio de enraizamento e a percentagem de raízes estão intimamente relacionados com a disponibilidade de auxinas na base da estaca e com o genótipo. No entanto, a concentração ótima de IBA para promover o desenvolvimento de raízes adventícias pode variar consoante a espécie, o tipo de estaca e/ou a idade da planta dadora. O efeito da concentração de IBA na percentagem de enraizamento varia também com a fase de crescimento das estacas (Inoue et al., 2023).

Embora alguns estudos tenham determinado a melhor concentração de IBA na propagação vegetativa, existe pouca informação disponível para as espécies em estudo. Deste modo, a pesquisa bibliográfica foi focada para os géneros *Lavandula* e *Thymus* (Tabela 3).

Tabela 3- Concentrações de IBA na indução da rizogénese para os géneros *Lavandula* e *Thymus*.

Espécies	Concentração IBA (ppm)	Tempo (seg.)	Estacas	Citação
<i>L. dentata</i>	2000	30		Bona et al. (2010)
<i>L. stoechas</i>	2000			Lopes et al.(2005)
<i>L. pedunculata</i>	1000		Herbácea	Costa et al. (2000)
<i>T. capitatus</i> ; <i>T. serpyllum</i> ; <i>T. vulgaris</i>	500	30		lapichino et al. (2006)
<i>T. camphoratus</i>	2000		Lenhosas	Lopes et al. (2005)
<i>T. capitatus</i>	1000		Herbácea	Costa et al. (2000)
<i>T. camphoratus</i>	4000		Lenhosa	Costa et al. (2000)

5.2 Material e métodos

Com o intuito de averiguar a capacidade de enraizamento, para a conservação *ex situ* das plantas aromáticas e medicinais foram propagadas estacas de *L. stoechas* subsp. *luisieri*, *L. pedunculata* e *T. mastichina*. Para tal, foram selecionadas as plantas com as melhores características morfológicas e sanitárias. As estacas foram recolhidas no Jardim do CBPBI, retiradas das partes terminais dos ramos (partes jovens), com comprimento superior a 5 cm e sendo-lhes removido as folhas da parte inferior.

Recolheram-se cerca de 160 estacas para cada espécie tendo sido utilizado o ácido indole-3-butírico (IBA) como regulador de crescimento, numa concentração de 2000 ppm em 120 estacas, servindo as restantes de controlo. Testou-se também o CLONEX®, gel de enraizamento (com 3 g l⁻¹ IBA), num número reduzido de estacas para *T. mastichina*. Efetuou-se a propagação vegetativa ao longo do mês de março, em tabuleiros com 40 alvéolos, os quais foram colocados num túnel, com controlo de

humidade por nebulização. O substrato utilizado consistiu numa mistura de substrato universal para enraizamento (ECO Grow) com perlite (KNAUF) numa proporção de 2:1.

Analisaram-se após o 1º e 2º mês, 10 estacas de cada tabuleiro, avaliando-se a presença ou ausência de sistema radicular. Por fim, para se proceder à análise dos resultados foi calculada a percentagem de enraizamento, utilizando uma Folha de Cálculo do Microsoft Excel.

5.3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos para as diferentes espécies são apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4- Percentagem de enraizamento de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

	1º Mês	
	Número de Estacas	Enraizamento (%)
Controlo	40	2,5
IBA 1 Rep	40	2,5
IBA 2 Rep	40	0
IBA 3 Rep	40	2,5

Tabela 5- Percentagem de enraizamento de *L. pedunculata*.

	1º Mês		2º Mês	
	Número de Estacas	Enraizamento (%)	Número de Estacas	Enraizamento (%)
Controlo	10	0	30	10
IBA 1 Rep	10	0	30	3
IBA 2 Rep	10	10	30	7
IBA 3 Rep	10	0	30	13

Tabela 6- Percentagem de enraizamento de *T. mastichina*.

	1º Mês	
	Número de Estacas	Enraizamento (%)
Controlo	40	0
IBA 1 Rep	40	2,5
IBA 2 Rep	40	2,5
IBA 3 Rep	40	2,5
Clonex	39	10

As percentagens de estacas enraizadas foram muito baixas para as espécies em estudo, não se verificando diferenças entre o controlo e a concentração de IBA

utilizada. A Figura 15 retrata os sistemas radiculares das diferentes espécies e nalguns casos submetidos a diferentes condições.



Figura 15 - Sistema radicular das espécies em estudo: a) *L. stoechas* subsp. *luisieri*; b) *L. pedunculata* ao 1º mês; c) *L. pedunculata* ao 2º mês; d) *T. mastichina* induzido com IBA; e) *T. mastichina* induzido com CLONEX.

