



**THAINÁ DE OLIVEIRA**

**SISTEMAS DE MEMBRANAS, NITROGÊNIO E QUITOSANA  
NA MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DE  
VOLÁTEIS DE *Mentha arvensis* E *Mentha viridis***

**LAVRAS – MG  
2017**

**THAINÁ DE OLIVEIRA**

**SISTEMAS DE MEMBRANAS, NITROGÊNIO E QUITOSANA NA  
MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DE VOLÁTEIS DE *Mentha arvensis*  
E *Mentha viridis***

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

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Thainá de.

Sistemas de membranas, nitrogênio equitosana na  
micropropagação e análise química de voláteis de *Mentha arvensis*  
e *Mentha viridis* / Thainá de Oliveira Oliveira. - 2017.

115 p.

Orientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Menta. 2. Cultura de tecidos. 3. Elicitação. I. Pereira Pinto,  
José Eduardo Brasil. II. Vilela Bertolucci, Suzan Kelly. III. Título.

**THAINÁ DE OLIVEIRA**

**SISTEMAS DE MEMBRANAS, NITROGÊNIO E QUITOSANA NA  
MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DE VOLÁTEIS DE *Mentha arvensis*  
E *Mentha viridis***

**SYSTEMS MEMBRANES, NITROGEN AND CHITOSAN IN  
MICROPROPAGATION AND CHEMICAL ANALYSIS OF VOLATILE *Mentha*  
*arvensis* AND *Mentha viridis***

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

APROVADA em 08 de março de 2017.

Dr. Adriano Bortolotti da Silva	UNIFENAS
Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	UFLA

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2017**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. José Eduardo Brasil e à Prof<sup>a</sup>. Suzan Bertolucci, pela amizade e ensinamentos.

Aos amigos do laboratório Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, que me apoiaram e me ajudaram durante todo o mestrado.

Aos técnicos, Evaldo, Annete, Giulia, Dico e Paulinho, pela amizade e ajuda de sempre.

Aos meus pais, por todo amor, paciência, carinho, compreensão e ensinamentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO GERAL

Dentre as plantas medicinais, o gênero *Mentha* é um dos mais utilizados, principalmente por causa da composição dos óleos essenciais, rico em monoterpenos, com aplicabilidade para as indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia, e também para fabricação de perfumes. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio, sistemas alternativos de membranas e diferentes doses de quitosana, no crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e análise da fração volátil das espécies micropropagadas. Foram montados seis experimentos, três com *Mentha arvensis* e três com *M. viridis*. No experimento das fontes de nitrogênio, foi inoculado 1 segmento nodal de aproximadamente 1 cm por tubo em 15 mL de meio MS semi sólido com 6g/L de ágar. As taxas de NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub> foram T1 1/1; T2 1,4/1; T3 2/1; T4 3/1; T5 5/1, T6 11/1 e T7 somente NO<sub>3</sub>. No experimento de sistemas de ventilação natural foi feito um esquema fatorial 3 x 4, variando 3 doses de sacarose (0%, 1,5%, 3,0%) e 4 sistemas alternativos de membrans SM (Sem Membrana), SAM1 (Sistema Alternativo de Membrana um), SAM2 (Sistema Alternativo de Membrana dois), SAM4 (Sistema Alternativo de Membrana quatro). Os recipientes utilizados para a inoculação foram frascos contendo 45 mL de meio MS, com três explantes por frasco. Os experimentos de quitosana foram inoculados 1 segmento nodal de aproximadamente 1 cm por tubo em 15 mL de meio MS, que consistia em 5 doses diferentes do elicitor, 0 mg/L, 50mg/L, 100mg/L, 150mg/L e 200mg/L. Todos foram cultivados por 30 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h de luz. No primeiro experimento, usando a fonte fornecida, foi somente NO<sub>3</sub>, estas não se desenvolveram bem, sendo necessário acrescentar o NH<sub>4</sub> ao meio. Em *Mentha arvensis*, o tratamento 1,4/1 produziu maiores valores dos pigmentos para clorofila *a*, *b* e total. O tratamento com somente NO<sub>3</sub> quantificou maiores pigmentos de clorofila *b* e total, e carotenoides. A partir do tratamento 3/1, houve uma tendência linear crescente de mentol e decrescente de pulegona. Em *Mentha viridis*, o tratamento com somente NO<sub>3</sub> proporcionou mais pigmentos para clorofila *a* e total, a clorofila *b* teve melhor resposta na taxa 11/1, e os carotenoides em 1/1. Na mesma espécie, houve uma queda acentuada da carvona e aumento do linalol e hidrato de sabineno, com a taxa 11/1. No segundo, pode-se constatar que o uso de membranas porosas juntamente com a diminuição da sacarose no cultivo *in vitro*, proporcionou um melhor crescimento das plântulas. A *Mentha arvensis* produziu maiores valores de pigmentos clorofila *a*, *b* total e carotenoides com 4 membranas e 3,0% de sacarose. Já a *Mentha viridis* obteve maiores valores para estes pigmentos com 4 membranas e 1,5% de sacarose. O sistema com 4 membranas e 0 sacarose foi o que proporcionou maior área de mentol em *Mentha arvensis*. O sistema com 1 membrana e 3,0% de sacarose estimulou a maior produção de linalol em *Mentha viridis*. E no último, em ambas as espécies, a adição de quitosana influenciou a análise da fração volátil e o crescimento da plântula. A quitosana afetou o crescimento de *M. arvensis* e *M. viridis*, sendo mais acentuado em *M. arvensis*. A produção de pigmentos fotossintéticos respondeu melhor nos tratamentos que não continham quitosana. O elicitor afetou a concentração dos constituintes *in vitro*. Na menor concentração de quitosana houve maior acúmulo de pulegona e menor de mentol. No entanto, maior concentração ocorreu o inverso.

**Palavras chave:** Trocas gasosas. Elicitação. Constituintes voláteis. Meio de cultura

## GENERAL ABSTRACT

Among the medicinal plants, the genus *Mentha*, is one of the most used mainly because of the composition of essential oils, rich in monoterpenes, applicable to the pharmaceutical, cosmetic, food and perfume industries. The present study aimed to evaluate the effect of different nitrogen sources, alternative membrane systems and different doses of chitosan, on the growth, production of photosynthetic pigments and analysis of the volatile fraction of micropropagated species. Six experiments were set up, three with *Mentha arvensis* and three with *M. viridis*. In the nitrogen sources experiment, a nodal segment of approximately 1 cm per tube was inoculated into 15 mL of semi solid MS medium with 6 g / L of agar. Rates of NO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub> were T1 1/1; T2 1.4 / 1; T3 2/1; T4 3/1; T5 5/1, T6 11/1 and T7 only NO<sub>3</sub>. In the experiment of natural ventilation systems, a 3 x 4 factorial scheme was done, varying 3 doses of sucrose (0%, 1,5%, 3,0%) and 4 alternative systems of membranes WM (Without Membrane), ASM1 (Alternative System of Membrane One), ASM2 (Alternative System of Membrane Two), ASM4 (Alternative System of Membrane Four). The containers used for inoculation were flasks containing 45 mL of MS medium, with three explants per vial. And the chitosan experiments were inoculated 1 nodal segment of approximately 1 cm per tube in 15 mL of MS medium. It consisted of 5 different doses of elicitor, 0 mg / L, 50mg / L, 100mg / L, 150mg / L and 200mg / L. All were cultivated for 30 days in a growth room with photoperiod of 16h light. In the first experiment, when the source supplied was only NO<sub>3</sub>, they did not develop well and it was necessary to add NH<sub>4</sub> to the medium. In *Mentha arvensis*, the 1.4 / 1 treatment produced higher pigment values for chlorophyll a, b and total chlorophyll. The treatment with only NO<sub>3</sub> quantified larger pigments of chlorophyll b and total chlorophyll, and carotenoids. From the 3/1 treatment, there was an increasing linear trend of menthol and decreasing pulegone. In *Mentha viridis*, treatment with only NO<sub>3</sub> provided more pigments for chlorophyll a and total chlorophyll, chlorophyll b had better response at the 11/1 rate, and carotenoids at 1/1. In the same species, there was a marked fall of carvone and increase of linalool and sabinene hydrate with the rate 11/1. In the second, it can be observed that the use of porous membranes together with the decrease of the sucrose in the in vitro culture, provided a better growth of the seedlings. *Mentha arvensis* produced higher values of chlorophyll a, b, total chlorophyll, and carotenoid pigments with 4 membranes and 3.0% sucrose. *Mentha viridis* obtained higher values for these pigments with 4 membranes and 1.5% of sucrose. The system with 4 membranes and sucrose was the one that provided greater area of menthol in *Mentha arvensis*. And the system with 1 membrane and 3.0% sucrose stimulated the largest production of linalool in *Mentha viridis*. And at last, in both species, the addition of chitosan influenced analysis of the volatile fraction and seedling growth. Chitosan affected the growth of *M. arvensis* and *M. viridis*, being more pronounced in *M. arvensis*. The production of photosynthetic pigments responded better in treatments that did not contain chitosan. The elicitor affected the concentration of constituents in vitro. In the lower concentration of chitosan there was a greater accumulation of pulegone and less menthol. However, higher concentration occurred the inverse.

**Key words:** Gas exchange. Elicitation. Volatile constituents. Culture media.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Gênero mentha</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Mentha arvensis L.</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Mentha viridis L.</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Cultura de tecidos em plantas medicinais</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5</b>	<b>Metabólitos secundários</b> .....	<b>18</b>
<b>2.6</b>	<b>Fatores in vitro que influenciam o desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários das plantas</b> .....	<b>19</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Nitrogênio</b> .....	<b>19</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Sistemas de ventilação natural</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Eliciator</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6.4</b>	<b>Mecanismos de ação dos eliciadores</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6.5</b>	<b>Substâncias eladoras</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6.6</b>	<b>Quitosana</b> .....	<b>24</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>26</b>
	<b>CAPÍTULO 2 - Influência da taxa de nitrato e amônia no crescimento e na produção de compostos voláteis in vitro de Mentha arvensis L. e M. viridis L.</b> .....	<b>35</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>Fase de estabelecimento</b> .....	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>Condições gerais dos experimentos</b> .....	<b>40</b>
<b>2.3</b>	<b>Composição dos experimentos</b> .....	<b>40</b>
<b>2.4</b>	<b>Quantificação dos pigmentos fotossintéticos</b> .....	<b>41</b>
<b>2.5</b>	<b>Análise química da fração volátil</b> .....	<b>41</b>
<b>2.6</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
	<b>CAPÍTULO 3 - Efeito da concentração de sacarose e membranas porosas no crescimento e análise da fração volátil no cultivo in vitro em Mentha</b> .....	<b>61</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>65</b>
<b>2.1</b>	<b>Fase de estabelecimento</b> .....	<b>65</b>
<b>2.2</b>	<b>Condições gerais dos experimentos</b> .....	<b>66</b>
<b>2.3</b>	<b>Composição dos experimentos</b> .....	<b>66</b>
<b>2.4</b>	<b>Quantificação dos pigmentos fotossintéticos</b> .....	<b>68</b>
<b>2.5</b>	<b>Análise química da fração volátil</b> .....	<b>69</b>
<b>2.6</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>69</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>88</b>
	<b>CAPÍTULO 4 - Efeito da concentração de quitosana no crescimento e análise da fração volátil in vitro em Mentha</b> .....	<b>92</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>94</b>



<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>96</b>
<b>2.1</b>	<b>Fase de estabelecimento .....</b>	<b>96</b>
<b>2.2</b>	<b>Condições gerais dos experimentos .....</b>	<b>97</b>
<b>2.3</b>	<b>Composição dos experimentos .....</b>	<b>97</b>
<b>3</b>	<b>Quantificação dos pigmentos fotossintéticos .....</b>	<b>98</b>
<b>3.1</b>	<b>Análise química da fração volátil .....</b>	<b>98</b>
<b>3.2</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>99</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>111</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde os séculos passados, os produtos de origem vegetal são as bases para o tratamento de diversas doenças, seja de forma tradicional, devido ao conhecimento das propriedades de determinada planta, que é passado de geração a geração, ou devido as suas moléculas ativas. O conhecimento sobre as propriedades e usos das plantas medicinais é bastante conhecido, porém, se essas informações não são rapidamente pesquisadas e registradas, as indicações e aplicações não são passadas de geração para geração.

Os produtos naturais de origem vegetal são utilizados tanto na terapêutica médica, como na indústria de cosméticos e de alimentos, servindo como aromatizantes, flavorizantes e antioxidantes. A maioria dos produtos naturais utilizados medicinalmente são os terpenóides, as quinonas, os lignanos, os flavonóides e os alcalóides e, de uma maneira geral, apresentam ação tranquilizante, analgésica, anti-inflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, dentre outras.

Entre as plantas medicinais, o gênero *Mentha* é um dos mais utilizados e pesquisados, devido principalmente à importância do óleo essencial produzido pelas espécies. Ele é rico em monoterpenos e tem aplicações que variam desde fitoterápicas, cosméticas, alimentícia até a produção de cigarros.

O mercado mundial de OE gira em torno de US\$15 milhões/ano, apresentando crescimento aproximado de 11% por ano. Como parte dos 18 principais óleos essenciais no mercado mundial, temos o óleo de Menta japonesa (*arvensis*), Hortela pimenta (*piperita*), e *Mentha spicata*, o mentol, constituinte químico dos óleos essenciais das mentas, é um dos compostos mais importantes do gênero.

O Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior (Alice Web) divulga as estatísticas brasileiras de exportações e importações atualizadas. Com os dados mais recentes do mês, encerrados entre 3-10 dias após o final do mês, tem como base das informações o Sistema Integrado de Comércio Exterior (SISCOMEX). A busca pela palavra-chave 'óleo essencial', no período de janeiro de 2005 a outubro de 2008, mostrou 27 produtos entre os quais estão incluídos 4 óleos de mentas (hortelã-pimenta - *Mentha piperita*, menta japonesa - *M. arvensis*, menta spearmint - *M. viridis* e óleos de outras mentas).

Diante do exposto, vê-se a necessidade de mais estudos que visem uma maior produtividade dos componentes dos óleos essenciais.

Dentro das técnicas de pesquisas sobre as plantas medicinais, nas últimas décadas, a micropropagação tem demonstrado ter um papel importante na produção de metabólitos secundários. A micropropagação é uma técnica biotecnológica de cultura de tecidos vegetais, que consiste em inocular explantes, em um meio de cultura, com condições assépticas, com o objetivo de regenerar e multiplicar a espécie, para se obter uma planta completa, com todas as características da planta mãe.

Existem fatores *in vitro* que afetam o crescimento e produção de metabólitos secundários das plântulas. Eles podem ser a taxa e a fonte de nitrogênio suplementada ao meio, o tipo de recipiente à disponibilidade de gás carbônico, e a adição de um elicitador.

Com isso, este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e composição do óleo essencial de *Mentha arvensis* e *Mentha viridis*, cultivadas *in vitro*, sob diferentes fontes de nitrogênio, diferentes sistemas de ventilação e doses de sacarose, e doses de quitosana.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Gênero *mentha*

As plantas desse gênero são popularmente conhecidas no Brasil como hortelã. Muito utilizado na medicina como remédio para dor estomacal e intestinal, como estimulante das funções cardíacas, controle da azia, gastrite, cólicas e gases (GRISI et al. 2006). As plantas desse gênero são difíceis de compreender e de classificar. Suas espécies variam muito, seus híbridos são numerosos e muito divididos. Devido a isto, não é estranho então, que dentro deste panorama confuso, seus nomes e aplicações práticas sejam confundidos (PAGE; STERN, 1992). A hibridação interespecífica ocorre de forma natural e com alta frequência, tanto em populações selvagens como em cultivo. Podem surgir populações híbridas complexas que são capazes de cruzar entre si, sendo parentais ou não parentais. Consequente a isto, tem-se a dificuldade de identificação do gênero (GOBERT et al., 2002).

Segundo Deschamps et al. (2013), o principal produto das plantas deste gênero, é o óleo essencial que é produzido e armazenado em tricomas glandulares, presentes nas folhas e flores e em pouca quantidade no caule. O mentol, presente em algumas espécies, é o principal constituinte, muito utilizado nas indústrias farmacêutica (para produção de xaropes e pomadas, dentre outros), cosmética e alimentícia (perfumes, balas, chicletes) (SANGANERIA, 2005). A composição química dos óleos essenciais varia de planta para planta e em função de fatores bióticos e abióticos (SOUZA, 2006).

Mesmo com um mercado muito promissor, a maior parte das plantas medicinais no Brasil é destinada para produção de matéria seca e posterior fabricação de chás, sendo assim, a maior parte dos óleos essenciais é importada de países como China, Índia e Estados Unidos (DESCHAMPS et al., 2013). A grande maioria dos trabalhos que descrevem os efeitos antimicrobianos do gênero *Mentha*, tem o enfoque no seu óleo essencial e seus compostos, porém, vale ressaltar, que quando a planta é utilizada para fazer chás, estes compostos são diferentes dos encontrados no seu óleo essencial.

A respeito da rota de formação, a biossíntese dos monoterpenos em *Mentha* já é bem estabelecida (CROTEAU et al., 2000). Estudos indicam que, o que determina a produção de monoterpenos na espécie, é a taxa de biossíntese, que é regulada pelos níveis de enzimas específicas, através de seus substratos correspondentes (TURNER et al., 2000).

## 2.2 *Mentha arvensis* L.

A *Mentha arvensis* L, (Lamiaceae) conhecida como hortelã do campo, menta japonesa, vick ou menta pertence ao gênero botânico *Mentha*, é originária do sul da China (Figura 1). Apresenta hábito herbáceo, é uma planta rizomatosa, estolonífera, de caule quadrangular, com folhas opostas, ovaladas e serradas. É uma planta medicinal aromática de grande interesse econômico, devido ao seu óleo essencial rico em mentol, largamente utilizado na indústria alimentícia (MOTA; RODRIGUES, 2001). O acúmulo de óleos essenciais na família *Lamiaceae* está associado à presença de estruturas secretoras especializadas, conhecidas como tricomas glandulares, encontrados em especial em folhas e cálices florais (LAWRENCE, 1992). Óleos essenciais são compostos líquidos e voláteis que em sua composição, apresentam substâncias responsáveis pelo aroma das plantas.

Figura 1 - Aspecto da *Mentha arvensis* com inflorescências.



Fonte: Da autora (2017).

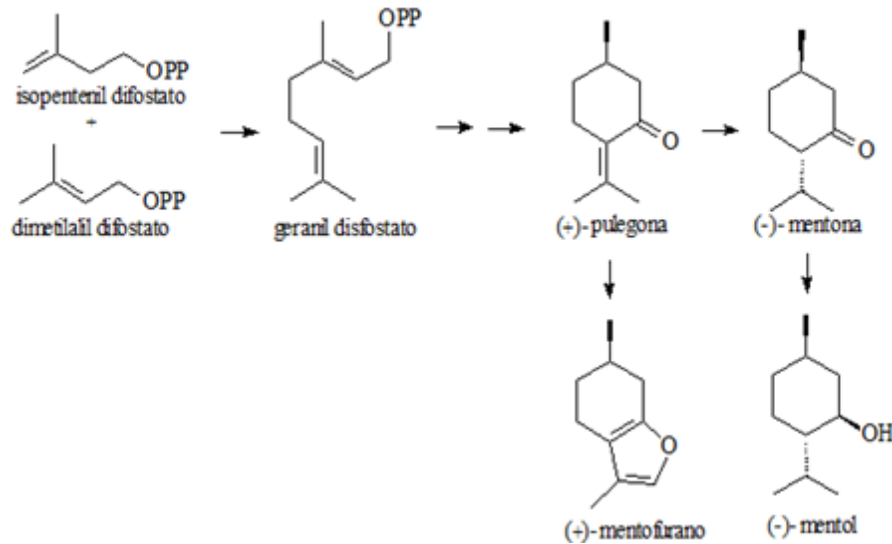
Têm também utilização medicinal e são componentes de perfumes e aromatizantes de uso oral, tais como cremes dentais, antissépticos bucais, antiácidos, pastilhas refrescantes, gomas de mascar, licores, aditivos para cremes alimentícios e em cigarros (MOSCIANO, 2005).