Com o enraizamento da *L. stoechas* subsp. *luisieri* verificou-se um sistema radicular mais reduzido em comparação com as restantes espécies. Ao 2º mês, para *L. pedunculata*, a percentagem de enraizamento é ligeiramente maior juntamente com o número de raízes. Para o *T. mastichina* verificou-se que o CLONEX obteve melhores resultados de rizogénese. Comparando os dois sistemas radiculares observou-se que a utilização de CLONEX apresentou resultados mais promissores no número e comprimento maior das raízes.

Alguns autores reportam a utilização de diferentes concentrações de IBA para os géneros *Lavandula* e *Thymus* (Tabela 3) (Bona et al., 2010; Costa et al., 2000; Iapichino et al., 2006; Lopes et al., 2005). De acordo com a bibliografia consultada, a concentração de 2000 ppm foi referenciada mais vezes e por isso a selecionada neste estudo. Para as espécies selecionadas os resultados não foram os esperados. Paralelamente a estes ensaios, foi testada a mesma concentração de IBA para a *Lavandula angustifolia* (alfazema), onde se obtiveram resultados mais promissores. Verificaram-se diferenças entre a ausência e a presença do RC. Na ausência de RC, observaram-se percentagens de enraizamento mais baixas e presença de *callus* elevada. Na presença de RC, as percentagens de enraizamento chegaram a atingir os 71%. Desta forma, a adição do RC potenciou o enraizamento de *L. angustifolia* validando o método utilizado para esta espécie.

Um dos fatores que poderá ter condicionado os resultados dos ensaios, foi o estado fenológico das plantas, encontravam-se na fase de pré-floração (*Lavandula* sp.) embora as inflorescências formadas tivessem sido cortadas; a elevada humidade sentida no levantamento dos ensaios ao nível do substrato, potenciando a necrose celular e a presença de larvas nas raízes (Figura 16) foram outros fatores presenciados durante o ensaio.

De acordo com Silva (2019) a forma larvar da mosca-do-terriço descreve-se através de um corpo cilindro, delgado, translucido, permitindo a observação do tubo digestivo e com a cabeça preta. Esta descrição assenta perfeitamente nos organismos vivos encontrados nas raízes de *L. pedunculata*.



Figura 16- Larva encontrada no sistema radicular de *L. pedunculata*.

Estas larvas vivem perto da superfície do substrato e alimentam-se de raízes, caules, fungos e matéria orgânica. Ao alimentarem-se das raízes, impedem o seu desenvolvimento, dificultam o enraizamento, causam crescimento atrofiado das plantas afetadas, emurchecimentos e atrasam o desenvolvimento das plantas, pois diminuem a absorção de água e nutrientes e impedem o transporte de seiva no xilema e floema. Em caso de ataques mais severos, podem levar mesmo à morte da planta, o que sucede principalmente em plantas jovens ou que estejam em condições de stress..

6. Óleos essenciais e hidrolatos

6.1 Estado da arte

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de compostos voláteis onde predominam terpenos. São insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos apolares e gorduras, apresentando-se normalmente incolores ou amarelados. Nas plantas labiadas os OE acumulam-se em estruturas epidérmicas secretoras especializadas, tricomas secretores ou glandulares de vários tipos, inseridos nos diferentes órgãos aéreos da planta (Jorge, 2014).

Os OE são sintetizados por estas plantas como metabolitos secundários (Jorge, 2014). A planta produz estes compostos para: agir no seu próprio processo de crescimento e reprodução, atraindo os insetos polinizadores, repelindo predadores e para se defender de doenças e pragas (Delgado, 2010).

Geralmente, as condições do solo, o clima, a altitude, a época de colheita e o estado fenológico da planta são também fatores que condicionam a quantidade, qualidade e composição química dos OE (Delgado, 2010).

Existem vários métodos de extração de OE, sendo a hidrodestilação o mais comum. Neste método, a extração dos compostos voláteis é realizada por arrastamento de vapor de água, seguida de passagem de vapor a líquido através de um condensador. Por fim, a ação da gravidade separa a fase aquosa do OE. O destilado obtido é assim constituído por OE e hidrolato (Jorge, 2014).

A investigação científica tem vindo a revelar várias aplicações dos OEs, destacando-se a indústria alimentar como uma das mais relevantes, uma vez que vários óleos essenciais são considerados seguros para uso do consumidor e têm um estatuto de segurança geralmente reconhecido (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) (Zuzarte et al., 2023).

Para além das propriedades de fragrância e aromatização, os óleos essenciais são bastante relevantes para a segurança alimentar. De facto, as suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, permitem a sua utilização, por exemplo, em embalagens de alimentos para controlar os agentes de deterioração, aumentando assim o prazo de validade dos alimentos (Peralta-Ruiz et al., 2020; Perdonés et al., 2012). *L. stoechas* subsp. *luisieri* merece particular interesse devido à composição do seu OE que contém compostos únicos: os derivados de necrodano, como *trans*- α -necrodol e o acetato *trans*- α -necrodilo. Também são encontrados teores significativos de linalol, fenchona e 1,8-cineol (Delgado, 2010; Domingues et al., 2021; Domingues, et al., 2023b; Feijão, 2011; Zuzarte et al., 2022). Os principais compostos identificados em *L. pedunculata* são a fenchona, cânfora e 1,8-cineol (Costa et al., 2013; Domingues, et al., 2023b; Feijão, 2011; Zuzarte et al., 2009, 2022). Os principais compostos voláteis presentes no OE de *T. mastichina* são o 1,8-cineol e o linalol (Aazza et al., 2016; Delgado et al., 2014; Fraternali, 2003; Kessler et al., 2022; Leal et al., 2017; Rodrigues et al., 2020).

6.2 Material e métodos

6.2.1 Material vegetal

A recolha do material vegetal de *L. stoechas* subsp. *luisieri*, *L. pedunculata* e *T. mastichina* foi realizada na Reserva Natural da Serra da Malcata no início de maio, em plena floração e envolveu apenas a parte aérea das plantas, caules, folhas e flores. As plantas foram dispostas em tabuleiros de madeira perfurados para facilitar a entrada de ar e forrados com papel de jornal para absorver a humidade (Figura 17).



Figura 17 - Processo de secagem natural das espécies *L. pedunculata*, *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *T. mastichina* recolhidas na Reserva Natural da Serra da Malcata.

6.2.2 Obtenção de extratos vegetais

O material vegetal já seco (100 g, no caso particular dos rosmaninhos 50 g de folhas + 50 g de inflorescências) foi destilado pelo método da hidrodestilação, durante 2 horas, num aparelho do tipo Clevenger (Figura 18). Foram realizadas 2 repetições para cada espécie. As amostras de OE obtidas foram armazenadas em frascos de vidro âmbar à temperatura de refrigeração, até posterior utilização. Posto isto, recolheu-se também o hidrolato (HD). Para o cálculo do rendimento do OE obtido, usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento do óleo essencial (\%)} = \frac{\text{Volume de OE (ml)}}{\text{Massa da amostra (g)}} \times 100$$

Para posterior identificação dos compostos voláteis do hidrolato, este teve de ser sujeito a uma extração líquido-líquido com *n*-hexano (*n*-hex), com o intuito de eliminar a fase aquosa. Dada a diferença de polaridades, a fase orgânica separou-se da fase aquosa por decantação. Após recuperação de toda a fase orgânica, seguiu-se a evaporação do *n*-hex num evaporador rotativo (VWR), sob pressão reduzida, a 100 rpm num banho-maria de 50 °C. Os compostos voláteis do hidrolato foram diluídos em pentano numa concentração determinada para cada espécie, normalmente 20 mg ml⁻¹. Comparativamente aos OEs, os HDs foram armazenados no frio até posterior utilização.



Figura 18- Hidrodestilação de *T. mastichina*.

6.2.3 Caracterização dos compostos voláteis

Os perfis voláteis dos OEs e dos HDs foram obtidos em duplicado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS SCION-SQ 456 GC, Bruker). A separação foi obtida em uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m comprimento × 0,25 mm diâmetro × 0,25 µm de espessura de filme, Agilent J&W GC Columns). O gás de arraste utilizado foi o hélio com um fluxo de 1 ml min⁻¹. As amostras de OE foram injetadas com um volume de 1 µl, com um *split* de 1:100. A temperatura inicial do forno foi programada para 45 °C, aumentando gradualmente 3 °C/min até 175 °C e 300 °C com taxa de aquecimento de 15 °C min⁻¹, e mantendo esta temperatura por 10 min. O injetor e o detetor foram mantidos a 220 °C e 250 °C, respetivamente. A identificação dos compostos voláteis presentes nas amostras foi baseada no índice de retenção (IR) comparado com o IR fornecido pela biblioteca MS (NIST 17) e com o IR calculado a partir dos padrões da série *n*-alcano que foram injetados sob a mesma coluna e condições cromatográficas. A quantidade relativa de cada composto foi

expressa como uma percentagem da área relativa do pico do composto, em relação à área total dos picos identificados nas amostras. Foram realizados duplicados de injeções para a mesma amostra.

6.2 Resultados e discussão

A Tabela 7 apresenta o volume do HD e o rendimento de OE obtido por hidrodestilação (Figura 18) das espécies analisadas.

Tabela 7- Volume do HD e rendimento de OE obtidos para as espécies analisadas.