Possuem propriedades terapêuticas, caracterizadas como descongestionante nasal, podendo também ser utilizadas no combate à flatulência, e em casos de náuseas e vômitos. O mentol está contido nas folhas da planta, com teores entre 50 – 70%. Esse mesmo constituinte tem grande utilização na indústria de alimentos, farmacêutica e de higiene (MARTINS et al., 1994).

Para a biossíntese do mentol, existe uma sequência de rotas metabólicas até a sua formação, com a atuação da enzima limoneno-3-hidroxilase, que é a responsável pelo acúmulo de mentol (Figura 2). A mesma tem o limoneno como substrato e dará origem ao trans-isopiperitoneol, piperitona, mentona e mentol (MAIA, 1998). Quando a concentração do óleo essencial estiver com mais de 20% de mentona, significa que a mentona ainda não foi

convertida em mentol, essa conversão é um processo lento e está ligada ao estágio de maturação e nutrição da planta (MURRAY et al., 1972).

Figura 2 - Rota metabólica do mentol.



Fonte: Adaptado de Mahmoud e Croteau (2003).

Tanto o óleo essencial de *Mentha arvensis* quanto de *Mentha viridis*, foram testados e aprovados como redutores das bactérias patogênicas *Escherichia. coli* e *Salmonella* Enteritidis, em sucos das frutas caju, goiaba e abacaxi (GUEDES et al., 2016).

A dosagem de 100µL de extrato etanólico de *Mentha arvensis*, também ocasionou na inibição do crescimento da bactéria, neste estudo, a *Acinetobacter Baumannii*. A atividade antibacteriana do extrato foi testada com dois antibióticos nomeados de *oxacilina* e *ciprofloxacina*, que serviram como controles (ZHANG et al., 2015). Trabalhos realizados por Silva et al. (2011), com a adição do óleo essencial de *M.arvensis* em concentrações de 100 µL, no meio de cultura, demonstrou que ele é eficiente na inibição dos fungos *fitopatogenicos* *Aspergillus sp.*, *Penicillium rubrum*, *Sclerotinia sp.*, *Fusarium verticillioides* Cepa UEM e *Corynespora cassiicola*.

Camatti et al. (2011), afirmaram a eficiência do mentol contra fungos fitopatogênicos, os isolando a partir dos sintomas de flores de gérberas (*Gerbera sp.*) e rosas (*Rosa sp.*). Neste, o mentol a 50% em extrato acético se mostrou eficiente, eliminando acima de 40% os fungos de *Fusarium sp*, para o fungo *Botrytis sp*, a inibição foi de 83,59% dos. Diniz et al. (2008) confirmou a eficácia deste composto com os fungos *Aspergillus sp.*, *Penicillium rubrum*, *Sclerotinia sp.*, *Fusarium moniliforme*, no tratamento com 100 µL do óleo essencial de *Mentha arvensis*.

Diante disso, seu óleo vem sendo estudado, devido ao seu efeito inibidor do desenvolvimento de microrganismos patogênicos, porém, são necessários mais estudos que visem a propagação da espécie por apresentar importantes atividades biológicas, além de seu óleo essencial, a respeito de aplicabilidades e direcionamento da atividade de interesse.

### 2.3 *Mentha viridis* L.

*Mentha viridis*, (Lamiaceae) vulgarmente conhecida como jardim ou menta verde, é nativa da região do Mediterrâneo e amplamente distribuída na Eurásia, Austrália e África do Sul. É uma planta perene, rizomatosa herbácea, alcançando de 30 - 100 cm de altura, suas folhas têm 5 - 9 cm de comprimento e 1,5 - 3 cm de largura (GRIEVE, 2013) (Figura 3).

Figura 3 - Aspecto da *Mentha viridis* com inflorescência.



Fonte: Da autora (2017).

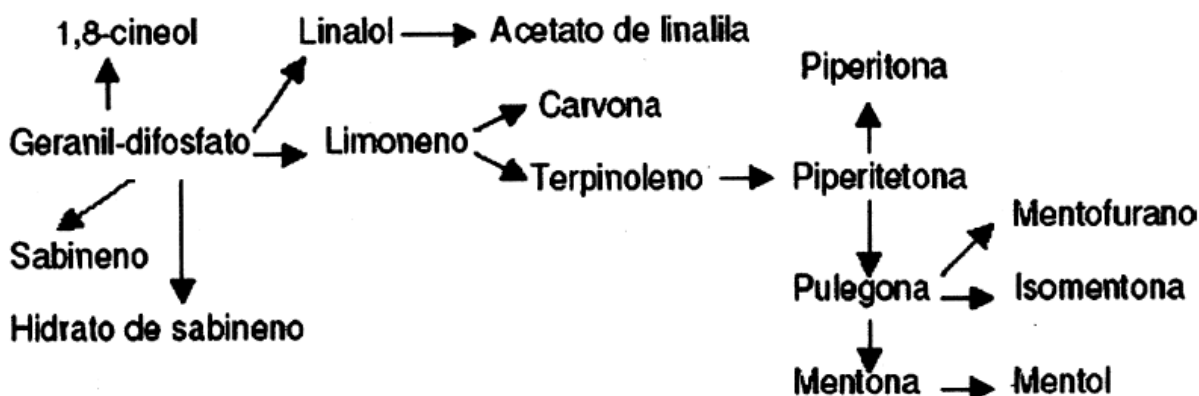
*Mentha viridis* é tradicionalmente utilizada como um relaxante muscular, antiespasmódico, e agente calmante em náuseas e vômitos; alivia cólicas em crianças, febre, e desordens estomacais (SANDEEP, 2009). É também, largamente utilizada pelas indústrias de vários países para extração do óleo essencial, que é rico em monoterpenos, com propriedades cosméticas, farmacêuticas, culinárias, bem como para fabricação de licores (KHANUJA et al.,



2005). A respeito das atividades farmacêuticas, seu óleo contém propriedades químicas que podem ser úteis para formulações à base de plantas como atividades anti-inflamatória, analgésica, antipirética, tônico cardíaco e antiasmático (HAMEED et al., 2015).

A formação de óleo essencial nas plantas é altamente dependente das condições climáticas, especialmente o comprimento do dia, irradiância, temperatura e abastecimento de água (FRANZ; NOVAK, 2010). A composição química dos óleos essenciais está influenciada por fatores tais como o desenvolvimento da folha e o surgimento de novos órgãos, o que pode conduzir a uma baixa concentração destes metabolitos causados pela translocação dos mesmos, bem como por efeitos tais como sazonalidade, níveis de chuva, e o estresse ao qual a planta está exposta. Estes efeitos podem influenciar diretamente na quantidade e na qualidade dos constituintes do óleo essencial (GOBBO et al., 2007; MKADDEM et al., 2009). Na figura 4, pode-se observar os principais monoterpênicos do gênero *Mentha*.

Figura 4 - Rota biossintética dos principais monoterpênicos do óleo essencial de espécies de *Mentha*.



Fonte: Adaptado de Croteau (2003).

Foi relatado que a composição de óleo essencial de *M. viridis*, varia de acordo com a região. Na Tunísia, os majoritários foram carvona, 1,8-cineol, e limoneno (MKADDEM et al., 2009), enquanto que em Marrocos, as plantulas continham alto teor pulegona (TALBAOUI et al., 2012). Em um trabalho de caracterização química e atividades antibacterianas e antioxidantes de *Mentha viridis L* e *Mentha pulegona*, em Lavras, MG, identificou-se os compostos linalol, carvona e  $\alpha$ -terpineno, como majoritários em *M. viridis* (SILVA et al., 2015).

## 2.4 Cultura de tecidos em plantas medicinais

Dentro da cultura de tecidos, existe uma técnica de propagação intitulada de micropropagação. A micropropagação apresenta vários benefícios, dentre os quais, pode-se citar: possibilidade de aumento rápido no número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas, produção de mudas durante todo o ano, mesmo em regiões nas quais a planta não apresenta condições para a propagação sexuada, e produção de plantas com elevada qualidade fitossanitária (ECHEVERRIGARAY et al., 2001). Este método apresenta vantagens como reprodutibilidade, direcionamento para produção de substâncias de interesse, facilidade de isolamento de compostos e possibilidade de isolamento em grande escala (NITZSCHE et al., 2004).

Dentre as principais aplicações da cultura de tecidos vegetais, tem-se a conservação e intercâmbio de germoplasma, cultura de embriões, germinação de sementes, aceleração de programas de melhoramento, estabilidade genética ou aumento de variabilidade (FERREIRA et al., 1998). Dentre as aplicabilidades específicas em plantas medicinais, estão relacionadas principalmente com a produção de metabólitos secundários (BOONSNONGCHEEP et al., 2010), e também a obtenção de genótipos produtores de compostos de interesse (COSTA et al., 2006).

Outra aplicação possível é para o estudo das vias biossintéticas, sua relação entre a produção desses metabólitos e o crescimento celular, cujos fatores são importantes para futuras aplicações industriais (BOONSNONGCHEEP et al., 2010). Além disso, também pode ser uma alternativa para a produção de metabólitos economicamente importantes como flavorizantes, corantes, aromatizantes e farmacêuticos (VERPOORTE et al., 2002; VANISREE et al., 2004) ou aqueles que por algum tipo de impedimento, não são sintetizados (ARNALDOS et al., 2001).

As proporções dos metabólitos secundários em plantas medicinais ocorrem em diferentes níveis, e apesar do controle genético, sua expressão pode ser modificada devido a processos bioquímicos, ecológicos, fisiológicos e evolutivos (GOBBO NETO et al., 2007).

A aplicação de sistemas de produção de metabólitos secundários *in vitro* é possível, mas requer um aprofundamento do entendimento da regulação fisiológica de sua biossíntese e da otimização das condições culturais (MATKOWSKI, 2004).

O emprego de técnicas biotecnológicas se constitui em ferramenta bastante útil para a reprodução de exemplares com propriedades desejáveis (FRANÇA, 2001), em que vários problemas em biotecnologia de plantas podem ser resolvidos pela técnica da cultura de

tecidos. O cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui assim, uma alternativa para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal. Técnicas como micropropagação de culturas de calos, raízes e suspensão celular de plantas medicinais, aromáticas e inseticidas podem ser aplicadas, visando não só a propagação em larga escala de genótipos superiores como a produção de metabólitos secundários (CONCEIÇÃO et al., 2000). Podem ser consideradas como ferramentas promissoras para a preservação de recursos genéticos vegetais, bem como para a propagação comercial de plantas medicinais (ABREU, 1998).

## 2.5 Metabólitos secundários

O metabolismo primário das plantas é conhecido por realizar as funções primárias dos vegetais, ou seja, o crescimento e desenvolvimento celular. Este produz substâncias essenciais para o vegetal, como aminoácidos, lipídeos e ácidos nucleicos, com as funções de proteção, armazenamento e energia propriamente dita (TAIZ; ZEIGER, 2013). Já o metabolismo secundário, diferente do primário, produz uma diversidade de substâncias biologicamente ativas, relacionadas à adaptação do vegetal que não são comuns a todas as plantas e caracterizam certos grupos taxonômicos (CHEN; CHEN, 2000).

Entende-se por metabólitos secundários, como sendo todos os compostos extracelulares que são secretados no meio de cultura, durante o processo de crescimento e diferenciação de um organismo vivo e, geralmente, são isolados e caracterizados principalmente para fins industriais (DREYFUSS; CHAPELA, 1994; STROBEL, 2003). Estes metabólitos secundários não participam do crescimento e do desenvolvimento do vegetal propriamente dito, porém, são responsáveis pela sobrevivência da planta no meio que a cerca (SERAFINI et al., 2001; TAIZ; ZEIGER 2013). Podem ter função de proteção contra a herbivoria e a infecções por microrganismos patogênicos, atrativo de animais polinizadores, podem também atuar como aleloquímicos na competição planta-planta, garantindo a adaptação da espécie no ambiente (MARASCHIN; VERPORTE, 1999).

Essas substâncias apresentam atividades biológicas em baixas concentrações e estão relacionados com aromas, sabores e corantes naturais (BROWN et al., 1989), variando conforme o desenvolvimento da planta.

Trabalhos com *Rosmarinus officinalis*, puderam comprovar esse fato, pois foi constatado que durante o florescimento ocorre um aumento nos níveis do ácido carnósico nas folhas e flores (DEL BAÑO et al., 2004a), entretando, nos ramos das folhas, aumenta a concentração de flavonoides, durante o desenvolvimento das folhas (DEL BAÑO et al.,

2004b). Já Silva et al. (2012), trabalhando com *Sphagneticola trilobata*, constatou que as condições climáticas, a disponibilidade de água, e as estações do ano, podem alterar o metabolismo vegetal secundário e, conseqüentemente, alterar a composição dos óleos essenciais.

Sendo assim, pode-se perceber que o metabolismo secundário é sensível a mudanças de manejo, disponibilidade de nutrientes, condições climáticas, estágio de desenvolvimento, dentre outros, ocorrendo o acúmulo de diferentes compostos, em diferentes concentrações.

## **2.6 Fatores *in vitro* que influenciam o desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários das plantas**

Existem vários fatores que influenciam o crescimento *in vitro* de plantas. Dentre eles, fatores tais como tipo de meio de cultura, fonte e concentração dos nutrientes, os reguladores que promovem a multiplicação como as citocininas, o uso de sistemas de ventilação natural, dentre outros.

Dentre os fatores que a afetam o crescimento das plantas *in vitro*, o meio de cultivo é um dos mais importantes a ser considerado. Geralmente o meio MS é o mais utilizado, com respostas satisfatórias para a maioria das espécies. Porém, em alguns casos, composições mais diluídas em macronutrientes podem apresentar melhores resultados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As concentrações e tipos de sais utilizados vão refletir na facilidade de regeneração do explante, além disso, tem-se as necessidades nutricionais específicas para cada espécie (CAMPOS et al., 2013).

### **2.6.1 Nitrogênio**

O nitrogênio é um macronutriente muito importante, estando associado ao controle do crescimento, diferenciação e morfogênese. No meio nutritivo pode ser fornecido na forma de nitrato, amônio e aminoácidos (WERNER et al., 2010). O meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contém dois sais de nitrogênio, o nitrato de amônio ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ) e o nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), totalizando uma concentração de 60 mM de nitrogênio total, considerado um nível elevado para muitas espécies. A quantidade ideal de N a ser inserida no meio depende da espécie. Como exemplo, sementes de *Vanilla planifolia* Jacks, quando germinadas em meio MS com 25% da concentração total de nitrogênio, obteve-se um melhor desenvolvimento da plantula (MORAES et al., 2012). A *Salvia stenophylla* Burch. cultivada *in vitro* em meio MS, apresentou melhor desenvolvimento quando utilizados 2,5 vezes o

padrão molar, bem como obteve-se maior produção de  $\alpha$ -bisabolol (MUSARURWA et al., 2012).

O nitrogênio constitui componente fundamental de três classes de substâncias estruturais e do metabolismo primário das células: proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas). O suprimento abundante de nitrogênio no cultivo gera tendência de aumento nos teores de proteína e clorofila nas células. Em baixas concentrações diminuem os teores dessas duas substâncias, reduzindo drasticamente também, a taxa de divisão celular. A concentração de ácido linolênico aumenta, mas o conteúdo de ácidos graxos permanece constante. Também ocorre aumento na concentração de polissacarídeos nas células e as ficocianinas são degradadas e utilizadas como fonte de nitrogênio. Mais carotenóides e menos clorofilas são produzidas nessas condições, gerando mudanças de cor no meio de cultivo que tendem ao amarelado (BERTOLIN; COLLA; COSTA, 2004; LOURENÇO, 2006; FERREIRA, 2008).

Apesar da ampla utilização dos sais de nitrato, estudos mostram muita variedade de fontes alternativas de nitrogênio, sendo absorvido, principalmente, na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Por ser constituinte de várias biomoléculas essenciais, como aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outros, sua assimilação se dá em diversos processos metabólicos da planta (SAKUTA et al., 1987). Sabe-se que as fontes de nitrogênio são de grande importância tanto no crescimento quanto na diferenciação de células e tecidos cultivados *in vitro* (VAN BEUSICHEM et al., 1988). Dados de vários autores citam que a combinação de amônio e nitrato estimula o crescimento de várias espécies de plantas *in vitro*. A razão entre estas duas fontes de nitrogênio, para os autores em consideração, parece ser o fator determinante causador deste estímulo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 2004; ARAUJO et al., 2009).

## **2.6.2 Sistemas de ventilação natural**

O microambiente dentro dos frascos de cultura parece ser um ambiente homogêneo, mas na verdade, é o responsável pela variabilidade no comportamento das culturas, uma vez que os fatores determinantes para a qualidade do microambiente são os tipos de frasco, tipo de tampa e quantidade de meio presente. A forma de vedação empregada interfere nas trocas gasosas entre o microambiente dentro do frasco e o ar atmosférico, ocasionando o aumento da concentração de  $\text{CO}_2$  e etileno dentro dos frascos se for utilizada vedação hermética (FILHO et al., 2002). As plantas *in vitro* apresentam grande teor de umidade e possuem sua

fotossíntese limitada, por não apresentar cloroplastos totalmente funcionais, por isso que ao meio de cultura, é adicionada uma fonte de carboidratos, que é a fonte energética principal para o explante em desenvolvimento.

O carbono exógeno no meio de cultivo serve como fonte de energia, influenciando na fisiologia da planta, diferenciação e crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos. Para as plantas é necessário energia, esta pode ser oriunda da fotossíntese ou de outra fonte de carboidratos (CALVETE et al., 2002). Na cultura *in vitro*, geralmente utiliza-se 20-30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, adicionados ao meio de cultivo (TORRES et al., 1998).

Muitas vezes ocorrem distúrbios fisiológicos como a hiperidricidade, que compromete a técnica e é indesejável na maioria dos casos (GEORGE, 2008). Um modo de superar esse distúrbio e economizar com a fonte energética seria o cultivo em ambientes automixotróficos, ou seja, com uma maior ventilação do ambiente *in vitro* e redução do fornecimento da energia exógena. Esse sistema permite uma maior taxa fotossintética e um crescimento mais acelerado, tendo em vista que as trocas gasosas são facilitadas, havendo uma maior disponibilidade de CO<sub>2</sub> para o processo fotossintético, além de não haver um excesso de umidade e ser observado, há o desenvolvimento normal dos plastídios (GEORGE, 2008).

Trabalhos comprovaram a eficiência do uso de sistemas automixotróficos, como em *Pffafia glometata* (IAREMA et al., 2012; SALDANHA et al., 2012) *Solanum tuberosum*, e *Rhemania glutinosa* (SEON et al., 2000), com o aumento das taxas fotossintéticas e de assimilação, ausência de distúrbios fisiológicos, tecidos anatomicamente funcionais, maiores teores de pigmentos, melhoria e rapidez na fase de aclimatização das plantas. Portanto, a utilização desses sistemas é uma opção atraente para o cultivo de plantas medicinais, principalmente pela rapidez no crescimento e diminuição das perdas com aclimatização, obtendo-se mudas mais resistentes e melhor adaptadas ao campo (SALDANHA et al., 2012).

### 2.6.3 Eliciator

As plantas medicinais possuem compostos secundários que tanto podem ter ação fungitóxica (ação antimicrobiana direta) como eliciadora, ativando mecanismos de defesa nas plantas (ação indireta) (SCHWAN-ESTRADA, 2008).

Elicidores são substâncias exógenas que induzem uma resposta de defesa no vegetal, observado pelas substâncias provenientes do metabolismo secundário com ação de proteção. Diversos trabalhos têm buscado entender a ação destes compostos sobre o vegetal e a síntese de substâncias decorrentes da indução por eliciadores. Os eliciadores agem, muitas vezes,

simulando um ataque de inseto, fungo, dentre outros, tomando por base a origem e composição química da substância eliciadora (quitina presente nos insetos e crustáceos, por exemplo). Como resultado, ocorrem a síntese e a acumulação de metabólitos secundários (fitoalexinas e compostos fenólicos), macromoléculas estruturais (calose, lignina e glicoproteína rica em hidroxiprolina) entre outros (ALAMINO et al., 2013).