Espécie	Massa (g)	Volume HD (mL)	Rendimento OE (V/m; %)
<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> (folhas + inflorescências)	100	21,5	0,9
<i>L. pedunculata</i> (folhas + inflorescências)	100	24	1,8
<i>T. mastichina</i>	100	20,05	5,7

Os resultados da hidrodestilação demonstraram que o *T. mastichina* foi a espécie que apresentou melhores resultados em termos de rendimento de OE com 5,7%, seguido da *L. pedunculata* com 1,8%, e, por último, *L. stoechas* subsp. *luisieri* com um rendimento de 0,9%.

Os rendimentos obtidos estão de acordo com os rendimentos publicados em outros estudos. Para a *L. stoechas* subsp. *luisieri* são referenciados rendimentos de 0,1 – 1,0%, para a *L. pedunculata* 1,5% (Feijão, 2011) e para o *T. mastichina* rendimentos que podem variar entre 0,1 e 6,7% (Rodrigues et al., 2020).

Os constituintes dos OE e HD das espécies estão listados nas Tabelas 8, 9 e 10, de acordo com a sua ordem de eluição numa coluna HP-5MS. Para os OE apresenta-se o perfil volátil em plantas recolhidas em dois anos consecutivos.

Tabela 8- Identificação e quantificação relativa de compostos dos OEs e HD de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

Tr médio	Nome do composto	Fórmula Química	Concentração (%)		
			2023 OE	2024 OE	2024 HD
7,80	<i>a</i> -Pineno	C ₁₀ H ₁₆	1,9	2,9	
7,90	<i>o</i> -cymeno	C ₁₀ H ₁₄	2,2	2,7	
8,34	Canfeno	C ₁₀ H ₁₆	0,6	1,2	
8,57	2,4(10)-Thujadieno	C ₁₀ H ₁₄	0,1	0,1	
11,17	1,2,3,3-Tetrametilciclopenten-4-ona	C ₉ H ₁₄ O	0,4	0,4	
11,49	<i>p</i> -Cimeno	C ₁₀ H ₁₄		0,2	
11,66	<i>D</i> -Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	0,3	1,0	
11,75	1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	3,9	2,7	2,2
13,66	Óxido de <i>cis</i> -Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1	1,1	15,7
13,98	3,4,4-trimetil-2-ciclohexen-1-one	C ₉ H ₁₄ O	1,2	0,7	1,1
14,35	Fenchona	C ₁₀ H ₁₆ O	32,5	35,2	14,5
14,41	Óxido de <i>trans</i> -Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂			4,7
14,94	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	1,4	2,3	1,6
15,15	Hotrienol	C ₁₀ H ₁₆ O		0,3	1,2
15,47	Fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O		0,6	
16,07	α -Canfolenal	C ₁₀ H ₁₆ O	0,3	0,3	
16,86	Cânfora	C ₁₀ H ₁₆ O	11,8	7,5	10,3
17,05	<i>trans</i> - α -Necrodol		0,5	1,9	1,2
17,87	endo-Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O		0,4	0,2
18,33	<i>cis</i> - α -Necrodol		0,8	0,9	1,5
18,83	<i>p</i> -Cimeno-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O		0,3	1,7
18,96	5-metilene-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona		7	3,8	16,3
19,87	Verbenona	C ₁₀ H ₁₄ O	0,5	0,7	5,8
20,40	Acetato de fenchilo	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0,4	0,7	
21,46	Carvol	C ₁₀ H ₁₄ O	0,8	0,2	0,3
23,38	Acetato <i>trans</i>-α-necrodilo	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	12,3	10,5	1,1
23,69	Acetato lavandulilo	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	7,1	5,7	1,0
24,16	Acetato <i>cis</i> - α -necrodilo		1,2	0,7	
24,69	6,8-Nonadien-2-ona, 6-metil-5-(1-metiletilideno)	C ₁₃ H ₂₀ O		0,3	
33,28	δ -Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	0,5	0,3	
35,54	Óxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O		0,3	
35,88	Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	1,9	2,1	
31,34	Copabomeol	C ₁₅ H ₂₆ O		1,4	
38,24	α -Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O		0,8	
44,56	NI <i>L. luisieri</i> E		0,5	1,0	
44,70	NI <i>L. luisieri</i> F		0,4	0,7	
Total de Compostos Identificados (%)			95,5	91,9	81,9

Para a *L. stoechas* subsp. *luisieri* foram identificados os compostos tanto no OE como no HD. Os OEs de ambos os anos foram caracterizados por elevadas percentagens relativas de fenchona. Como principais constituintes, também se destacam, o acetato de *trans*- α -necrodilo, a cânfora e o acetato de lavandilo. Verificou-se que os compostos do necrodano embora numa percentagem menor também surgem de igual forma no HD, permitindo a valorização de um subproduto da hidrodestilação.