Portanto, a exposição de indutores (eliciadores) *in vitro* pode fornecer uma ferramenta para promover mudanças no metabolismo secundário das plantas, com o objetivo de determinar condições necessárias para estimular a produção de grupos específicos de metabólitos biologicamente ativos (PASTERNAK et al., 2005).

Tendo em vista a necessidade de plantas para estudos químicos e biológicos, torna-se fundamental a utilização de técnicas como a micropropagação, visando a produção de mudas homogêneas e de qualidade, além disso, estudar a variabilidade química é fundamental quando se deseja desenvolver estudos de efeitos biológicos, objetivando um padrão químico para esta espécie aliado à seleção de plantas com altos teores de óleo essencial.

Pesquisas demonstram que a resposta aos eliciadores envolve, na maioria das vezes, a síntese de compostos secundários (metabólitos especiais) e, portanto, a indução da resistência pode alterar o particionamento de carbono e, conseqüentemente, o desenvolvimento vegetal (ANTONIAZZI; DESCHAMPS, 2006). Um eliciador pode ser mais bem definido como uma substância que, quando introduzida em pequenas concentrações em um sistema de célula viva, inicia ou potencializa a biossíntese de compostos específicos (NAMDEO, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013). De certa forma, estas substâncias agem na defesa induzida do vegetal, promovendo ou potencializando sua resposta às adversidades exógenas. As pesquisas envolvendo substâncias eliciadoras procuram identificar aquelas que podem aumentar a produção de compostos secundários de interesse da indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. Um exemplo conhecido é o da planta Vinca (*Catharanthus roseus*), este vegetal produz uma substância anticancerígena de grande interesse farmacêutico, um alcaloide chamado de Vincristina. Vários estudos com eliciadores têm sido realizados visando alcançar o aumento desta molécula que é oriunda do metabolismo secundário desta espécie (VÁZQUEZ-FLOTA et al., 2009).

#### 2.6.4 Mecanismos de ação dos eliciadores

Os eliciadores são conhecidos por promover a ativação de mecanismos de defesa em plantas contra diversos patógenos e insetos. A indução a resistência ocorre quando moléculas sinalizadoras dos agentes patogênicos ou dos eliciadores ligam-se às moléculas receptoras na planta ou fruto, desencadeando, a partir daí, diferentes respostas, como a hipersensibilidade, na qual as células adjacentes à lesão coalescem (AQUINO; MARCHESE, 2010), além da formação de calos, lignificação, acúmulo de ácido salicílico e produção de fitoalexinas (CAETANO, 2011).

#### 2.6.5 Substâncias elidoras

De acordo com Romeiro e Garcia (2009), respostas de defesa da planta podem ser induzidas por diferentes tipos de microrganismos em formas latentes, como vírus, bactérias, fungos e nematóides, que são chamados de eliciadores de origem biótica e, também, através de produtos químicos dos mais variados grupos, que constituem os eliciadores de origem abiótica.

Muitos estudos atuais que visam induzir as plantas a aumentar a produção de metabólitos específicos têm utilizado os eliciadores, que são compostos ou tratamentos, que simulam condições que alterem rotas metabólicas, afetando qualitativamente e/ou quantitativamente, a síntese de moléculas bioativas (XU et al., 2008; SIRCAR; MITRA, 2008; MANDAL; MITRA, 2007). O sucesso da elicitação na produção de metabólito secundário tem sido demonstrado por algumas pesquisas, utilizando-se eliciadores de origem biótica como os extratos de fungos patogênicos (MANDAL; MITRA, 2007) e de algas (CHANDÍA; MATSUHIRO, 2008), compostos como o jasmonato de metila e seus derivados (SHOHAEL et al., 2007; SIRCAR; MITRA, 2008), a quitosana (ZHANG et al., 2007), o ácido salicílico (LI et al., 2008; XU et al., 2008), e danos mecânicos (XU et al., 2008), bem como eliciadores abióticos, como modificações na concentração de CO<sub>2</sub> (ALI; HAHN; PAEK, 2005), luz ultravioleta, temperatura, potencial osmótico, e nutrição mineral (OLSEN et al., 2008, LIU; CHENG, 2008, XU et al., 2008).

As metodologias de aplicação de eliciadores que os estudos atuais apontam como economicamente viáveis e de valor, no estudo da bioquímica, e regulação dos metabólitos secundários, são as que utilizam o sistema hidropônico (DESCHAMPS; SIMON, 2006), culturas de suspensão celular (SHOHAEL et al., 2007; ZHANG et al., 2007; SIRCAR;

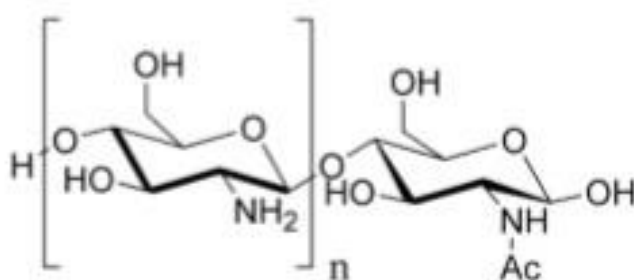


MITRA, 2008) e pulverização (XU et al., 2008). Devido a amplitude de concentrações utilizadas em função da forma de aplicação e da espécie estudada, torna-se de fundamental importância, investigar a atividade eliciadora sobre o metabolismo de plantas produtoras de metabólitos secundários de interesse econômico, visando a otimização do cultivo dessas espécies. Nesse contexto, quitosana se destaca como composto sinalizador de respostas de defesa sistêmica das plantas, por alterar de forma efetiva, a biossíntese de compostos secundários, no entanto, os modos de ação geralmente envolvem rotas multivariadas, que são específicas para cada vegetal.

### 2.6.6 Quitosana

Quitosana é um biopolímero hidrofílico formado por moléculas de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose, unidas por ligações glicosídicas (Figura 5). A maioria dos tipos comerciais de quitosana contém 70 - 100% de glucosamina e de 0-30% de unidades de N-acetilglucosamina (HUSSAIN; ABDEEN; HIFNI, 2009). A substância é solúvel em ácidos orgânicos diluídos como os ácidos acético, fórmico, succínico, láctico, tartárico, valérico, glicólico, cítrico e málico, também se dissolve em soluções diluídas de ácidos inorgânicos tais como os ácidos clorídrico e sulfúrico (HAFDANI; SADEGHINIA, 2011).

Figura 5 - Estrutura da quitosana.



Fonte: Rebeca et al. (2003).

É o elemento estrutural principal do exoesqueleto de insetos e crustáceos (MUZZARELLI, 1997) e encontrado nas paredes celulares de uma variedade de fungos (BITTELLI et al., 2001). Segundo Namdeo (2007), a quitosana é liberada pela ação de enzimas de plantas em paredes celulares microbianas. É industrialmente obtida por desacetilação alcalina da quitina (RABEA et al., 2003). É preparada comercialmente como um subproduto das cascas de camarões, caranguejos e lagostas (BITTELLI et al., 2001). A

quitosana também possui várias propriedades biológicas favoráveis, como baixa toxicidade além de ser biodegradável. É suscetível de sofrer degradação por várias enzimas específicas e não específicas, incluindo quitinases, quitosanases, lisozimas, celulasas, hemicelulasas, lipases e proteases, glucanases, e a sua baixa toxicidade foi também documentada em estudos com seres humanos (YLITALO et al., 2002). Possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra fungos filamentosos, leveduras e bactérias (KONG et al., 2010; HENÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2011; BADAWY; RABEA, 2011). Tudo isso devido a capacidade do polímero em estimular a resposta de defesa da planta (FAORO; IRITI, 2009). A atividade elicitora da quitosana foi demonstrada pela primeira vez na interação entre a ervilha (*Pisum sativum*) e o agente patogénico fúngico *Fusarium solani* (HADWIGER; BECKMAN, 1980). Palee et al. (2016), em seu trabalho com *Stemona* sob sistemas hidropônicos, constataram que a quitosana estimulou a produção de alcaloides. Assim, a quitosana pode ser definida como um tipo de eliciador que age diretamente no metabolismo secundário das plantas, estimulando a produção de metabólitos secundários específicos.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N. de. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. 1998. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 1998.
- ALAMINO, D. A. et al. Indução de resistência à podridão-amarga em maçãs pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 3, p. 249-254, 2013.
- ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. CO<sub>2</sub> induced total phenolics in suspension cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer roots: role of antioxidants and enzymes. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 43, p. 449-457, 2005.
- ANTONIAZZI, N.; DESCHAMPS, C. Análise de crescimento de duas cultivares de cevada após tratamentos com elicitores e fungicidas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1065-1071, 2006.
- AQUINO, J.V.N., MARCHESE, J.A. **Indução de resistência em plantas de morangueiro (*Fragaria vesca* L.) com uso dos eliciadores harpina e Acibenzolar-s metil em pré e pós colheita**. 2010. 102 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR. 2010.
- ARAUJO, A. G. et al. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Lavras, MG. v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.
- ARNALDOS, T. L. et al. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananassa*, c.v. *Chandler*) callus culture. **Physiologia Plantarum**, [S.l.], v. 113, n. 3, p. 315-322, 2001.
- BADAWY M. E. J.; RABEA E. I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, Alexandria, Egypt. v. 2011, p. 1-29, 2011.
- BITTELLI, M. et al. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Agricultural and Forest Meteorology**, Pullman, WA. v. 107, n. 3, p. 167– 175, 2001.
- BOONSNONGCHEEP. P. et al. Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, [S.l.], v.101, p.119–126, 2010.
- BROWN, C.M.; CAMPBELL, I.; PRIEST, F.G. *Introducción a la biotecnología*. Zaragoza, Espanha: Acribia S.A, 1989. 167 p.
- CAETANO, M.L. Vacinas, agora para as plantas. **Campo e Negócios HF**. Uberlândia, MG: **Agro Comunicação**. v. 74. Ano VII, p. 46-52. Julho, 2011.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF. v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002.

CAMATTI, S. V. et al. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, [S.l.], v.6, n.2, p.117- 122, 2011.

CAMPOS, V. C. A et al. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p. 639-644, 2013.

CHANDÍA, N. P.; MATSUHIRO, B. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 42, n. 3, p. 235-240, 2008.

CHEN, H.; CHEN, F. Effects of yeast elicitor on the grown and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. **Process Biochemistry**, [S.l.], v.35, p.837-840, 2000.

COLLA, L.M.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift fur Naturforschung**, [S.l.], v. 59c, p. 55-59, 2004.

CONCEIÇÃO, H. E. O. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris* sp.)**. 2000. 191 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2000.

CROTEAU, R. et al. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAM, B.B. et al. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: Courier Companies. 2000. p.1 250-1318.

DEL BAÑO, M.J. et al. Flavonoid distribution during the development of leaves, flower, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Alcantarilla, Murcia, Spain. v. 52, p. 4987-4992, 2004b.

DEL BAÑO, M.J. et al. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flower, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Alcantarilla, Murcia, Spain. v. 51, p.4247-4253, 2004a.

DESCHAMPS, C.; SIMON, J. E. Terpenoid essential oil metabolism in Basil (*Ocimum basilicum* L.) following elicitation. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, Illinois v. 18, n. 6, p. 618-621, 2006.

DINIZ, S.P.S.S. et al. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fungos fitopatogênicos, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 9-11, 2008.

DREYFUSS M. M.; CHAPELA I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, lowmolecular weight pharmaceuticals. In: GULLO, V. P. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994.

ECHEVERRIGARAY, S. et al. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 257-276 p.

FAORO F; IRITI M. Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens. **Caryologia**, v. 60, p. 121–124, 2009.

FERREIRA, L.S. **Estudo da intensidade luminosa no cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* Em reator tubular utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio por processo descontínuo alimentado**. 2008. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 2008.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E.A. Aplicação de cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In TORRES, A.C.; FILHO, W. B. et al. Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus Ilicifolia*. **Eclética Química**, v. 27, São Paulo, 2002. (Número Especial).

FLORES, R. et al. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006.

FRANÇA, S. C. de. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. Florianópolis: UFRGS; UFSC, p. 105-124, 2001.

FRANZ C.; NOVAK J. Sources of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Eds.) **Handbook of Essential Oils Science**. Technology, and Applications. New York, NY: CRC Press, 2010. p.39-81.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A. AND DE KLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture. The Background**, v. 1, n. 3 p. 501, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. **Química Nova**, v. 30, P. 374-81, 2007.

GOBERT, V.; MOJA S.; COLSON, M.; TABERLET, P. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 2017-2023. 2002.

GOMES, E.C.S.; PEREZ, J.O.; BARBOSA, J. Resistência induzida como componente do manejo de doenças da videira. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 2, p. 114- 120, maio/ago. 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 1, p. 183-260, 1998.

GRIEVE, M. **Mints Retrieved**. From: < <http://botanical.com/botanical/mgmh/m/mints-39.html>>. Acess: nov. 2013.

GRISI M.C.M. et al. 2006. Avaliação de genótipos de *Mentha* (Mentha spp) nas condições do Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v. 8, p. 33-39, 2006.

GUDES, J. P. S. et al. The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. **International Journal of Food Microbiology**. v. 238, p. 183–192, 5 December, 2016.

HADWIGER L.A.; BECKMAN J.M. Chitosan as a component of pea *F solani* interactions. **Plant Physiol**. v. 66, p. 2005–2011, 1980.

HAFDANI, F. N.; SADEGHINIA, N. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. World Academy of Science, **Engineering and Technology**, Oxford, v. 50, p. 252-256, 2011.

HAMEED, I. H.; et al.; Identification of five newly described bioactive chemical compounds in methanolic extract of *Mentha viridis* by using gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**. v. 7, n. 7, p. 107-125, July, 2015.

HENÁNDEZ-LAUZARDO A. N.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE MG; GUERRA-SÁNCHEZ MG. Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. **Afr J Microb Res**, v. 5, p. 4243–4247, 2011.

HUSSAIN, M. H. M.; ABDEEN, Z.; HIFNI, H. Chitosans production byproducts as valuable material. Venice: European Chitin Society, v. 5, 2009.

IAREMA, L. et al. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, n. 2, p. 227-238, 2012.

KHANUJA, S.P.S. et al. [Online]. **Mint plant mentha spicata l. var.viridis christened as 'ganga'**. 2005. Disponível em: <<http://www.freshpatents.com/Novel-mint-plant-menthaspicata-l--var-viridis-christened-as--ganga-- dt20050224ptan20050044600.php>>. Acesso em: 04 nov. 2016.

KONG M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of art review. **Int J Food Microb**, v. 144, p. 51–63, 2010.

LAWRENCE, B.M. Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. In: HARLEY, R.M.; REYNOLDS, T.(Eds.). **Advances in labiatae science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 399-436.

LI, X. et al. Effects of salicylic acid (SA), ultraviolet radiation (UV-B and UVC) on trans-resveratrol inducement in the skin of harvested grape berries. **Frontiers of Agriculture in China**, Verlage, v. 2, n. 1, p. 77-81, jan. 2008.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas**: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. 606 p.

- MAIA, N. B. **Produção e qualidade do óleo essencial de duas espécies de menta cultivadas em soluções nutritivas**. 1998. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, SP, 1998.
- MANDAL, S.; MITRA, A. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 71, n. 4-6, p. 201- 209, Oct./Dec. 2007.
- MANDAL, S.; MITRA, A. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 71, n. 4-6, p. 201- 209, Oct./Dec. 2007.
- MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1994. 220 p.
- MATKOWSKI, A. *In vitro* isoflavonoid production in callus from different organs of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi. **J. Plant Physiol.**, v. 161, p. 343-346, 2004.
- MARASCHIN, M.; VERPORTE, R. Engenharia do Metabolismo Secundário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 10, p. 24-28. 1999.
- MELO, J. T. et al. Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Espécies do Cerrado, p. 195-243. In: **Cerrado: Ambiente e flora**. EMBRAPA. Planaltina, DF. 1998. 556 p.
- MKADDEM M. et al. Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) Essential Oils. **J. Food Sci.**, v. 74, p. 358-363, 2009.
- MORAES, C. P. et al. Efeitos da escarificação química e da concentração de nitrogênio sobre a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr.(Orchidaceae: Vanilloideae). **Acta Botanica Brasílica**, p. 714-719, 2012.
- MOSCIANO, G. Organoleptic characteristics of flavor materials. In: PAULUS, D. et al. Rendimento de biomassa e óleo essencial de menta japonesa (*Mentha arvensis* L.) **Perfumer & Flavorist**, v. 30, n. 4, p. 52-67, 2005.
- MOTA, D. S. O.; RODRIGUES, V. G. **Plantas Medicinais**. Subprojeto Instalação de horto-matriz de plantas medicinais em Porto Velho-RO. Embrapa Rondônia. Folder 08 dezembro, 2001. (Série Plantas Medicinais).
- MÜLLER, R.S.; BREITKREUTZ, J.; GRONING, R. Interactions between aqueous *Hypericum perforatum* extracts and drugs: *in vitro* studies. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 1019-1023, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MURRAY, M.J.; FAAS, W.; MARBLE, P. Chemical composition of *Mentha arvensis* var. *piperascens* and four hybrids with *Mentha crispa* harvested at different times in Indiana and Michigan. **Crop Science**, v. 12, p. 742-5, 1972.

MUSARURWA, H. T.; KOEGELENBERG, L.; MAKUNGA, N. P. Variação química em perfis de óleos essenciais detectados através da espectrometria de cromatografia gasosa em microextração em fase sólida em resposta ao potássio, nitrogênio e água, disponível para plantas micropropagadas de *Salvia stenophylla* (Burch. Ex Benth.). **Journal of plant growth regulation**, v. 31, n. 2, p. 207-220, 2012.

MUZZARELLI, R. A. A. Some modified chitosans and their niche applications. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. **Chitin handbook**. Italy: Atec, 1997. p. 47-52.

NAMDEO, A. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy Reviews**, Bangalore, v. 1, n. 1, p. 69-79, 2007.

NITZSCHE, A. et al. Chemical and biological characterization of cinnamic acid derivatives from cell cultures of lavender (*Lavandula officinallis*) induced by stress and jasmonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2915-2923. 2004.

OLSEN, K. M. et al. Differential expression of four Arabidopsis PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental triggered flavonoid synthesis. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 14, p. 1491-1499, Sept. 2008.

PAGE, M.; STEARN, W. T. Hierbas para cocinar. Manuales Jardim Blume. **The Royal Horticultural Society.**, v. 61 p, 1992.

PALLE, J. et al., Effects of Chitosan and Salicylic Acid on Stemonal Alkaloid Production in Hydroponic Culture of *Stemona curtisii* Hook. f. **Chiang Mai J. Sci.** v. 43, n. 5, p. 1070-1076, 2016.

PASTERNAK, T. et al. Morphogenic Effects of Abiotic Stress: Reorientation of Growth in Arabidopsis thaliana Seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, n. 3, p. 299-314, 2005.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry** v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 3, p. 1457-1465, 2003.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M. et al. fosfito de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* kleb., em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 629-636, jul./ago., 2006.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F.A.O. **Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana**. Departamento de Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: UFV, 2009. 12 p.

SAKUTA, M. et al. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. **Physiologia Plantarum**, v. 71, n. 4, p. 459-463, 1987.