Com base na literatura, existem vários artigos publicados sobre a caracterização química dos OE de *L. stoechas* subsp. *luisieri*. Esta espécie merece particular destaque

devido aos compostos únicos derivados de necrodano, como o acetato de trans- α -necrodilo (Delgado, 2010; Domingues et al., 2021; Domingues, Goulão, et al., 2023; Feijão, 2011; Zuzarte et al., 2022).

A presença de fenchona como composto maioritário poder-se-á dever ao facto de na natureza ocorrerem fenómenos de hibridação entre os dois rosmaninhos ou aquando da recolha do material vegetal ambas as plantas possam não ter sido distinguidas corretamente. Numa primeira floração de *L. pedunculata* o pedúnculo pode ser confundido com o pedúnculo da *L. stoechas* subsp. *luisieri*. Ressaltar assim, a importância do conhecimento na identificação das espécies no campo. Também as condições edafo-climáticas têm um papel determinante para a produção e composição dos metabolitos secundários.

Tabela 9- Identificação e quantificação relativa de compostos dos OEs e HD de *L. pedunculata*.

Tr médio	Nome do composto	Fórmula Química	Concentração (%)		
			2023 OE	2024 OE	2024 HD
7,82	α-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	4,8	6,9	
8,36	Canfeno	C ₁₀ H ₁₆	1,9	2,3	
9,46	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆		0,7	
11,51	<i>p</i> -Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	0,3	0,4	
11,67	<i>D</i> -Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	1,8	2,2	
11,78	1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	1,9	3,2	2,7
13,70	Óxido de <i>cis</i> -Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂			5,2
14,33	Fenchona	C ₁₀ H ₁₆ O	63,8	59,5	50,1
14,96	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,5	1,1	1,2
15,48	Fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,8	1,3	1,2
16,86	Cânfora	C ₁₀ H ₁₆ O	20	15,3	18,7
17,88	endo-Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,3	0,5	0,8
18,85	<i>p</i> -Cimen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	0,2	0,3	4,3
19,07	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,2	0,3	0,8
19,90	Verbenona	C ₁₀ H ₁₄ O	0,3	0,5	7,5
20,41	Acetato de fenchilo	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0,4	0,5	
23,38	Acetato de bornilo	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1,9	1,9	0,3
23,70	Acetato de lavandulilo	C ₁₂ H ₂₀ O ₂		0,3	
31,84	Eremofileno	C ₁₅ H ₂₄		0,3	
33,29	β -Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	0,2	0,3	
38,25	α -Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,3	0,8	0,2
Total de Compostos Identificados (%)			99,6	98,6	94,3

Foram identificados no OE e HD de *L. pedunculata* cerca de 98,6% (no ano mais recente) e 94,3% compostos, respetivamente. O composto maioritário presente no OE foi a fenchona, seguido pela cânfora, α -pineno e 1,8-cineol. Estes resultados estão de acordo com a literatura (Costa et al., 2013; Domingues, et al., 2023b; Feijão, 2011; Zuzarte et al., 2009, 2022). No HD embora com um menor número de compostos verificou-se que a fenchona e a cânfora continuam como maioritários.

Tabela 10- Identificação e quantificação relativa de compostos dos OEs e HD de *T. mastichina*.

Tr médio	Nome do composto	Fórmula Química	Concentração (%)		
			2023 OE	2024 OE	2024 HD
7,81	<i>α</i> -Pineno	C ₁₀ H ₁₆	4,1	2,8	
8,35	Canfeno	C ₁₀ H ₁₆	0,9	0,7	
9,35	Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	0,2	1,9	
9,45	<i>β</i> -Pineno	C ₁₀ H ₁₆	0,6	3,1	
10,12	<i>β</i> -Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	3,1	1,0	
11,15	<i>α</i> -Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	2,2	0,3	
11,50	<i>p</i> -Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	6,3	0,3	
11,68	<i>D</i> -Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	3,3	2,1	
11,78	1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	3,7	64,9	55,9
12,61	<i>β-cis</i> -Ocimeno	C ₁₀ H ₁₆		1,6	
13,03	<i>γ</i> -Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	5,7	0,5	
13,40	Hidrato de <i>trans</i> -Sabineno	C ₁₀ H ₁₈ O		0,5	0,4
13,67	Óxido de <i>cis</i> -Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂		0,2	4,7
14,38	Óxido de <i>trans</i> -Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂			6,0
14,95	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	53,1	11,3	13,2
15,15	Hotrienol	C ₁₀ H ₁₆ O			0,7
16,80	Cânfora	C ₁₀ H ₁₆ O	1,7		0,4
17,87	endo-Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	2	1,1	1,8
17,96	<i>δ</i> -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O		0,7	2,3
18,08	3,7-Óxido de <i>trans</i> -linalol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂			0,7
18,43	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	10,2	1,0	2,3
19,05	<i>α</i> -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	1	3,3	8,6
24,76	Terpineol, <i>δ</i> -acetato	C ₁₂ H ₂₀ O ₂		0,3	0,2
26,16	Acetato <i>α</i> -Terpineol	C ₁₂ H ₂₀ O ₂		1,2	
29,05	Cariafileno	C ₁₅ H ₂₄	0,4		
34,30	Hediculariol	C ₁₅ H ₂₆ O		0,5	
35,88	Epiglobulol	C ₁₅ H ₂₆ O		0,7	
Total de Compostos Identificados (%)			98,4	100	98,1

No OE do *T. mastichina* foram identificados 100% dos compostos no ano de 2024 e por sua vez no HD foram identificados 98,1%. Como composto maioritário destaca-se o 1,8-cineol (64,9%) no ano de 2024 e o linalol (53,1%) no ano 2023. Ambos os compostos são referidos por diferentes autores como compostos maioritários (Aazza et al., 2016; Delgado et al., 2014; Fraternali, 2003; Kessler et al., 2022; Leal et al., 2017; Rodrigues et al., 2020). Estes são os únicos perfis químicos que nos dois anos a percentagem do composto maioritário sofreu alterações, provavelmente devido a fatores edafo-climáticos e/ou devido ao facto de serem recolhidas plantas diferentes, apesar de na mesma zona geográfica. Os compostos surgiram de forma semelhante no HD mas em concentrações mais reduzidas. O caso do *α*-pineno, a título exemplificativo,

é um composto comum a todos os OE retratados neste trabalho, mas não surge em nenhum dos HD. Este facto poderá ser justificado pelas baixas concentrações presentes no HD e, por isso, poderá estar abaixo do limite de deteção do equipamento, não significando a possível ausência do composto.

7. Conclusão

No presente trabalho pretendeu-se estudar a conservação de três espécies da família Lamiaceae endémicas da região da Beira Interior, *L. stoechas* subsp. *luisieri*, *L. pedunculata* e *T. mastichina*, através da micropropagação e propagação vegetativa por estacaria, e a sua valorização através da caracterização do perfil volátil dos extratos.

Em relação aos ensaios realizados na micropropagação, salientam-se os seguintes resultados para o estabelecimento, 20% de taxa de sobrevivência para *L. stoechas* subsp. *luisieri*, 19% para *L. pedunculata* e 34% para o *T. mastichina*; na multiplicação, taxas de $5,53 \pm 2,13$ para a *L. stoechas* subsp. *luisieri*, $4,60 \pm 2,21$ para *L. pedunculata*, e $1,33 \pm 0,55$ no *T. mastichina* com o meio de cultura MS sem RC e suplementado com $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de m-Topolin, $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP, respetivamente.

Os resultados obtidos na propagação vegetativa por estacaria revelaram taxas de enraizamento com o uso de IBA na concentração de 2000 ppm de 2,5% para *L. stoechas* subsp. *luisieri*, 13% para *L. pedunculata* e 2,5 % para *T. mastichina*.

Relativamente ao perfil volátil dos extratos obtidos por hidrodestilação, salientam-se os compostos maioritários fenchona (32,5% em 2023 e 35,2% em 2024] e o acetato de *trans*- α -necrodilo (12,3% em 2023 e 10,5% em 2024] para a *L. stoechas* subsp. *luisieri*; para a *L. pedunculata* fenchona (63,8% em 2023 e 59,5% em 2024] e cânfora (20% em 2023 e 15,3% em 2024] e para o *T. mastichina* destacam-se os compostos 1,8 cineol (64,9% em 2024) e linalol (53,1% em 2023).

Finalmente, tendo em consideração os resultados obtidos, recomenda-se em futuros estudos, no estabelecimento destas espécies a recolha do material vegetal na planta-mãe ser realizada na fase de repouso vegetativo, assim como testar diferentes condições na etapa de desinfeção dos explantes. Na multiplicação, poder-se-iam testar outros reguladores de crescimento e diferentes concentrações, com o objetivo de aumentar a taxa de multiplicação.