- SALDANHA, C.W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.
- SANDEEP B. P. Traditional uses of plants for wound healing in the Sangli district, Maharashtra. **Int J Pharm Tech Res.** v. 1, n. 3, p. 876-878, 2009.
- SANGANERIA S. Vibrant India. Opportunities for the flavor and fragrance industry. **Perfumer & Flavorist** v. 30, p.24-34, 2005.
- SCHULZ, V. **Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde.** Barueri: Manole, 2002. 386 p.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. **Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. Interação Planta Patógeno–fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.** Piracicaba: FEALQ, 2008. 227-248 p.
- SEON, J. H. et al. Influence of in vitro growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, n. 2, p. 135-142, 2000.
- SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba. Ed. Agropecuária. 463 p. Maraschin, M. e Verporte, R. Engenharia do Metabolismo Secundário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** v. 10, p. 24-28, 2001.
- SHOHAEL A. M. et al. Methyl jasmonate induced overproduction of eleutherosides in somatic embryos of *Eleutherococcus senticosus* cultured in bioreactors. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 10, n. 4, p. 633-637, Oct. 2007.
- SHOHAEL A. M. et al. Methyl jasmonate induced overproduction of eleutherosides in somatic embryos of *Eleutherococcus senticosus* cultured in bioreactors. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 10, n. 4, p. 633-637, Oct. 2007.
- SILANO, M. et al. The new European legislation on traditional herbal medicines: main features and perspectives. **Fitoterapia** v. 75, p. 107-116, 2004.
- SILVA, C. J. et al. Chemical composition and histochemistry of *Sphagneticola trilobata* essential oil. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 22, n. 3, p.482-489, 2012.
- SILVA, D.C.V. et al. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 607-610, 2011.
- SILVA, L. F.; et al.; Chemical Characterization, Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils of *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L. (L) **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 666-675, 2015.

SIRCAR D.; MITRA A. Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 4, p. 407-414, Apr. 2008.

SÔNEGO, et al. **Avaliação de fosfitos no controle do míldio da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003.

SOUZA, M.A.A. **Produção de biomassa e rendimento de óleos essenciais de plantas de hortelã (*Mentha piperita*) em cultivo hidropônico com diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo**. 2006. 87 P. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes Infect.** v. 5, p. 535-44, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TALBAOUI, A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 4593-4600, 2012.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1. 509 p.

TURNER, G.W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R.B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**. v. 124, p.655-663, 2000.

VAN BEUSICHEM, M. L.; KIRKBY, E. A.; BAAS, R. Influence of nitrate and ammonium nutrition and the uptake, assimilation and distribution of nutrient in *Ricinus communis*. **Plant Physiology**, v. 86, n. 3, p. 914-921, 1988.

VANISREE, M. et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Bot. Bull. Acad. Sin**, v. 45, n. 1, p. 1-22, 2004.

VÁZQUEZ-FLOTA, F. et al. A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus* in vitro cultures. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, n. 4, p. 591-595, 2009.

VERPOORTE, R. et al. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochem. Rev.**, v. 1, p. 3-25, 2002.

WERNER, E. T. et al. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Bot Bras**, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

XU, F. et al. Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba*. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 7, n. 6, p. 721-729, Mar. 2008.

YLITALO R. et al. Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. **Arzneimittelforschung**. v. 52, p. 1-7, 2002.

ZHANG, C. H. et al. Enhanced paclitaxel productivity and release capacity of *Taxus chinensis* cell suspension cultures adapted to chitosan. **Plant Science**, Limerick, v. 172, n. 1, p. 158-163, Jan. 2007.

ZHANG, L. et al.; Antibacterial Activity and Mode of Action of *Mentha arvensis* Ethanol Extract against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v. 14, n. 11, p. 2099-2106, 2015.

## CAPÍTULO 2

Influência da taxa de nitrato e amônia no crescimento e na produção de compostos voláteis *in vitro* de *Mentha arvensis* L. e *M. viridis* L.

### RESUMO

Dentre a vasta gama de plantas medicinais existentes o gênero *Mentha* é um dos mais conhecidos e utilizados, com aplicações farmacêuticas, cosméticas, alimentícia, dentre outras. Como forma de propagar e direcionar a produção de compostos de interesse em plantas medicinais tem-se a micropropagação. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da taxa de nitrato e amônia, no crescimento, na produção de pigmentos fotossintéticos e composição do óleo essencial *in vitro* de *Mentha arvensis* e *M. viridis*. Foram montados dois experimentos, um com *Mentha arvensis* e outro com *M. viridis*, ambos nas mesmas condições de cultivo. Segmentos nodais de aproximadamente 1,00cm de comprimento foram inoculados em 15 mL de meio MS semi sólido com 6g/L de ágar. As taxas de NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub> foram T1 1/1; T2 1,4/1; T3 2/1; T4 3/1; T5 5/1, T6 11/1 e T7 somente NO<sub>3</sub>. Posteriormente foram cultivados por 30 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h de luz. Ambas as espécies de um modo geral, tiveram maior acúmulo de biomassa seca na taxa 11/1 de nitrato e amônio. Quando a fonte fornecida foi somente NO<sub>3</sub>, elas não se desenvolveram bem, sendo necessário se acrescentar o NH<sub>4</sub> ao meio. Em *Mentha arvensis*, o tratamento 1,4/1 produziu maiores valores dos pigmentos para clorofila *a*, *b* e total. O tratamento com somente NO<sub>3</sub> quantificou maiores pigmentos de clorofila *b* e total, e carotenoides. A partir do tratamento 3/1, houve uma tendência linear crescente de mentol e decrescente de pulegona. Em *Mentha viridis*, o tratamento com somente NO<sub>3</sub>, proporcionou mais pigmentos para clorofila *a* e total, a clorofila *b* teve melhor resposta na taxa 11/1, e os carotenoides em 1/1. Houve uma queda acentuada do carvona e aumento do linalol e hidrato de sabineno com a taxa 11/1.

**Palavras chave:** Menta. Nitrogênio. *In vitro*. Micropropagação.

Influence of the nitrate and ammonia rate on the growth and production of in vitro volatile compounds of *Mentha arvensis* L. and *M. viridis* L.

### ABSTRACT

Among the wide range of medicinal plants existing, the genus *Mentha* is one of the most known and used with pharmaceutical applications, cosmetics, food among others. Micropropagation is a way of propagating and directing the production of compounds of interest in medicinal plants. The present study aimed to verify the effect of the nitrate and ammonia rate on growth, on the production of photosynthetic pigments and composition of the essential oil in vitro of *Mentha arvensis* and *M. viridis*. Two experiments were set up, one with *Mentha arvensis* and another with *M. viridis*. Nodal segments of approximately 1.00 cm in length were inoculated into 15 mL of semi solid MS medium with 6 g / L agar. Rates of NO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub> were T1 1/1; T2 1.4 / 1; T3 2/1; T4 3/1; T5 5/1, T6 11/1 and T7 only NO<sub>3</sub>. Later they were cultivated for 30 days in a growth room with photoperiod of 16h of light. Both species had a greater accumulation of dry biomass at the rate of 11/1 nitrate and ammonium. When the source supplied was only NO<sub>3</sub>, they did not develop well, it was necessary to add NH<sub>4</sub> to the medium. In *Mentha arvensis*, the 1.4 / 1 treatment produced higher pigment values for chlorophyll a, b and total. The treatment with only NO<sub>3</sub> quantified larger pigments of chlorophyll b and total, and carotenoids. From the 3/1 treatment, there was an increasing linear trend of menthol and decreasing pulegone. In *Mentha viridis*, treatment with only NO<sub>3</sub> provided more pigments for chlorophyll a and total, chlorophyll b had better response at the 11/1 rate, and carotenoids at 1/1. There was a sharp fall of carvone and increase of linalool and sabinene hydrate at the rate 11/1.

**Key words:** Mint. Nitrogen. *In vitro*. Micropropagation

## 1 INTRODUÇÃO

A *Mentha* pertence à família da Lamiaceae e compreende cerca de 25 espécies. Essas plantas são originárias da Europa, e por isso, suportam temperaturas muito baixas, porém, também são bem adaptadas ao clima tropical (SOUZA et al., 2007).

São popularmente conhecidas como hortelã, muito utilizadas na ‘medicina popular’ para combater a fadiga em geral, além de função digestiva, anti-cólicas, afecções hepáticas, bronquite crônica, dentre outras enfermidades, sendo também empregadas como calmante, revitalizante, antidepressivo, antialérgico, carminativo, hipotensor, tônico em geral e antiespasmódico (CASSOL et al., 2007).

Atualmente, há um grande interesse pelo gênero, devido a importância comercial de seu óleo essencial, que é o mais comercializado do mundo, rico em monoterpenos. Dentre suas aplicações temos saborizantes de alimentos, perfumaria, confeitaria, fabricação de pasta de dente, além de utilizações na indústria farmacêutica (CHOUDHURY; GARG; KUMAR, 2006).

A biossíntese dos metabólitos secundários, presente nos óleos essenciais, é controlada principalmente pela variação genética, porém, fatores ambientais como luz, temperatura, estação do ano, além das práticas de cultivo como manejo, irrigação, nutrição, tempo de colheita, também influenciam fortemente a composição da fração volátil (KARA, 2015). O ambiente e o tipo de cultivo em que o vegetal se desenvolve influenciam diretamente no crescimento e na produção de biomassa, além de interferir na composição química dos óleos essenciais (DAVID et al., 2006).

Entre as formas de propagação das espécies, temos a micropropagação. Esta é uma técnica de multiplicação vegetal, que é muito utilizada em plantas medicinais, que consiste em inocular explantes, em meio de cultura, em condições assépticas, com o objetivo de regenerar e multiplicar a espécie, para se obter uma planta completa, com todas as características da planta mãe (MELO et al., 1998). Esse cultivo se baseia na totipotencialidade, princípio proposto por Haberlandt, que em 1902, descobriu que cada célula vegetal tinha capacidade genética para regenerar uma planta completa (FLORES, 2006).

Dentre os meios de cultivo *in vitro*, o meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) é o mais utilizado para a propagação da maioria das espécies herbáceas em cultura de tecidos, e um dos principais nutrientes presente no meio é o Nitrogênio.

O nitrogênio é um macronutriente muito importante, estando associado com o controle do crescimento, diferenciação e morfogênese. Além disso, ele é constituinte de várias biomoléculas essenciais, como aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outros (SAKUTA et al., 1987). De acordo com Rioba et al. (2015) e Chrysargyris et al. (2016), o nitrogênio pode influenciar de forma positiva ou negativa, o acúmulo de biomassa vegetal, o rendimento, o teor e a qualidade do óleo essencial.

O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contém dois sais de nitrogênio, o nitrato de amônio ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ) e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), totalizando uma concentração de 60 mM de nitrogênio total. Já foi constatado que as espécies de plantas diferem quanto a preferência pelas formas de N amoniacal ou nítrica. Uma nutrição balanceada de N, incluindo  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , pode gerar melhores rendimentos das culturas em relação à disponibilidade de apenas uma das fontes nitrogenadas (BRITTO; KRONZUNKER, 2002).

A utilização de amônio e de nitrato de forma balanceada na micropropagação de *Rubus* spp. cultivada *in vitro*, promoveu desenvolvimento adequado das mudas, entretanto, observa-se que concentrações elevadas de N no meio de cultivo são tóxicas às plântulas (VILLA et al., 2009).

Embora a maioria das plantas apresentem sintomas de toxidez quando o nitrogênio é disponibilizado, somente na forma de sais inorgânicos de amônio, Rodrigues et al. (2011), verificaram que este fato não acontece com plantas de *Cattleya loddigesii*, cultivadas *in vitro*. Já em *Salvia officinalis* L, o efeito foi contrário, o fornecimento de N em sistemas hidropônicos, na forma amoniacal, reduziu a produção de biomassa da planta (RODRIGUES et al., 2016).

A *Mentha piperita* apresentou melhor produtividade tanto em seu desenvolvimento quanto em seu óleo essencial, quando cultivada com 50% da quantidade de N fornecida (DAVID et al., 2014). Outro trabalho com *Salvia officinalis* L. em campo, mostrou que o nitrogênio afetou consideravelmente a produção de  $\beta$ -pineno,  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona (RIOBA et al., 2015).

Considerando o exposto, o objetivo deste estudo, foi verificar qual a melhor taxa de nitrogênio no crescimento e desenvolvimento, produção de pigmentos fotossintéticos e composição do óleo essencial de *Mentha arvensis* e *M. viridis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises químicas da fração volátil foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA, em Lavras-MG. A quantificação dos pigmentos fotossintéticos foi realizada no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas (Departamento de Biologia UFLA).

### 2.1 Fase de estabelecimento

Estolões de plantas matrizes de *Mentha arvensis* e *M. viridis* do Horto de Plantas Medicinal do DAG/UFLA, foram coletados e cultivados em substrato comercial em bandeja de isopor com 128 células para o crescimento das plantas. O material de propagação foi mantido em casa de vegetação até produzirem número suficiente de explantes que possibilitasse o início do estabelecimento.

Segmentos nodais foram utilizados como explantes para estabelecer as culturas primárias. Os segmentos foram cortados em tamanho aproximado de 1 cm com o auxílio de uma lâmina e lavados abundantemente com água corrente e sabão neutro. Em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50% e mantidos sob agitação constante, por 15 minutos, seguido de cinco lavagens em água destilada e autoclavada, sob capela de fluxo laminar.

Após a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio  $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 15 g/L de sacarose com pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, sob intensidade luminosa de  $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , à temperatura de  $26 \pm 1$  °C.

Depois de estabelecidas, as plântulas foram multiplicadas a cada 30 dias, no mesmo meio do estabelecimento e mantidas nas mesmas condições de cultivo para formação de um estoque de plântulas que foram usadas nos experimentos.

Plântulas estabelecidas *in vitro* em meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 30 dias foram utilizadas como fonte de explante para a realização dos experimentos.



## 2.2 Condições gerais dos experimentos

Para a realização deste trabalho, foram montados 2 experimentos descritos a seguir, um com *Mentha arvensis* e o outro com a *Mentha viridis*. Todos os experimentos tiveram as mesmas condições de cultivo. O meio de cultura foi solidificado com 6 g/L de ágar, o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . Após o preparo, o meio foi autoclavado a  $120^\circ\text{C}$  e 1 atm, por 20 minutos. Depois da inoculação, os tubos contendo 15mL de meio, foram fechados com tampas plásticas, mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro, sob intensidade luminosa de  $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , à temperatura de  $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

Aos 30 dias foram avaliados o número de brotos, número de folhas, altura média das brotações, comprimento da maior raiz, biomassa seca da parte aérea, biomassa seca da raiz, biomassa seca total, assim como a composição da fração volátil e a quantificação de pigmentos fotossintéticos. A altura da brotação e o comprimento das raízes foram determinados com o auxílio de uma régua. Para a altura, a medição foi feita da base da brotação até a gema apical. Para a determinação da biomassa seca, os caules, as folhas e as raízes foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a  $37^\circ\text{C}$ , até peso constante. Após esse período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

## 2.3 Composição dos experimentos

Os tratamentos constavam de diferentes concentrações das soluções estoque A ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ) e B ( $\text{KNO}_3$ ), adicionadas ao meio MS, que são onde se encontram as fontes nitrato e amônio. A concentração total de N, foi mantida a 60mM. A variação das taxas de nitrogênio foi realizada segundo o quadro abaixo:

Quadro 1 – Relação das fontes de nitrogênio

<b>NO<sub>3</sub> (mM)</b>	<b>NH<sub>4</sub> (mM)</b>	<b>N total (mM)</b>	<b>Relação NO<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub></b>
30	30	60	1,0
35	25	60	1,4
40	20	60	2,0
45	15	60	3,0
50	10	60	5,0
55	5	60	11,0
60	0	60	Somente NO <sub>3</sub>

Fonte: Da autora (2016).

Cada experimento continha 7 tratamentos, com 5 repetições, 4 tubos por repetição, cada tubo com 15mL de meio, contendo um explante, dispostos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC).

## 2.4 Quantificação dos pigmentos fotossintéticos

A extração e quantificação das clorofilas *a* e *b*, e carotenóides, foram realizadas segundo a metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001). Amostras de 0,2g da matéria fresca das folhas foram homogeneizadas em 40 mL de acetona 80%, seguida da leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 663, 645, e 470 nm, respectivamente. Os procedimentos foram realizados na ausência de luz para evitar a degradação dos pigmentos. Os valores foram obtidos em miligrama de pigmento por grama de matéria fresca.

## 2.5 Análise química da fração volátil

As análises químicas da fração volátil foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A, acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 e V, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z*.

Para extração da fração volátil empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System* (CTC Analytics AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de

otimização das condições operacionais, estabeleceu-se 30 min de incubação das amostras a 110 °C, e a temperatura da seringa foi programada para 120 °C. Folhas foram coletadas de plântulas cultivadas *in vitro* e secas em estufa de circulação de ar a 37 °C. Alíquotas de 20 mg de folhas secas, em triplicatas, que foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE até a análise; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-WAX (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As temperaturas do injetor e da linha de transferência para o EM foram mantidas em 230°C, seguido por uma rampa de temperatura de 3° C/min até 100, seguida de uma rampa de 15° C/min até 220°.

Os componentes foram identificados por comparação de seus tempos de retenção relativos e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007).

## **2.6 Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, pelo teste F ( $p < 0,05$ ), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o software Sisvar<sup>®</sup>, versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para *Mentha arvensis*, todas as variáveis de crescimento foram significativas, exceto o número de folhas. Maior número de brotos foi encontrado nas proporções 2/1, 5/1, e somente  $\text{NO}_3$  como fonte de nitrogênio (Tabela 1). Rodrigues et al. (2011), obtiveram resultados semelhantes em sua pesquisa com *Cattleya loddigesii* cultivada *in vitro*, a dosagem de 50%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e de 67% de  $\text{KNO}_3$ , proporcionou maior número de brotações. Assim, maiores doses de nitrato podem estimular a brotação.

A quantidade de folhas não teve diferença significativa (Tabela 1). O maior comprimento dos brotos ocorreu com a aplicação de 55mM de  $\text{NO}_3$  e 5 mM de  $\text{NH}_4$  (taxa de 11/1) (Tabela 1). Guimarães e Neves (2014) relataram que o *Eucalyptus urophylla* cultivado em meio hidropônico, com diferentes proporções de nitrato e amônia, obteve maior comprimento quando fornecidas as proporções de 25/75% de amônia e nitrato respectivamente.

Já o número de raíz foi mais expressivo nas menores taxas de  $\text{NO}_3/\text{NH}_4$  (1/1, 1,4/1, e 2/1) (Tabela 1), enquanto que os maiores comprimentos das mesmas tiveram comportamento oposto, sendo maiores nas maiores proporções de  $\text{NO}_3/\text{NH}_4$  (somente  $\text{NO}_3$ , 5/1 e 11/1) (Tabela 1). Esses dados corroboram com os obtidos por Zanin et al. (2015), em que o maior crescimento de raiz em plantas de *Oryza sativa* cultivadas em sistema hidropônico sob diferentes proporções de amônio e nitrato, apresentaram melhor resposta quando foi utilizado somente nitrato no meio de cultivo.

Tabela 1 - Desenvolvimento de *Mentha arvensis* e *M. viridis* cultivadas sob diferentes taxas de nitrogênio - 1/1; 1,4/1; 2/1; 3/1; 5/1, 11/1 e somente NO<sub>3</sub> (NB - número de brotos, NF - número de folhas, CPA - comprimento da parte aérea, NR - número de raízes, CMR - comprimento da maior raiz).

<i>Mentha arvensis</i>					
NO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> (mM)	NB	NF	CPA	NR	CMR
30/30	1,25 b	10,65 a	4,83 e	4,25 a	5,33 d
35/25	1,15 b	10,40 a	7,34 c	4,37 a	5,45 d
40/20	1,60 a	10,24 a	6,36 d	4,38 a	4,43 c
45/15	1,20 b	10,58 a	8,66 b	3,67 b	4,73 c
50/10	1,50 a	09,70 a	6,10 d	2,95 c	6,23 a
55/5	1,25 b	10,10 a	9,45 a	3,17 b	6,03 b
60/0	1,40 a	10,55 a	4,41 e	3,70 b	6,33 a
<b>CV(%)</b>	<b>17.47</b>	<b>5.18</b>	<b>7.20</b>	<b>6.21</b>	<b>2.90</b>
<i>Mentha viridis</i>					
NO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> (mM)	NB	NF	CPA	NR	CMR
30/30	1,52 a	9,88 a	07,46 d	2,25 b	5,33 c
35/25	1,35 a	9,02 b	10,41 b	2,52 b	5,10 c
40/20	1,40 a	9,94 a	12,16 a	3,68 a	6,88 a
45/15	1,25 a	9,37 b	12,24 a	3,53 a	5,89 b
50/10	1,15 a	9,60 a	09,17 c	3,31 a	5,55 b
55/5	1,55 a	9,75 a	04,61 e	3,52 a	5,84 b
60/0	1,35 a	9,0 b	05,38 e	2,45 b	5,30 c
<b>CV(%)</b>	<b>17.96</b>	<b>4.49</b>	<b>8.26</b>	<b>11.97</b>	<b>5.31</b>

\*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2017).