8. Referências bibliográficas

Aazza, S., El-Guendouz, S., Miguel, M. G., Antunes, M. D., Faleiro, M. L., Correia, A. I., & Figueiredo, A. C. (2016). Antioxidant, Anti-inflammatory and Anti-hyperglycaemic Activities of Essential Oils from *Thymbra capitata*, *Thymus albicans*, *Thymus caespititius*, *Thymus carnosus*, *Thymus lotocephalus* and *Thymus mastichina* from Portugal. *Natural Product Communications*, 11 (7), 1934578X1601100. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100739>

- Arantes, S. A. M. (2020). *Óleos essenciais de plantas aromáticas do Alentejo: Caracterização química e potencial fitoterapêutico* [Tese de Doutoramento em Bioquímica]. Universidade de Évora.
- Araújo, J. (2012). *Estudo químico da Lavandula luisieri* [Dissertação de Mestrado em Bioquímica]. Universidade da Beira Interior.
- Bona, C. M. D., Biasi, L. A., Lipski, B., Masetto, M. A. M., & Deschamps, C. (2010). Adventitious rooting of auxin-treated *Lavandula dentata* cuttings. *Ciência Rural*, 40(5), 1210–1213. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000081>
- Canhoto, J. (2010). *Biotecnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra. URI:<http://hdl.handle.net/10316.2/2586>
- Costa, J., Costa, M., Monteiro, I., & Farinhó, M. (2000). *Estudo de Diversas Espécies da Flora Autóctone Mediterrânea com Interesse Ornamental*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Direcção Regional de Agricultura do Algarve.
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., Almeida, C., Nogueira, J. M. F., & Romano, A. (2013). Metabolic profile and biological activities of *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco: Studies on the essential oil and polar extracts. *Food Chemistry*, 141 (3), 2501–2506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.055>
- Delgado, F. M. G. (2010). *Conservação e valorização de Asphodelus bento-rainhae P.Silva e Lavandula luisieri (Rozeira) Rivas-Martínez da Beira Interior* [Tese de Doutoramento em Engenharia Agronómica, Universidade Técnica. Instituto Superior de Agronomia]. <http://hdl.handle.net/10400.11/544>
- Delgado, T., Marinero, P., Asensio-S.-Manzanera, M. C., Asensio, C., Herrero, B., Pereira, J. A., & Ramalhosa, E. (2014). Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology*, 57 (1), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.041>
- Domingues, J., Delgado, F., Gonçalves, J. C., & Pintado, C. S. (2021). Essential Oils of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* as Antifungal Agent against Fungi from Strawberry Tree Fruit. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9 (3). <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2021.03.002>
- Domingues, J., Delgado, F., Gonçalves, J. C., Zuzarte, M., & Duarte, A. P. (2023). Mediterranean Lavenders from Section Stoechas: An Undervalued Source of Secondary Metabolites with Pharmacological Potential. *Metabolites*, 13 (3), 337. <https://doi.org/10.3390/metabo13030337>
- Domingues, J., Goulão, M., Delgado, F., Gonçalves, J. C., Gonçalves, J., & Pintado, C. S. (2023). Essential Oils of Two Portuguese Endemic Species of *Lavandula* as a Source

- of Antifungal and Antibacterial Agents. *Processes*, 11 (4), 1165. <https://doi.org/10.3390/pr11041165>
- Feijão, M. D. M. (2011). *A flora medicinal e aromática da Herdade da Ribeira Abaixo, Grândola (Estação de campo, CBA): Caracterização micromorfológica e dos óleos essenciais de Lavandula luisieri* [Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia]. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. <http://hdl.handle.net/10451/6356>
- Fraternale, D. (2003). The effect of triacontanol on micropropagation and on secretory system of *Thymus mastichina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74 (1), 87–97. <https://doi.org/10.1023/A:1023321024040>
- Gonçalves, J. C., Marchueta, M., & Diogo, G. (2009). *Influência da benzilaminopurina e da cinetina na micropropagação de plantas jovens de Lavandula luisieri (Rozeira) Rivas-Martínez*. VI Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas. Logroño, Espanha..
- Gonçalves, S., & Romano, A. (2013). *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 31 (2), 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.006>
- Iapichino, G., Arnone, C., Bertolini, M., & Amico Roxas, U. (2006). Propagation of three thymus species by stem cuttings. *Acta Horticulturae*, 723, 411–414. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.723.57>
- Inoue, S., Ilogu, C., & Sobze, J.-M. (2023). Effects of indole-3-butyric acid and age of stem cuttings on root morphology, growth, and survival of *Cornus sericea*. *Journal of Forestry Research*, 34 (2), 433–440. <https://doi.org/10.1007/s11676-022-01490-5>
- Jorge, R. E. (2014). *Avaliação de Óleos Essenciais e Extratos de Lavandula spp. No controlo de Microorganismos* [Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica]. Universidade de Lisboa.
- Kessler, J. C., Vieira, V. A., Martins, I. M., Manrique, Y. A., Afonso, A., Ferreira, P., Mandim, F., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Rodrigues, A. E., & Dias, M. M. (2022). Obtaining Aromatic Extracts from Portuguese *Thymus mastichina* L. by Hydrodistillation and Supercritical Fluid Extraction with CO₂ as Potential Flavouring Additives for Food Applications. *Molecules*, 27 (3), 694. <https://doi.org/10.3390/molecules27030694>
- Leal, F., Taghouti, M., Nunes, F., Silva, A., Coelho, A. C., & Matos, M. (2017). *Thymus* Plants: A Review—Micropropagation, Molecular and Antifungal Activity. Em H. A. El-Shemy (Ed.), *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66623>
- Lopes, C. (2017). *Composição fenólica e propriedades bioativas de amostras de Lavandula pedunculata (Mill.) Cav.* [Dissertação de Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais]. Instituto Politécnico de Bragança.