Em *Mentha viridis*, para os mesmos parâmetros avaliados, todos apresentaram diferenças significativas, exceto para o número de brotos.

Observa-se que todos os demais parâmetros (número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raiz e comprimento das brotações) foram melhores com a taxa de nitrato e amônio de 2/1, (Tabela 1), que compreende a concentração original do meio M.S. O aspecto geral das plântulas cultivadas nas diferentes taxas de nitrato e amônio é apresentado na Figura 1.

Foi constatado que as espécies têm comportamentos diferentes quanto à preferência pelas formas de N amoniacal ou nítrica, entretanto uma nutrição balanceada de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pode promover maiores rendimentos das culturas do que se tivesse à disponibilidade de apenas uma das fontes nitrogenadas (BRITTO; KRONZUNKER, 2002). Quando o nitrogênio é fornecido apenas na forma de nitrato, ocasiona o aumento do pH do meio. A fim de evitar este fato deve-se suprir o meio em mistura balanceada de cátions e ânions, sendo indicado

fornecer nitrato nas formas  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3$  (ASHER; EDWARDS, 1983). A absorção e assimilação das duas formas de nitrogênio promovem um equilíbrio cátion e ânion dentro da planta (RAVEN; SMITH, 1976; BLOOM, 1994).

Figura 1 - Aspecto da *Mentha arvensis* e *Mentha viridis* cultivada sob diferentes taxas de nitrogênio e amônio.



Fonte: Da Autora (2016).

Para os dados de biomassas secas em *Mentha arvensis*, as taxas de  $\text{NO}_3/\text{NH}_4$  de 2/1; 11/1 e somente  $\text{NO}_3$ , proporcionaram maior acúmulo de biomassa seca presente na parte aérea que foi influenciada diretamente pela massa contida nas folhas, representando mais de 50% da biomassa da parte aérea (Tabela 2). Já os tratamentos com proporção 2 a 5 ( $\text{NO}_3$ ) para 1 ( $\text{NH}_4$ ), apresentaram maior acúmulo de massa seca no sistema radicular. De acordo com esses

resultados, pode-se inferir que a *Mentha arvensis* tem preferência pelo nitrogênio na forma de  $\text{NO}_3$ . Entretanto, observou-se pelas biomassas secas, que não há necessidade de uma maior taxa de nitrato e amônio acima de 2/1, que corresponde à concentração original do meio M.S.

Tabela 2 - Crescimento de *Mentha arvensis* e *M. viridis* cultivadas sob diferentes taxas de nitrogênio- 1/1; 1,4/1; 2/1; 3/1; 5/1, 11/1 e somente  $\text{NO}_3$  (BSF - biomassa seca da folha, BSR - biomassa seca da raiz, BSPA - biomassa seca da parte aérea, BST - biomassa seca total).

<i>Mentha arvensis</i>				
$\text{NO}_3/\text{NH}_4$ (mM)	BSF (mg)	BSR(mg)	BSPA(mg)	BST(mg)
30/30	40,92 b	09,58 d	57,80 c	108,30 c
35/25	36,62 c	16,10 b	56,88 c	109,60 c
40/20	48,38 a	21,20 a	75,70 a	145,28 a
45/15	41,52 b	19,08 a	53,48 c	114,06 c
50/10	44,22 b	20,18 a	68,36 b	132,76 b
55/5	49,58 a	15,68 b	76,20 a	141,46 a
60/0	52,54 a	11,94 c	69,40 b	133,88 b
CV(%)	6.87	8.99	7.64	6.07
<i>Mentha viridis</i>				
$\text{NO}_3/\text{NH}_4$ (mM)	BSF (mg)	BSR(mg)	BSPA(mg)	BST(mg)
30/30	45,92 a	5,60 e	58,62 c	110,16 c
35/25	47,46 a	9,36 d	76,06 a	132,84 b
40/20	43,26 b	12,80 c	66,70 b	122,76 b
45/15	42,10 b	15,58 c	68,82 b	126,50 b
50/10	36,92 c	14,02 c	54,98 c	105,92 c
55/5	48,76 a	22,38 a	74,00 a	145,12 a
60/0	44,72 b	18,32 b	43,72 d	106,76 c
CV(%)	5.98	11.62	7.58	6.47

\*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2017).

Rodrigues et al. (2011), em seu trabalho *in vitro* com *Cattleya loddigesii*, obtiveram melhores resultados de massa fresca no tratamento sem a presença da amônia, sendo também o nitrato, a forma preferencial de absorção pela plântula. Esses dados corroboram com os de Silva et al. (2001), que estudando fontes de nitrogênio no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto ‘Trifoliata’, concluíram que melhores resultados são obtidos com 75% da fonte  $\text{KNO}_3$  associada com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  para altura e massa das brotações dos explantes.

A *Salvia officinalis* L, teve comportamento parecido quando o fornecimento de N ocorreu na forma amoniacal, em sistema hidropônico, a produção de biomassa da planta foi reduzida (RODRIGUES et al., 2016). Estes dados são opostos dos encontrados em outro trabalho de hidroponia, com plantas de *Eustoma grandiflorum* onde as mesmas preferem a amônia como fonte de N. Mendoza-Villareal et al. (2015), concluíram que a proporção de

75% de  $\text{NH}_4^+$  em relação ao  $\text{NO}_3^-$  aumentou a produção de matéria seca da raiz e da parte aérea das plantas.

A relação amônio e nitrato influencia o metabolismo do nitrogênio e a absorção de nutrientes (HELALI et al., 2010), a síntese de hormônios (LI et al., 2014) e a fotossíntese (BITTSÁNSZKY et al., 2015), com reflexos na produção de matéria seca das plantas.

Em *Mentha viridis*, para todos os parâmetros de biomassa seca, a taxa de nitrato e amônia de 11/1 foi onde se obteve maior ganho (Tabela 2). Apesar dessa taxa não ter sido a melhor para os parâmetros de número e comprimento (Tabela 1).

Quando a fonte fornecida foi somente o  $\text{NO}_3$ , houve uma queda considerável no acúmulo de biomassa das plântulas (Tabela 2). Com isso, pode-se dizer que a plântula necessita do amônio, mesmo que em pequenas proporções, para o seu desenvolvimento. Fernandes et al., (2011), constataram que pode-se aplicar menores doses de  $\text{KNO}_3$  para a propagação *in vitro* de teca *Tectona grandis L.f.* Se as plantas absorvem grandes quantidades de  $\text{NO}_3^-$ , a excreção de ânions  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{OH}^-$ , e ânions orgânicos pelas raízes é aumentada, conseqüentemente, isso faz com que aumente a absorção de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ . Já o excesso de  $\text{NH}_4^+$ , tem efeito contrário e abaixa o pH do meio, com isso diminui a absorção de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , e aumenta a dos ânions  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^-$  e  $\text{Cl}^-$ . Isso ocorre devido à exudação de  $\text{H}^+$  pelas raízes, para manter o equilíbrio catiônico dentro da planta (HALVIN et al., 2005).

Os parâmetros de produção de pigmentos fotossintéticos em *Mentha arvensis*, apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3). Observou-se que a taxa de nitrato e amônio de 1,4 produziu maior pigmento para clorofila a, b e total.

Nota-se que apenas a fonte de nitrato obteve maior pigmento em clorofila b, total e carotenoides. Já um trabalho com *Araucaria angustifolia* obteve maiores quantidades de clorofila a, b e total, quando aplicadas a amônia como fonte de nitrogênio (GARBIN; DILLENBURG L, 2008).



Tabela 3 - Produção de pigmentos fotossintéticos de *Mentha arvensis* e *M. viridis* cultivada sob diferentes fontes de nitrogênio - 1/1; 1,4/1; 2/1; 3/1; 5/1, 11/1 e somente NO<sub>3</sub> (unidade de medida: miligrama de pigmento por grama de matéria fresca)

<i>Mentha arvensis</i>				
NO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> (mM)	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila total	Carotenóides
<b>30/30</b>	0,37 d	0,36 b	0,73 c	0,52 a
<b>35/25</b>	0,68 a	0,63 a	1,32 a	0,36 b
<b>40/20</b>	0,37 d	0,15 d	0,52 d	0,37 b
<b>45/15</b>	0,10 f	0,28 c	0,38 e	0,17 c
<b>50/10</b>	0,28 e	0,24 c	0,53 d	0,40 b
<b>55/5</b>	0,49 c	0,39 b	0,87 b	0,50 a
<b>60/0</b>	0,59 b	0,68 a	1,27 a	0,52 a
<b>CV(%)</b>	<b>12,49</b>	<b>17,01</b>	<b>10,20</b>	<b>14,59</b>
<i>Mentha viridis</i>				
NO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> (mM)	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila total	Carotenóides
<b>30/30</b>	1,10 b	0,47 b	1,57 b	0,80 a
<b>35/25</b>	0,99 c	0,39 c	1,38 c	0,58 b
<b>40/20</b>	0,85 c	0,30 d	1,15 d	0,42 c
<b>45/15</b>	0,91 c	0,37 c	1,29 c	0,46 c
<b>50/10</b>	0,92 c	0,49 b	1,41 c	0,57 b
<b>55/5</b>	0,57 d	0,59 a	1,16 d	0,49 c
<b>60/0</b>	1,40 a	0,51 b	1,90 a	0,60 b
<b>CV(%)</b>	<b>7,98</b>	<b>13,60</b>	<b>8,12</b>	<b>13,01</b>

\*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

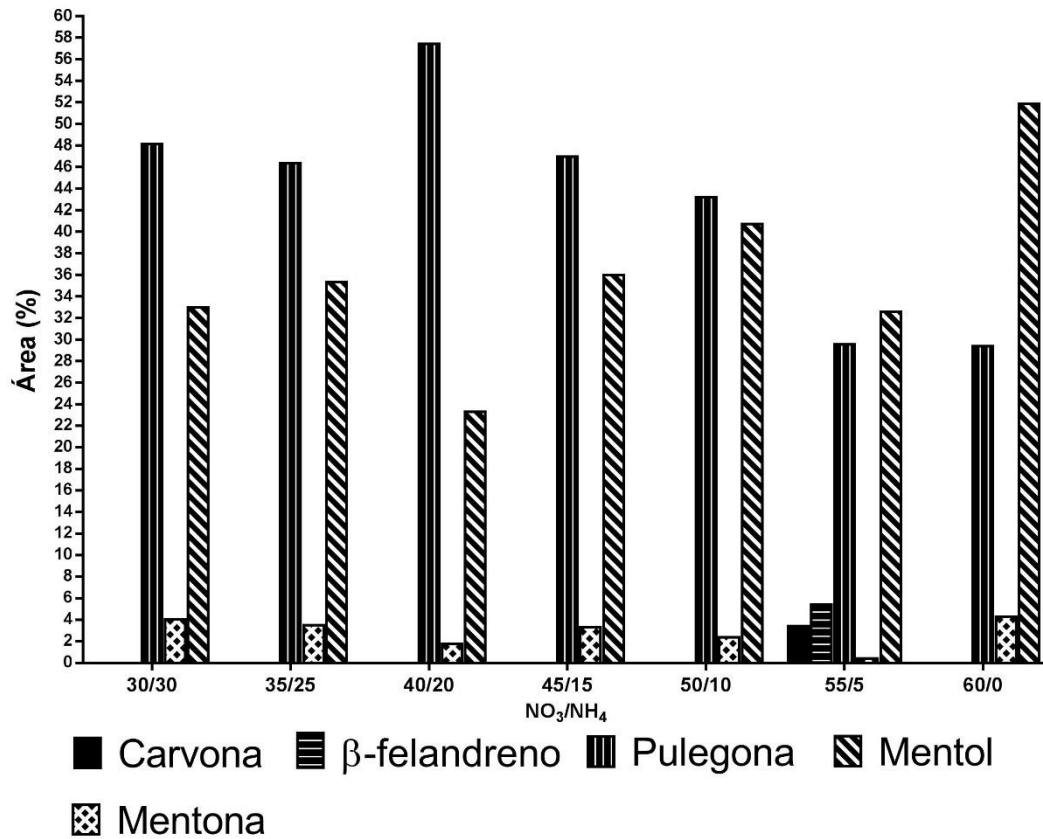
Fonte: Da autora (2017)

Em *Mentha viridis*, a produção de pigmentos fotossintéticos apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3). Observa-se que a clorofila a, e total, foi maior com a fonte apenas de nitrato, clorofila b no tratamento 11/1 e carotenóides em proporções iguais de NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub> (Tabela 3). De acordo com Abbaszadeh et al. (2009), o N está relacionado com a síntese proteica da clorofila, acarretando ou não, a redução da capacidade fotossintética, e o acúmulo de carotenoides pode ser um sinal de estresse. É importante ressaltar que o N se integra na estrutura molecular das plantas, e atua em alguma etapa das reações de síntese desses pigmentos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Gil et al. (2002) afirmam que a concentração de clorofila das folhas acompanha a concentração de N foliar, já que 70% do N contido nas folhas, estão presentes nos cloroplastos que participam da estrutura e da síntese das moléculas de clorofila.

As concentrações de nitrato e amônio influenciaram a área relativa dos compostos. Em *Mentha arvensis*, foram identificados de 14 a 16 compostos com uma área relativa variado de 96,71 até 98,95% (Tabela 4). Os compostos β-felandreno e Carvona foram encontrados somente na taxa de nitrato e amônio de 11/1. Observa-se que houve uma tendência linear

crecente de mentol, quando as taxas de nitrato e amônio eram superiores a 3/1 e decrescente de pulegona. A mentona permaneceu mais contínua (FIGURA 2).

Figura 2 - Compostos majoritários de *Mentha arvensis*, cultivada *in vitro* sob diferentes taxas de nitrogênio- 1/1; 1,4/1; 2/1; 3/1; 5/1, 11/1 e somente NO<sub>3</sub>.



Fonte: Da Autora (2017).

Tabela 4 - Constituintes voláteis de plântulas de *Mentha arvensis* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes taxas de nitrogênio- 1/1; 1,4/1; 2/1; 3/1; 5/1, 11/1 e somente NO<sub>3</sub>. Lavras, 2016.

Constituintes	RT	1NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	1,4NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	2,0NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	3,0NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	5,0NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	11,0NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	Apenas NO <sub>3</sub>
α-pineno	3,76	2,31	2,07	2,62	2,07	2,23	2,08	1,95
Sabineno	4,66	0,70	0,68	0,72	0,63	0,68	1,07	0,62
β-pineno	4,72	1,66	1,45	1,82	1,48	1,57	1,45	1,37
Mirceno	5,12	0,90	0,89	0,90	0,89	0,88	1,34	0,98
3-octanol	5,24	0,46	0,54	0,45	0,41	0,47	1,26	0,41
Limoneno	6,16	3,20	2,76	3,11	2,73	2,25	3,92	3,80
β-felandreno	7,39	nd	nd	nd	nd	nd	5,53	nd
Butirato de linalila	8,59	0,52	0,57	0,53	0,56	0,61	9,85	0,57
<i>Iso</i> -pulegol	10,19	0,68	0,68	0,77	0,63	0,58	0,38	0,51
Mentona	10,51	4,16	3,63	1,86	3,41	2,52	2,52	4,43
<i>Iso</i> -mentona	10,92	0,68	0,24	0,17	0,39	0,78	0,56	1,22
Mentol	11,32	33,09	35,46	23,43	36,09	40,86	32,73	52,00
<i>Iso</i> -pulegona	11,41	0,63	0,58	1,00	0,62	0,58	0,35	0,14
Pulegona	13,97	48,25	46,46	57,57	47,1	43,35	29,70	29,52
Carvona	14,12	nd	nd	nd	nd	nd	3,55	nd
β-cariofileno	18,53	0,25	0,26	0,19	0,261	0,23	0,41	0,29
Constituintes identificados (%)	-	14	14	14	14	14	16	14
Número de constituintes	-	97,48	96,71	98,95	97,27	97,58	97,70	97,81
Monoterpenos (%)	-	96,25	95,35	97,78	96,04	96,27	86,18	96,54
Sesquiterpenos (%)	-	0,25	0,26	0,19	0,26	0,23	0,41	0,29

RT : Tempo de retenção; Nd: Não detectado.

Fonte: Da Autora (2017).

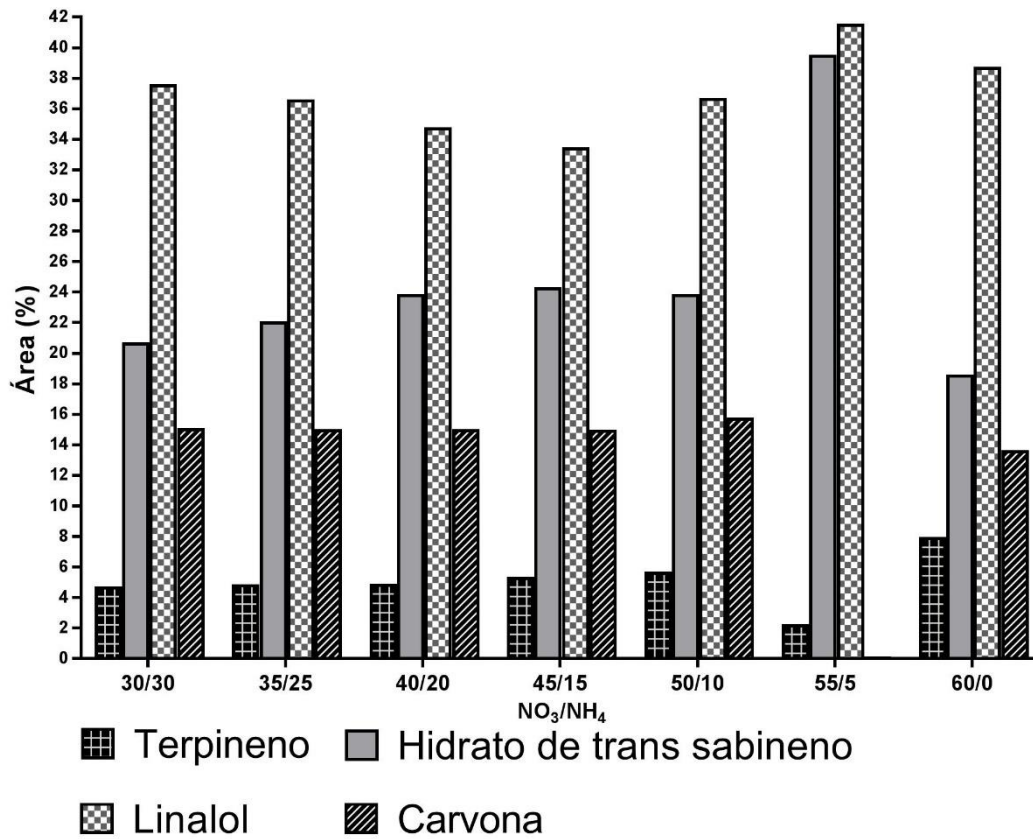
Na rota biossintética, a pulegona é convertida para mentona e depois para mentol. Isto demonstra que maiores concentrações de nitrato no meio de cultura, a pulegona é convertida para mentol e em taxas menores a conversão é menor. Outro fator importante de se observar é que o tratamento com somente nitrato foi o que obteve a maior área de mentol, e esse mesmo tratamento também proporcionou o maior acúmulo de biomassa seca da folha, que é o farmacógeno utilizado da planta.

Estudos indicam que o principal determinante na produção de monoterpenos em *Mentha* seja a taxa de biossíntese, definida pelos níveis regulados de desenvolvimento das enzimas biossintéticas responsáveis e seus substratos correspondentes (TURNER et al., 2000). Isso foi constatado por Gershenzon et al. (2000), que verificaram a existência de correlação entre as atividades *in vitro* e *in vivo* para oito enzimas da biossíntese do mentol.

Trabalhos com *Mentha piperita*, descobriram que para a síntese de seu óleo essencial, a pulegona é a precursora do mentol que é um dos compostos considerados mais significativos dos óleos de *Mentha spp* (MAHMOUD; CROTEAU, 2003). É possível que as concentrações das fontes de N, atuem de forma a influenciar as atividades enzimáticas envolvidas na produção do mentol, favorecendo ou não sua biossíntese. De acordo com Davis et al. (2005), o NADPH, é o cofator que participa ativamente como cofator enzimático nitrogenado, para biossíntese do mentol e seus isômeros.

Em *Mentha viridis*, foram identificados 16 a 18 compostos com uma área relativa de 97,56 até 99,44% (Tabela 5). Quatro compostos majoritários foram identificados são eles: Terpineno, hidrato de trans sabineno, linalol e carvona (Figura 3). A área relativa desses compostos foi acima de 78%. Esses compostos têm como precursor o geranyl difosfato que origina o linalol, limoneno e hidrato de sabineno (CROTEAU et al., 2003). E o limoneno origina a carvona e terpinoleno. Observa-se com o aumento da taxa de nitrato e amônio há uma tendência linear crescente de linalol e hidrato de trans sabineno. Na maior taxa de nitrato e amônio (11/1) houve uma queda acentuada do composto carvona, e o aumento do linalol e hidrato de trans sabineno. Neste caso, o precursor geranyl difosfato não está sendo convertido para limoneno e, conseqüentemente, para carvona.

Figura 3 - Compostos majoritários de *Mentha viridis*, cultivada in vitro sob diferentes taxas de nitrogênio - 1/1; 1,4/1; 2/1; 3/1; 5/1, 11/1 e somente NO<sub>3</sub>.



Fonte: Da Autora (2017)

Tabela 5 - Constituintes voláteis de plântulas de *Mentha viridis* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes taxas de nitrogênio - 1/1; 1,4/1; 2/1; 3/1; 5/1, 11/1 e somente NO<sub>3</sub>.

Constituintes	RT	1NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	1,4NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	2,0NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	3,0NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	5,0NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	11,0NO <sub>3</sub> /1NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>
α-felandreno	3,63	0,68	0,76	0,77	0,75	0,73	nd	0,63
α-pineno	3,76	1,72	1,63	1,63	1,79	1,74	2,13	1,68
β-felandreno	4,66	2,30	2,35	2,38	2,44	2,33	0,74	2,14
β-pineno	4,73	1,26	1,07	1,07	1,17	1,16	1,57	1,17
3-Octanona	5,01	0,33	0,32	0,39	0,20	0,61	nd	1,24
β-mirceno	5,12	2,53	2,45	2,55	2,44	2,60	0,97	2,29
3-octanol	5,24	5,54	5,46	5,27	3,84	4,48	0,58	3,87
Terpineno	6,16	4,75	4,86	4,92	5,36	5,69	2,27	7,96
Limoneno	6,23	2,07	1,62	1,71	1,52	1,66	0,18	1,61
γ-terpineno	7,13	0,44	0,62	0,30	0,19	0,26	0,67	0,66
Hidrato de trans sabineno	7,40	20,71	22,07	23,86	24,33	23,88	39,53	18,62
Linalol	8,63	37,61	36,61	34,80	33,47	36,71	41,56	38,74
Iso-mentona	10,51	nd	nd	nd	nd	nd	3,61	nd
Iso-mentol	12,00	0,41	0,40	0,33	0,34	0,40	nd	nd
Ác. butânico-3-metil	14,02	0,23	0,14	0,14	0,42	nd	0,25	nd
Carvona	14,14	15,08	15,01	15,01	14,98	15,78	0,15	13,65
β-cariofileno	17,22	1,89	1,90	3,09	2,42	0,39	2,13	1,21
Iso-cariofileno	18,53	1,06	0,93	0,60	0,94	0,81	0,74	0,93
γ-cadineno	19,37	0,19	0,15	0,12	0,15	0,13	1,57	0,20
Constituintes identificados (%)	-	98,80	98,34	98,95	96,75	99,44	98,58	96,57
Número de constituintes	-	18	18	18	18	17	16	16
Monoterpenos (%)	-	89,56	89,44	89,34	88,78	93,02	93,31	89,12
Sesquiterpenos (%)	-	3,14	2,98	3,81	3,51	1,33	4,44	2,34

RT : Tempo de retenção; Nd: Não detectado.

Fonte: Da autora (2017)

De acordo com Azambuja (2009), o limoneno é um hidrocarboneto cíclico insaturado que pertence à família de terpenos. Com a exceção do alfa-pineno, é o mais importante e mais frequente dos monoterpênóides. Formado a partir do alfa-terpineol (CROTEAU et al., 2000; MURRAY; LINCOLN, 1970) é precursor chave dos principais terpenos de *Mentha*, e é obtido a partir do pirofosfato de geranil por isomerização cis-trans da ligação dupla (GARLET, 2007). É o precursor da carvona e pulegona, que por reações sucessivas pode formar mentofurano, mentona, isomentona, mentol e seus isômeros e acetato de mentila (CROTEAU et al., 2000).

O linalol é outro monoterpeneo referido como um componente prevalente nos óleos essenciais em várias espécies de plantas aromáticas. Na rota biossintética dos terpenos, a síntese de linalol é realizada pela enzima linalol sintase, que ocorre anteriormente a do mentol (CROTEAU et al., 2000). Murray e Lincoln (1970) sugerem que o linalol seja o precursor do alfa-terpineol, limoneno, 1,8-cineol, linalil acetato. No entanto Croteau et al. (2000), sugerem que o linalol não seja o precursor do limoneno, mas todos concordam que ele é formado a partir do pirofosfato de geranila.

O uso de amônio como fonte de N para plantas aromáticas seria de grande interesse, pois, segundo Castro et al. (2001), na síntese de mono e sesquiterpenos, principais constituintes dos óleos essenciais, há gasto de energia (ATP, NADPH+ H<sup>+</sup> ) e o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> já estaria pronto para ser assimilado.

#### 4 CONCLUSÃO

Ambas as espécies, de um modo geral, tiveram maior acúmulo de biomassa seca na taxa 11/1 de nitrato e amônio. Quando a fonte fornecida, foi somente NO<sub>3</sub>, elas não se desenvolveram bem, sendo necessário acrescentar o NH<sub>4</sub> ao meio. Em *Mentha arvensis*, o tratamento 1,4/1 produziu maiores valores dos pigmentos para clorofila *a*, *b* e total. O tratamento com somente NO<sub>3</sub> quantificou maiores pigmentos de clorofila *b* e total, e carotenoides. A partir do tratamento 3/1, houve uma tendência linear crescente de mentol, e decrescente de pulegona. Em *Mentha viridis*, o tratamento com somente NO<sub>3</sub>, proporcionou mais pigmentos para clorofila *a* e total, a clorofila *b* teve melhor resposta na taxa 11/1, e os carotenoides em 1/1. Houve uma queda acentuada do carvona e aumento do linalol e hidrato de sabineno com a taxa 11/1.



## REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, B. et al. Nitrogenous fertilizer influence on quantity and quality values of balm (*Melissa officinalis* L.) **Journal of Agriculture**, Extension and Rural Development, Prabhakaran, v. 1, p. 31-33, 2009.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. London: Allured Pub, 2007. 804 p.
- ARAÚJO, A. G. et al. Fontes de nitrogênio no crescimento in vitro de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.
- ASHER C. J; EDWARDS D. G. **Modern solution culture techniques**, New York: Springer-Verlag, 1983.
- AZAMBUJA, W. **Limoneno**. Disponível em: <<http://www.oleos essenciais.org/limoneno/>>. Acesso em: 08 fev. 2017.
- BITTSÁNSZKY, A. et al. Over coming ammonium toxicity. **Plant Science**, Limerick, v. 231, n. 4, p.184-190, 2015.
- BLOOM, M. Primary prevention and resilience: changing paradigms and changing lives. In: HAMPTON, R. L.; JENKINS, P.; GULLOTA, T. P. **Preventing Violence in America: issues in children's and familie's lives**, USA, 1996. v. 4.
- BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new viewson old paradigms. **Plant Cell Environment**. Oxford, v. 28, n. 11, p. 1396-1409, 2005.
- CASSOL, D.; FALQUETO, A. R.; BACARIN, M. A. Fotossíntese em *Mentha piperita* e *Melissa officinalis* sob sombreamento. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 576- 578, 2007.
- CASTRO, H. G. DE et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2001.
- CHOUDHURY, R.P.; KUMAR, A.; GARG, A.N. Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Roorkee 247667, India. v. 41, p. 825–832, 2006.
- CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, [s. l.] v. 7 p. 859-868, 1995.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites) Chapter 24 – In: BUCHANAN, B.; W. JONES, G. R. (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. 2000, p. 1250-1318.

DAVID, E.F.S. et al Physiological indexes macro- and micronutrients in plant tissue and essential oil of *Mentha piperita* L. grown in nutrient solution with variation in N, P, K and Mg levels. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 16, n. 1 jan./mar. 2014.

DAVID, E.F.S. MISCHAN, M. M.; BOARO, C. S. F. Rendimento e composição do óleo essencial de *Mentha piperita* L., cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 183-188, 2006.

DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, v. 503, n. 1, p. 1-24, 1990.

DAVIS, E. M.; RINGER, K. L.; MCCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. Monoterpene metabolism. cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. **Plant Physiology**, v. 137, p. 873–881, 2005.

ERMAN, W.F. Chemistry of the Monoterpenes. In: **Encyclopedic Handbook**. Part A. New York/USA: Marcel Dekker, 1985. 814 p.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. JONES, C. A. Field Crops and mineral nutrition. In: FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. JONES, C. A. (Eds.). **Growth and mineral nutrition of field crops**. 1997. p. 1-10.

FERNANDES, D. A.; AZEVEDO, L. P. A.; COSTA R. B. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose na propagação *in vitro* DE TECA (*Tectona grandis* L.f.). **Revista da Agricultura**. v. 86, n. 3, p. 222 -229, 2011.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** - Sistema de Análise de Variância. Versão 5.0. Lavras: DEX/UFLA, 2007.

FLORES, R. et al. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006.

GARBIN, M. L.; DILLENBURG, L. R. Effects of different nitrogen sources on growth, chlorophyll concentration, nitrate reductase activity and carbon and nitrogen distribution in *Araucaria angustifolia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 4, p. 295-303, 2008.

GARLET, T M B. **Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de *Mentha* L.(Lamiaceae) cultivadas em hidroponia com variação de potássio**. 2007. 113 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v. 122, p. 205-213, 2000.

GIL, P. T. et al. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio e para o prognóstico da produtividade da batata. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 611-615, 2002.

GUIMARÃES, M. M. C.; CAIRO, P. A. R.; NEVES, O. S. C. Crescimento de *Eucalyptus urophylla* em meio hidropônico com diferentes proporções de nitrato e amônio. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 52-61, 2014.

HALVIN, J.; BEATON, J.D.; TISDALE, S.L.; NELSON, W. L. **Soil Fertility and Fertilizers**. New Jersey: Upper Saddle River, 2005.

HELALI, S. M. et al. Influence of nitrate-ammonium ratio on growth and nutrition of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 336, n. 1-2, p. 65-74, 2010.

HORCHANI, F.; HAJRI, R.; ASCHI-SMITI, S. Is the sensitivity to ammonium nutrition related to nitrogen accumulation? **Current Botany**, Vidyanagar, v. 2, n. 1, p. 18-22, 2011.

KARA, N., Yield, quality, and growing degree days of anise (*Pimpinella anisum* L.) under different agronomic practices. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. v. 39, p.1014–1022, 2015.

LEWIS, O.A.M.; JAMES, D.M.; HEWITT, E.J. Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Mazurka) in response to nitrate and ammonium nutrition. **Annal of Botany**, London, v. 49, p. 39-49, 1982.

LI, B. et al. Ammonium stress in *Arabidopsis*: signaling, genetic loci, and physiological targets. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 19, n. 2, p. 107-114, 2014.

LICHTENTHALER, H.K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD R. E. et al. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Davis: John Wiley & Sons, 2001.

LIU, Y. et al. Ammonium inhibits primary root growth by reducing the length of meristem and elongation zone and decreasing elemental expansion rate in the root apex in *Arabidopsis thaliana*. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. e-61031, 2013.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14481-14486, 2003.

MÁRIO L. GARBIN; LÚCIA R. DILLENBURG. Effects of different nitrogen sources on growth, chlorophyll concentration, nitrate reductase activity and carbon and nitrogen distribution in *Araucaria angustifolia*. **Braz. J. Plant Physiol.** v. 20, n. 4, Londrina, Oct./Dec. 2008.

MELO, J. T. et al. Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Espécies do Cerrado, p. 195-243. In: **Cerrado: Ambiente e flora**. Planaltina, DF: EMBRAPA, 1998. 556 p.

MENDOZA-VILLARREAL, R. et al. Tolerance of lisianthus to high ammonium levels in rockwool culture. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 38, n. 1, p. 73-82, 2015.

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

MURRAY, M.J., LINCOLN, D.E. The genetic basis of acyclic oil constituents in *Mentha citrate* Ehrh. **Genetics**, v. 65, p. 457-471, 1970.

PODDAR, K.; VISHNOI, R. K.; KOTHARI, S. L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  as a replacement of NAA in the medium. **PlantScience**, v. 129, n. 1, p. 101-106, 1997.

RAVEN J. A.; SMITH F. A. A nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. **New Phytology**, v. 84, p. 415-431, 1976.

RIOBA N.B. et al. Effects of nitrogen, phosphorus and irrigation frequency on essential oil content and composition of sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**. [s. l.] v. 2, n. 1, p. 21–29, 2015.

RODRIGUES, F. A. et al.  $\text{KNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no cultivo *in vitro* de orquídea (*Cattleya loddigesii* 'TIPO') **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 61-65, 2011.

RODRIGUES, C. R. et al., Relação nitrato: amônia na nutrição mineral, crescimento e produção de óleo essencial da sálvia cultivada em solução nutritiva. **Gl. Sci Technol**, Rio Verde, v. 9, n. 2, p. 43-53, 2016.

SAKUTA, M.; TAKAGI, T.; KOMAMINE, A. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolaca americana*. **Physiologia Plantarum**. [s. l.] v. 71, p. 459-463, 1987.

SARASKETA, A. et al. Exploring ammonium tolerance in a large panel of *Arabidopsis thaliana* natural accessions. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 65, n. 20, p. 6023-6033, 2014.

SILVA JÚNIOR, Gabriel Barbosa da. **Relação amônio e nitrato, mitigação da toxicidade amoniacal com silício e curva de acúmulo de nutrientes em mudas de maracujazeiro**. 2015. 69 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, SP, 2015.

SILVA, A. B. et al. Influência das fontes de nitrogênio  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  no desenvolvimento *in vitro* do portaenxerto 'Trifoliata'. **Revista Científica Rural**, v. 6, n. 2, p. 147-152, 2001.

SOUZA, M. A. A. et al. Produção de biomassa e óleo essencial de hortelã em hidroponia em função de nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 41-48, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

\_\_\_\_\_. **Plant Physiology**. Sunderland: **Sinauer Associates**, 2002. 792 p.

TURNER, G. W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v. 124, p. 655-663, 2000.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; RÁGUAS, C. B.; REZENDE, J. C. Utilização de nitrato de amônio e de ureia como fontes de nitrogênio na micropropagação de amoreira-preta. **Scientia Agraria**. [s. l.] v. 10, n. 5, p. 365-370, 2009.

ZANIN, R. L.; et al. Transcriptomic analysis highlights reciprocal interactions of urea and nitrate for nitrogen acquisition by maize. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 56, n. 3, p. 532-548, 2015.

### CAPÍTULO 3

Efeito da concentração de sacarose e membranas porosas no crescimento e análise da fração volátil no cultivo *in vitro* em *Mentha*

#### RESUMO

As plântulas *in vitro* possuem sua fotossíntese limitada e um grande teor de umidade, e por não apresentarem cloroplastos totalmente funcionais, é adicionada a sacarose como fonte de carboidrato. Uma forma de superar esse distúrbio seria o cultivo automixotrófico com maior ventilação do ambiente. Diante disso o presente estudo teve por objetivo avaliar a concentração de sacarose com o uso de sistema de ventilação, no crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e composição da fração volátil *in vitro* de *Mentha arvensis* e *Mentha viridis*. Segmentos nodais de 1,00 cm de tamanho, foram inoculados em frascos com 45mL de meio MS. O meio de cultura foi solidificado com 6g/L de ágar, o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , autoclavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Após 30 dias foram feitas as avaliações. Os tratamentos constavam de 3 doses de sacarose (0%, 1,5% e 3,0%) e 4 sistemas alternativos de membranas (sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, com 12 tratamentos com cinco repetições, três plantas por repetição. Conclui-se que o uso de membranas porosas juntamente com a diminuição da sacarose no cultivo *in vitro*, proporcionou um melhor crescimento das plântulas. A *Mentha arvensis* produziu maiores valores de pigmentos clorofila *a*, *b* total e carotenoides com 4 membranas e 3,0% de sacarose. Já a *Mentha viridis* obteve maiores valores para estes pigmentos com 4 membranas e 1,5% de sacarose. O sistema com 4 membranas e 0 sacarose foi o que proporcionou maior área de mentol em *Mentha arvensis*. E o sistema com 1 membrana e 3,0% de sacarose estimulou a maior produção de linalol em *Mentha viridis*.

**Palavras chave:** Sistemas alternativos de membranas. *Mentha arvensis*. *Mentha viridis*.

Effect of the concentration of sucrose and porous membranes on growth and analysis of the volatile fraction in *Mentha*

**ABSTRACT**

In vitro plantlets have limited photosynthesis and high moisture content, and because they do not present fully functional chloroplasts, sucrose is added as a source of carbohydrate. One way to overcome this disturbance would be the mixotrophic culture with greater ventilation of the environment. Therefore, the present study had the objective of evaluating sucrose concentration with the use of a ventilation system in the growth, production of photosynthetic pigments and composition of the in vitro volatile fraction of *Mentha arvensis* and *Mentha viridis*. Nodal segments of 1.00 cm in size were inoculated into flasks with 45mL of MS medium. The culture medium was solidified with 6 g / L agar, the pH adjusted to  $5.7 \pm 0.1$ , autoclaved at 120 ° C and 1 atm for 20 minutes. After 30 days the evaluations were made. The treatments consisted of 3 doses of sucrose (0%, 1,5% and 3,0%) and 4 alternative systems of membranes (without membrane, with 1, 2 and 4 porous membranes). The design was completely randomized in a factorial scheme, with 12 treatments with five replications, three plants per replicate. It is concluded that the use of porous membranes with the decrease of sucrose in the in vitro culture, provided a better growth of the seedlings. *Mentha arvensis* produced higher values of total chlorophyll a, b and carotenoid pigments with 4 membranes and 3.0% sucrose. *Mentha viridis* obtained higher values for these pigments with 4 membranes and 1.5% of sucrose. The system with 4 membranes and sucrose was the one that provided greater area of menthol in *Mentha arvensis*. And the system with 1 membrane and 3.0% sucrose stimulated the largest production of linalool in *Mentha viridis*.

**Key words:** Alternative membrane systems. *Mentha arvensis*. *Mentha viridis*.

## 1 INTRODUÇÃO

Todo vegetal com algum poder terapêutico, pode ser definido como Planta Medicinal (MARTINS et al., 2003). Estas plantas tem suas potencialidades reconhecidas mundialmente, e seu uso no Brasil é bastante difundido (SIMÕES et al., 2000). Dentre as plantas medicinais encontram-se a *Mentha arvensis L.* e a *Mentha viridis L.*, duas espécies do gênero *Mentha*, que são amplamente utilizadas pela população para fabricação de chás além de suas aplicabilidades industriais, devido a composição de seu óleo essencial (MOTA; RODRIGUES, 2001). Messias et al. (2015), em seu trabalho sobre o uso popular de plantas medicinais em Ouro Preto MG, afirmou que o gênero *Mentha*, é um dos mais utilizados pela população.