- Lopes, S., Faria, C., Telhada, A., & Almeida, M. (2005). Contribuição para a propagação vegetativa de algumas espécies arbustivas autóctones da região algarvia. *Congresso Florestal Nacional: a floresta e as gentes - Actas das Comunicações*. 5º Congresso Florestal Nacional, Viseu. <http://hdl.handle.net/10400.5/703>
- Morales, R. (2010). *In Lavandula; Real Jardín Botánico CSIC: Madrid, Espanha*. Flora Ibérica.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Neves, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124 (2), 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.041>
- Neves, L. (2020). *Micropropagação in vitro de batata doce [Ipomoea batatas (L.) LAM.]* [Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal]. Universidade de Coimbra.
- Novais, M. H., Santos, I., Mendes, S., & Pinto-Gomes, C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 93 (2-3), 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.015>
- Peralta-Ruiz, Y., Tovar, C. D. G., Sinning-Mangonez, A., Coronell, E. A., Marino, M. F., & Chaves-Lopez, C. (2020). Reduction of Postharvest Quality Loss and Microbiological Decay of Tomato “Chonto” (*Solanum lycopersicum* L.) Using Chitosan-E Essential Oil-Based Edible Coatings under Low-Temperature Storage. *Polymers*, 12 (8), 1822. <https://doi.org/10.3390/polym12081822>
- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., & Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.04.002>
- Póvoa, O., & Delgado, F. (2014). *Guia para a produção de plantas aromáticas e medicinais: Uma recolha de informações e boas práticas para a produção de plantas aromáticas e medicinais em Portugal*.
- Ramalho, I. (2022). *Propagação in vitro de Cipreste-do Buçaco (Cupressus lusitanica Mill.)* [Dissertação de Mestrado em Recursos Florestais]. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Coimbra.
- Rodrigues, M., Lopes, A. C., Vaz, F., Filipe, M., Alves, G., Ribeiro, M. P., Coutinho, P., & Araujo, A. R. T. S. (2020). *Thymus mastichina*: Composition and Biological Properties with a Focus on Antimicrobial Activity. *Pharmaceuticals*, 13 (12), 479. <https://doi.org/10.3390/ph13120479>

- Rokosa, M. T., & Kulpa, D. (2020). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* plants. *Ciência Rural*, 50 (1), e20181029. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20181029>
- Taghouti, M., Martins-Gomes, C., Schäfer, J., Santos, J. A., Bunzel, M., Nunes, F. M., & Silva, A. M. (2019). Chemical Characterization and Bioactivity of Extracts from *Thymus mastichina*: A *Thymus* with a Distinct Salvianolic Acid Composition. *Antioxidants*, 9 (1), 34. <https://doi.org/10.3390/antiox9010034>
- Tavares, A. C., Zuzarte, M., & Salgueiro, L. R. (2010). *Plantas Aromáticas e Medicinais Escola Médica do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra* (2ª). Imprensa da Universidade de Coimbra. <http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0463-3>
- Upton, S., & Andrews, T. M. (2004). *The Genus Lavandula*. Timber Press.
- Valério, E. (2010). *Estudo da dinâmica populacional e caracterização da biodiversidade de afídeos, seus parasitóides e predadores em culturas hortícolas* [Tese de Doutoramento]. Universidade de Évora.
- Zuzarte, M., Dinis, A. M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R., & Canhoto, J. M. (2010). Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 32 (3), 580–587. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.010>
- Zuzarte, M., Girão, H., & Salgueiro, L. (2023). Aromatic Plant-Based Functional Foods: A Natural Approach to Manage Cardiovascular Diseases. *Molecules*, 28 (13), 5130. <https://doi.org/10.3390/molecules28135130>
- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Dinis, A. M., Canhoto, J. M., & Salgueiro, L. R. (2009). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav. *Chemistry & Biodiversity*, 6 (8), 1283–1292. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800170>
- Zuzarte, M., Sousa, C., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., & Salgueiro, L. (2022). The Anti-Inflammatory Response of *Lavandula luisieri* and *Lavandula pedunculata* Essential Oils. *Plants*, 11 (3), 370. <https://doi.org/10.3390/plants11030370>