Esse gênero conta com cerca de 25 famílias, conhecidas vulgarmente por hortelã. Elas foram introduzidas no Brasil na época do descobrimento, vindas da Europa e Ásia. É um grupo taxonomicamente complexo devido a alta variabilidade genética e plasticidade fenotípica do gênero (HALLIDAY; BEADLE, 1972; DORMAN et al., 2003).

Dentre as formas de propagação das plantas, temos a cultura de tecidos, uma técnica muito aplicada em plantas medicinais, principalmente no que diz respeito à produção de metabólitos secundários (SIAHSAR et al., 2011). Além dessas, temos outras aplicações da cultura de tecidos vegetais, como a conservação de germoplasma, cultura de embriões, intercâmbio de germoplasma, germinação de sementes, aceleração de programas de melhoramento, estabilidade genética ou aumento de variabilidade (FERREIRA et al., 1998).

No sistema convencional de propagação *in vitro*, os frascos e tubos no qual as plantas são mantidas, são vedados para que não ocorra contaminação do meio de cultura e também para que o explante não perca água para o ambiente (SCHUELTER et al., 2015). Nesses sistemas as plantas possuem sua fotossíntese limitada, não apresentam cloroplastos totalmente funcionais, e tem altas taxas de respiração no escuro, o que reduz a taxa de crescimento do explante. Devido a isso, é adicionada ao meio de cultura, uma fonte de carboidratos, que é a fonte energética principal para o explante em desenvolvimento (GEORGE, 2008; SALDANHA et al., 2012).

Estudos relatam que uso de sistemas alternativos de membranas, diminui a umidade relativa e aumenta a troca gasosa (MOREIRA et al., 2013), além de manter a concentração de CO<sub>2</sub> elevada, o que estimula a fotossíntese (SALDANHA et al., 2012). Alguns trabalhos comprovam que o aumento do CO<sub>2</sub>, promoveu o melhor enraizamento e reduziu as anomalias



de crescimento das plântulas, melhorando a taxa fotossintética e síntese de metabólitos secundários (CHA-UM et al., 2011; TISSERAT; VAUGHN, 2001; ZHU et al., 2015). Braga et al. (2010) também relataram que a utilização de vedação com ventilação proporcionou um melhor desenvolvimento de crisântemo cv. Rage. propagado *in vitro*. Esses dados corroboram com Silva et al. (2017) que constataram que o uso de ventilação natural afetou a produção dos metabólitos secundários de *Plectranthus amboinicus*, bem como estimulou a produção de carvacrol.

Este crescimento conhecido como fotoautotrófico, para ser induzido, é necessário que se retire a sacarose e aumente a concentração de CO<sub>2</sub>, para que a transpiração, e a fotossíntese ocorram (ERIG; SCHUCH, 2005; KOZAI et al., 2005). Com a utilização de membranas permeáveis nas tampas dos frascos, as trocas gasosas são aumentadas e a fotossíntese estimulada (KOZAI et al., 2005; SALDANHA et al., 2012), além do fato de que este tipo de sistema de cultivo, pode afetar consideravelmente a produção de metabólitos secundários (MORAIS et al., 2012), como nos trabalhos já mencionados, e também em Mohamed e Ibrahim (2012), com *Ruta graveolens* L., em que o uso de vedações ventiladas afetou a produção de cumarinas e rutinas.

Por isso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a concentração de sacarose com o uso de sistema de ventilação, no crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e composição da fração volátil *in vitro* de *Mentha arvensis* e *Mentha viridis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises químicas da fração volátil foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA, em Lavras-MG. A quantificação dos pigmentos fotossintéticos foi realizada no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas (Departamento de Biologia UFLA).

### 2.1 Fase de estabelecimento

Estolões de plantas matrizes de *Mentha arvensis* e *M. viridis* do Horto de Plantas Medicinal do DAG/UFLA foram coletados e cultivados em substrato comercial, em bandeja de isopor com 128 células para o crescimento das plantas. O material de propagação foi mantido em casa de vegetação até produzirem número suficiente de explantes que possibilitasse o início do estabelecimento.

Segmentos nodais foram utilizados como explantes para estabelecer as culturas primárias. Os segmentos foram cortados em tamanho aproximado de 1 cm com o auxílio de uma lâmina e lavados abundantemente com água corrente e sabão neutro. Em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50%, e mantidos sob agitação constante, por 15 minutos, seguido de cinco lavagens em água destilada e autoclavada, sob capela de fluxo laminar.

Após a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio  $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 15 g/L de sacarose com pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, sob intensidade luminosa de  $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , à temperatura de  $26 \pm 1$  °C.

Depois de estabelecidas, as plântulas foram multiplicadas no mesmo meio do estabelecimento e mantidas nas mesmas condições de cultivo para formação de um estoque de plântulas que foram usadas nos experimentos.

Plântulas estabelecidas *in vitro* em meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 30 dias, foram utilizadas como fonte de explante para a realização dos experimentos.

## 2.2 Condições gerais dos experimentos

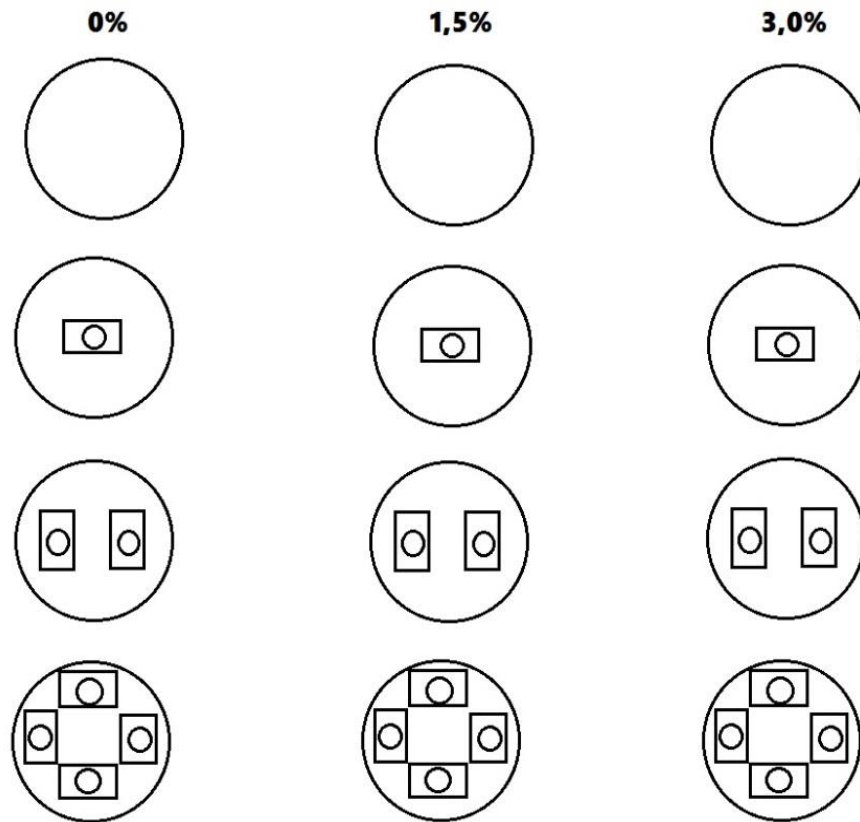
Para a realização deste trabalho, foram montados 2 experimentos descritos a seguir, um com *Mentha arvensis* e o outro com *Mentha viridis*. Todos os experimentos tiveram as mesmas condições de cultivo. O meio de cultura foi solidificado com 6 g/L de ágar, o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . Após o preparo, o meio foi autoclavado a  $120^{\circ}\text{C}$  e 1 atm, por 20 minutos. Depois da inoculação, os frascos foram fechados com tampas plásticas, mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro, sob intensidade luminosa de  $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , à temperatura de  $26 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ .

Aos 30 dias, foram avaliados o número de brotos, número de folhas, comprimento médio das brotações, comprimento da maior raiz, biomassa seca da parte aérea, biomassa seca da raiz, biomassa seca total, assim como a composição da fração volátil e a quantificação de pigmentos fotossintéticos. A altura da brotação e o comprimento das raízes foram determinados com o auxílio de uma régua. Para a altura, a medição foi feita da base da brotação até a gema apical. Para a determinação da biomassa seca, os caules, as folhas e as raízes, foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a  $37^{\circ}\text{C}$ , até peso constante. Após esse período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

## 2.3 Composição dos experimentos

Os tratamentos constavam de diferentes concentrações de sacarose (0%, 1,5% e 3,0%) e 4 sistemas de membranas (sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas) (FIGURA 1). Cada experimento continha 12 tratamentos, com 5 repetições, cada frasco com 45mL de meio, contendo 3 explantes, dispostos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial.

Figura 1 - Croqui dos experimentos.



Fonte: Da Autora (2016).

As membranas foram montadas conforme Saldanha et al. (2012). Utilizou-se fita microporosa bege Cremer® e PTFE (politetrafluoroetileno) Amanco® (Figura 2A). As membranas porosas consistiam de 4 camadas, sendo a primeira de fita microporosa Cremer®, a segunda de PTFE e a terceira também de fita microporosa bege Cremer®. Após estas etapas, as três camadas foram cortadas em quadrados de 1 cm<sup>2</sup> (Figuras 2B, 2C, 2D e 2E, respectivamente). As camadas em quadrados de 1 cm<sup>2</sup> foram distribuídas separadamente sobre a face colável da fita microporosa Cremer®, totalizando as quatro camadas. Por fim, as camadas em quadrados foram cortadas homogeneamente e coladas sobre os furos de 1,0 cm de diâmetro presentes nas tampas dos recipientes de cultivo (Figuras 2F, 2G, 2H, 2I e 2J, respectivamente).

Figura 2 - Esquema para a montagem das membranas porosas manufacturadas nas tampas dos recipientes de cultivo (A-J).



Fonte: Duarte (2016).

#### 2.4 Quantificação dos pigmentos fotossintéticos

A extração e quantificação das clorofilas *a* e *b*, e carotenóides, foram realizadas segundo a metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001). Amostras de 0,2g da matéria fresca das folhas foram homogeneizadas em 40 mL de acetona 80%, seguida da leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 663, 645, e 470 nm, respectivamente. Os procedimentos foram realizados na ausência de luz para evitar a degradação dos pigmentos. Os valores foram obtidos em miligrama de pigmento por grama de matéria fresca.

## 2.5 Análise química da fração volátil

As análises químicas da fração volátil foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z*.

Para extração da fração volátil empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System* (CTC Analytics AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais, estabeleceu-se 30 min de incubação das amostras a 110 °C, e a temperatura da seringa foi programada para 120 °C. Folhas foram coletadas de plântulas cultivadas *in vitro* e secas em estufa de circulação de ar a 37 °C. Alíquotas de 20 mg de folhas secas, em triplicatas, que foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE até a análise; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-WAX (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As temperaturas do injetor e da linha de transferência para o EM foram mantidas em 230°C, seguido por uma rampa de temperatura de 3° C/min até 100, seguida de uma rampa de 15° C/min até 220°.

Os componentes foram identificados por comparação de seus tempos de retenção relativos e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007).

## 2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo teste F ( $p < 0,05$ ) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o software Sisvar®, versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sistemas alternativos de membranas e as diferentes doses de sacarose afetaram significativamente o crescimento *in vitro* de *Mentha arvensis* e *Mentha viridis*. Em *M. arvensis*, houve interação entre esses dois fatores para todas as variáveis analisadas (Figura 3). Em *M. viridis*, exceto para número de brotos, todas as interações foram significativas (Figura 3). Para *M. arvensis*, no geral, o SAM4 com 1,5% de sacarose foi o melhor tratamento para o crescimento das plântulas (Figuras 3). Neste tratamento, as biomassas secas da folha, parte aérea, raiz e total apresentaram os maiores acúmulos. Para *M. viridis* os tratamentos SAM2 com 1,5% de sacarose e SAM4 com 0% e 1,5% de sacarose foram os que apresentaram melhores resultados (Figuras 3). Nestes tratamentos, de modo geral, obtve-se um melhor desenvolvimento das plântulas e um maior acúmulo de matéria seca (Figura 3).

Figura 3 - Desenvolvimento de *Mentha arvensis* e *M. viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - e sistemas alternativos de membranas - SM sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas, SM1, SM2 e SM4 respectivamente - (NB - número de brotos; NF - número de folhas; CPA - comprimento da parte aérea, CMR – comprimento da maior raiz, BSF - biomassa seca da folha; BSC - biomassa seca do caule; BSPA biomassa seca da parte aérea; BSR - biomassa seca da raiz; BST - biomassa seca total).

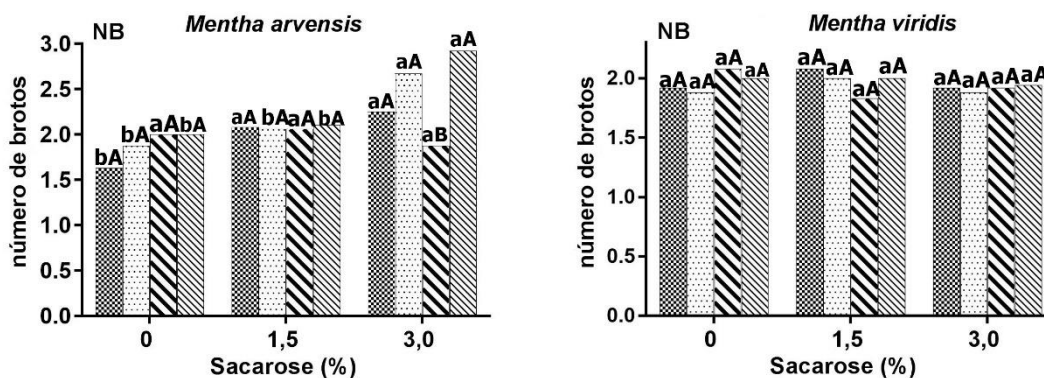


Figura 1 - Desenvolvimento de *Mentha arvensis* e *M. viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - e sistemas alternativos de membranas - SM sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas, SM1, SM2 e SM4 respectivamente - (NB - número de brotos; NF - número de folhas; CPA - comprimento da parte aérea, CMR - comprimento da maior raiz, BSF - biomassa seca da folha; BSC - biomassa seca do caule; BSPA - biomassa seca da parte aérea; BSR - biomassa seca da raiz; BST - biomassa seca total).

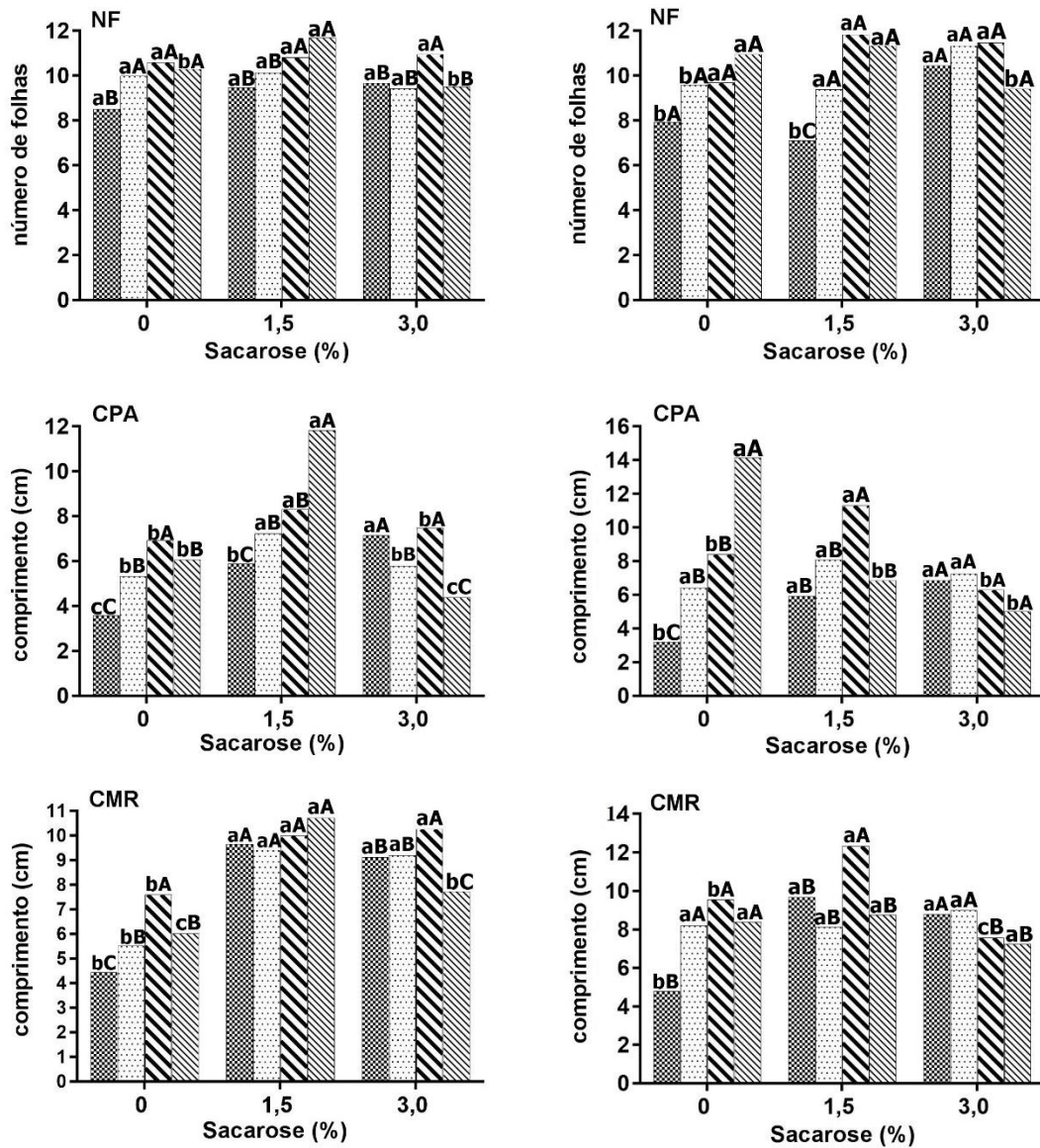




Figura 3 - Desenvolvimento de *Mentha arvensis* e *M. viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - e sistemas alternativos de membranas - SM sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas, SM1, SM2 e SM4 respectivamente - (NB - número de brotos; NF - número de folhas; CPA - comprimento da parte aérea, CMR – comprimento da maior raiz, BSF - biomassa seca da folha; BSC - biomassa seca do caule; BSPA biomassa seca da parte aérea; BSR - biomassa seca da raiz; BST - biomassa seca total).

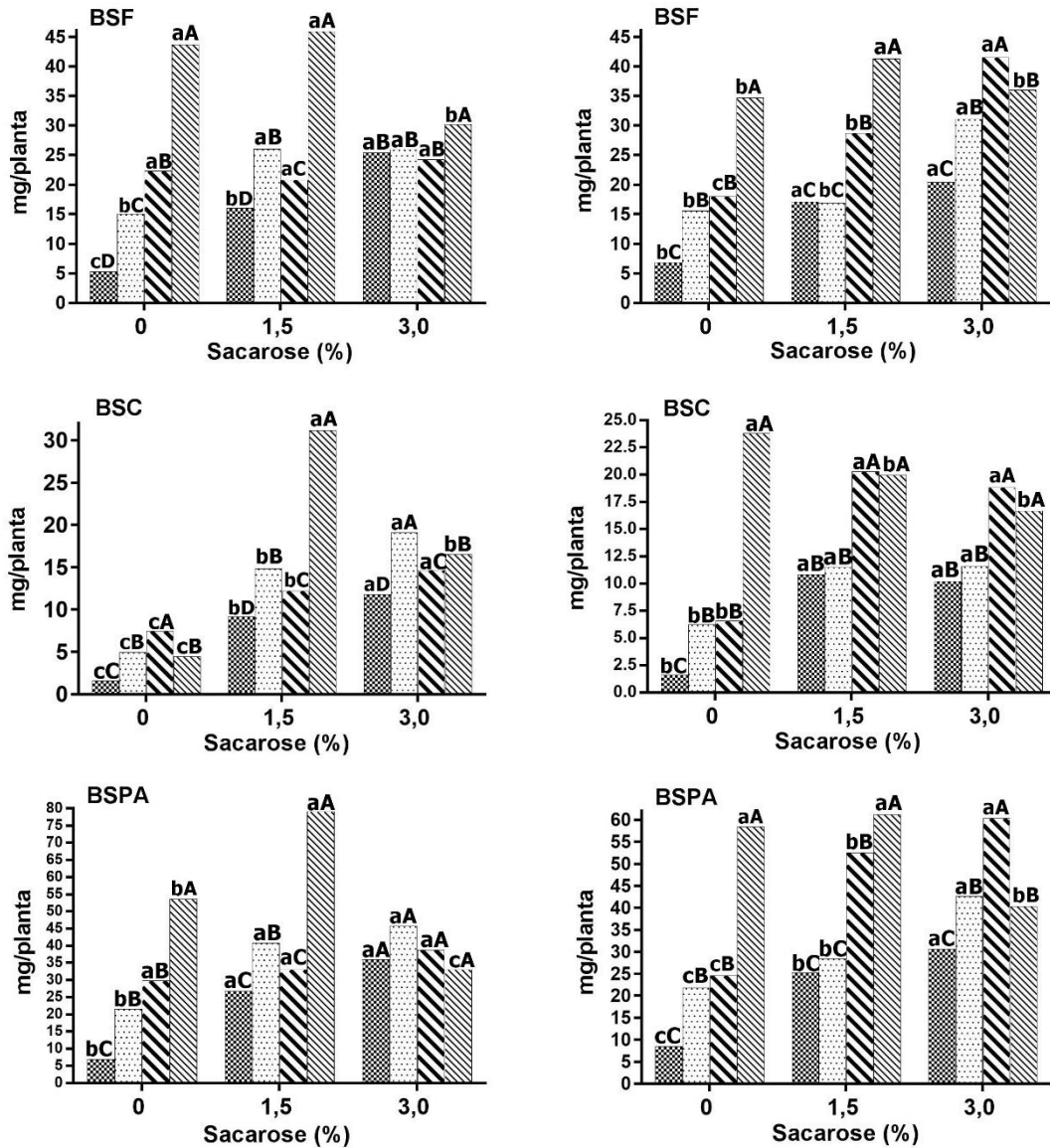
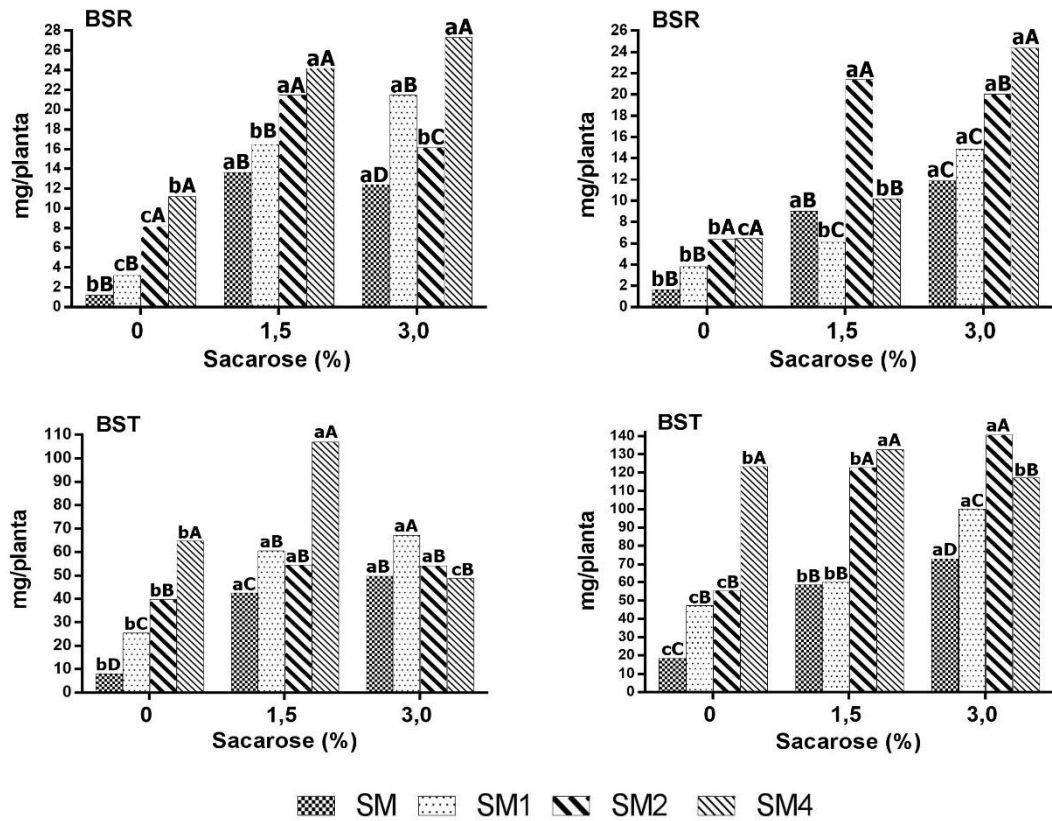


Figura 3 - Desenvolvimento de *Mentha arvensis* e *M. viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - e sistemas alternativos de membranas - SM sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas, SM1, SM2 e SM4 respectivamente - (NB - número de brotos; NF - número de folhas; CPA - comprimento da parte aérea, CMR – comprimento da maior raiz, BSF - biomassa seca da folha; BSC - biomassa seca do caule; BSPA biomassa seca da parte aérea; BSR - biomassa seca da raiz; BST - biomassa seca total).



O crescimento das plântulas de *Mentha arvensis* e *M. viridis* no meio de cultura suplementado com sacarose e diferentes número de membranas porosas foram significativamente diferentes (Figura 4 e 5).

Figura 4 - *Mentha arvensis* e *M. viridis* dentro dos frascos cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - e sistemas alternativos de membranas - SM sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosa.



Fonte: Da autora (2016).

Figura 5 - *Mentha arvensis* e *M. viridis* fora dos frascos cultivadas in vitro sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - e sistemas alternativos de membranas – sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas.



Fonte: Da Autora (2016).

Silva et al. (2014), em seu trabalho de micropropagação de abacaxi, observaram maior crescimento quando a plântula foi cultivada utilizando sistemas alternativos de membranas. Os mesmos benefícios desse sistema foram evidenciados também em; *Thymus vulgaris* L. (BANDEIRA et al., 2007); *Azadirachta indica* A. Juss. (RODRIGUES et al., 2012). Saldanha et al., (2012) também encontraram resultados benéficos com o uso de sistema de ventilação natural, a planta *Pfaffia glomerata* teve um melhor crescimento quando em comparação ao sistema de cultivo convencional. De acordo com Moreira et al. (2013), o uso



de sistemas alternativos de membranas, diminui a umidade relativa e aumenta a aeração, favorecendo as trocas gasosas. A ventilação natural pode diminuir a umidade relativa, bem como a disponibilidade de água do cultivo *in vitro*, e aumentar as trocas gasosas (PARK et al., 2004; CASANOVA et al., 2008; IVANOVA; STADEN, 2010). Além disso, aumenta a concentração de CO<sub>2</sub>, o que estimula a fotossíntese (SALDANHA et al., 2012) e, conseqüentemente, a plântula se desenvolve melhor. De acordo com Souza et al. (2008) o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> pode induzir ao aumento de biomassa.

Sabe-se que o cultivo *in vitro* é altamente dependente da fonte de carbono, devido ao fato da disponibilidade de iluminação e concentração de CO<sub>2</sub> não serem adequadas, podendo não apresentar teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese e se desenvolver. Por isso é importante a suplementação de uma fonte de carbono no meio de cultura, pois esta fonte pode ter funcionalidade de substrato para a respiração e participar da formação de macro e micromoléculas. De acordo com Kiferle et al (2014) e Kozai et al. (2005) no cultivo *in vitro* convencional, as plântulas são heterotróficas ou fotomixotróficas, ocorrendo poucas trocas gasosas.

A utilização de 4 membranas porosas sem a suplementação de sacarose obteve um acúmulo em biomassa seca total de até 8 vezes para a *M. arvensis* e 6 vezes para a *M. viridis*, em comparação com o sistema sem membranas. Os dados comprovam o benefício do uso de membranas porosas sem a suplementação de sacarose no meio de cultura. Neste trabalho, a adição de 1,5 e 3% sacarose no meio de cultura, para as duas espécies, ocorreu um pequeno aumento de biomassa seca total em comparação sem o uso de membrana. Apenas a adição de 1,5% de sacarose e 4 membranas porosas com a espécie *M. arvensis* ocorreu um acúmulo maior. No entanto, não justifica a suplementação de sacarose no meio de cultura.

Autores sugerem que para se induzir o crescimento fotoautotrófico é necessário retirar a sacarose do meio de cultura, aumentar a intensidade de luz, o CO<sub>2</sub> e a umidade para que ocorra a fotossíntese, transpiração e acúmulo de matéria seca (ERIG; SCHUCH, 2005; KOZAI et al., 2005). George (2008) afirma que a fixação de carbono pelas plântulas desenvolvidas *in vitro* em meios sem adição extra de sacarose é insuficiente para que ocorra um crescimento autotrófico, principalmente após transferência para aclimatização, sendo necessária uma adição desse carboidrato ao meio de cultura. De acordo com Kozai et al. (2005), em meio de cultura sem adição de açúcar, pode-se controlar facilmente a contaminação, além de as plântulas serem forçadas a desenvolver o seu aparelho

fotossintético durante o cultivo *in vitro*, o que facilita a sua aclimatização *ex vitro* e a sobrevivência ao ambiente externo.

Para *Mentha arvensis*, os pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides, obtiveram maiores valores na interação SAM4 com 3,0% de sacarose (Figura 6). O aumento dos pigmentos nas plantas cultivadas sob 3% de sacarose pode ter resultado numa maior atividade fotossintética (TAIZ; ZEIGER, 2013). Já para Pivetta et al. (2010), o excesso de sacarose pode prejudicar o metabolismo das plântulas, pois inibe a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética das culturas. Em adição, Silva et al. (2008), afirmam que o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no interior dos frascos e dos níveis de irradiância durante o crescimento *in vitro* é outro fator que estimula a produção de altas taxas fotossintéticas em plantas cultivadas em condições fotoautotróficas.

Figura 6 - Pigmentos fotossintéticos de *Mentha arvensis* e *M. viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - e sistemas alternativos de membranas - SM sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas, SM1, SM2 e SM4 respectivamente - (Clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, carotenoides)

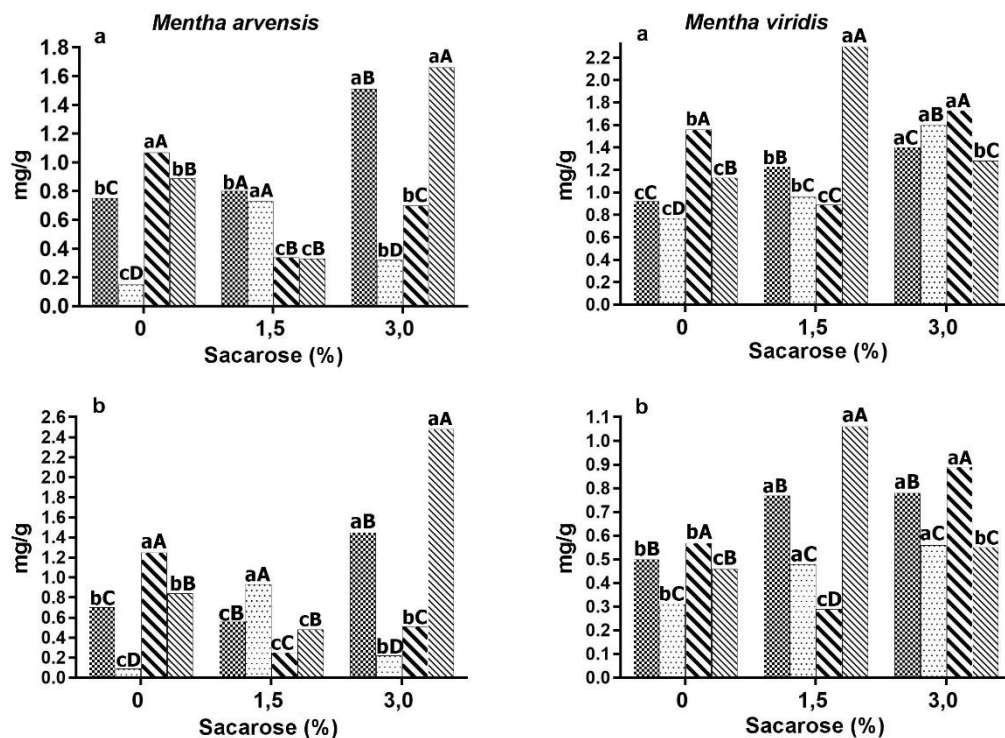
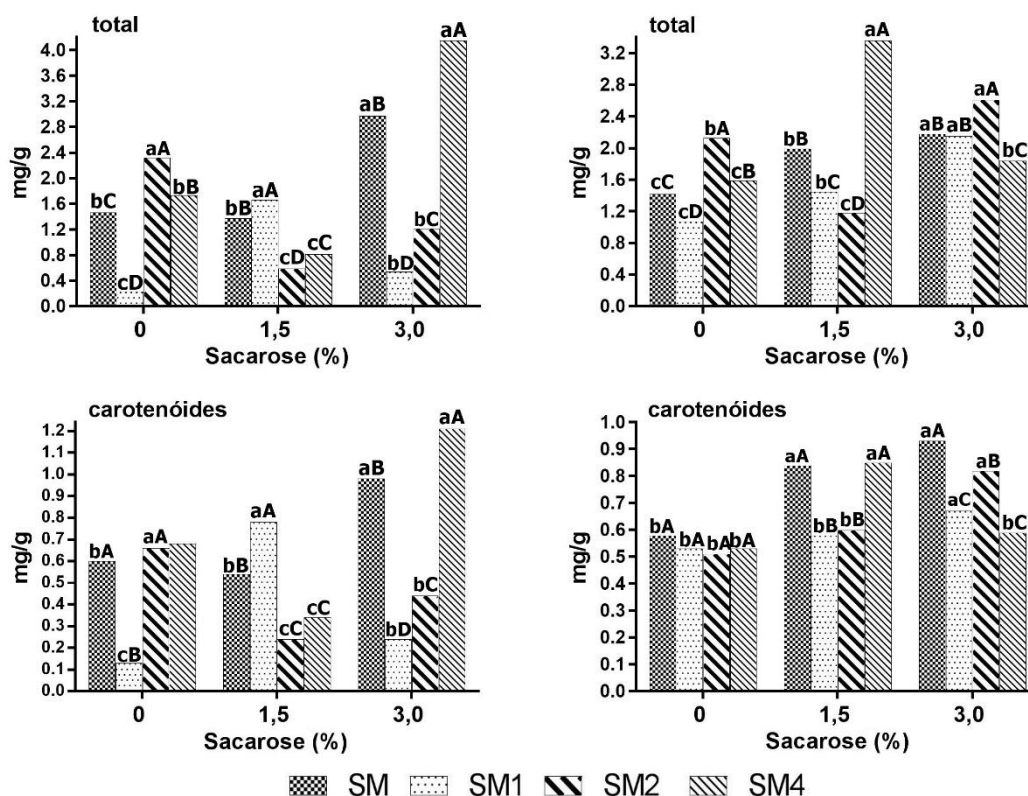


Figura 6 - Pigmentos fotossintéticos de *Mentha arvensis* e *M. viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - e sistemas alternativos de membranas - SM sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas, SM1, SM2 e SM4 respectivamente - (Clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenoides) (Conclusão)



Para *Mentha viridis* a maior produção de pigmentos fotossintéticos ocorreu no tratamento SAM4 com 1,5% de sacarose (Figura 6). Fato semelhante aconteceu com abacaxi cultivado *in vitro*, Mendes et al. (2015) quando utilizaram 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, verificaram que os maiores teores de clorofila *a*, *b* e total, foram obtidos quando os explantes foram cultivados em frascos com ventilação. De acordo com Khan et al. (2002) baixos níveis de sacarose no meio de cultura podem estar relacionados com um alto potencial na produção de carboidratos pelas vias fotossintéticas. É importante que ocorra a troca de ar entre ambiente e fresco, pois assim, as plântulas *in vitro* desenvolvem a capacidade de construir seu aparelho fotossintético e também de crescerem dependentes somente da fonte de carbono endógena (ZOBAYED et al., 2002).

A concentração de sacarose e uso de membranas porosas afetaram a concentração dos compostos voláteis em *Mentha arvensis* e *M. viridis* (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Constituintes voláteis de plântulas de *Mentha arvensis* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes doses de sacarose x sistemas de ventilação. (Continua)

<b>Constituintes</b>	<b>RT</b>	<b>0 sac/SM</b>	<b>1,5 Sac/SM</b>	<b>3,0 Sac/SM</b>	<b>0 Sac/ SAM1</b>	<b>1,5 Sac/SAM1</b>	<b>3,0 Sac/SAM1</b>
$\alpha$ -pineno	2,46	0,93	1,74	1,51	1,42	1,72	1,48
$\beta$ -pineno	3,51	0,82	1,27	1,30	1,22	0,68	0,51
Sabineno	3,70	0,41	0,72	0,81	0,72	0,74	0,57
Mirceno	4,44	0,35	1,04	1,00	0,70	1,12	0,95
D-limoneno	5,18	0,65	1,99	2,81	0,98	2,03	2,12
P-menta-3,8-dieno	6,84	0,36	nd	Nd	nd	nd	nd
Mentona	13,10	2,29	4,79	4,55	3,75	5,13	5,55
Linalol	16,44	0,55	0,78	0,86	0,84	0,78	0,74
<i>Iso</i> -pulegona	16,64	0,30	0,36	0,24	0,31	0,29	0,30
<i>Iso</i> -pulegol	16,78	1,37	0,84	0,63	0,86	0,61	0,60
$\beta$ -cariofileno	17,10	0,41	0,41	0,34	0,31	0,40	0,33
Acetato de isomentila	17,37	0,49	0,37	1,42	0,35	1,45	1,31
P-menth-2-en-1-ol	17,61	0,60	0,31	0,20	0,18	Nd	0,19
Pulegona	18,05	67,61	44,41	31,40	44,92	25,02	31,05
Mentol	18,12	21,65	36,82	52,32	40,06	54,88	49,88
Germacreno D	18,89	0,52	0,47	0,43	0,40	0,50	0,52
Constituintes identificados (%)	-	93,31	96,30	98,82	97,02	95,35	96,11
Número de constituintes	-	16	15	15	15	14	15
Monoterpenos (%)	-	92,38	95,42	98,05	96,31	94,45	95,26
Sesquiterpenos (%)	-	0,93	0,88	0,77	0,71	0,90	0,85



Tabela 1 - Constituintes voláteis de plântulas de *Mentha arvensis* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes doses de sacarose x sistemas de ventilação. (Conclusão)

Constituintes	RT	0 sac/SAM2	1,5 Sac/SAM2	3,0 Sac/SAM2	0 Sac/ SAM4	1,5 Sac/SAM4	3,0 Sac/SAM4
$\alpha$ -pineno	2,46	1,50	1,47	1,44	1,25	1,12	1,42
$\beta$ -pineno	3,51	0,09	1,26	0,24	1,08	0,09	0,86
Sabineno	3,70	0,75	0,80	0,08	0,66	0,56	0,71
Mirceno	4,44	0,73	0,94	0,94	0,70	0,65	1,04
D-limoneno	5,18	1,11	2,00	1,94	0,89	1,31	4,53
P-menta-3,8-dieno	6,84	nd	0,61	0,60	nd	nd	nd
Mentona	13,10	3,86	6,98	6,66	3,47	7,16	8,08
Linalol	16,44	0,90	0,88	0,74	0,95	0,91	0,85
<i>Iso</i> -pulegona	16,64	0,31	nd	0,30	nd	nd	0,21
<i>Iso</i> -pulegol	16,78	0,92	0,48	0,55	0,44	0,42	0,49
$\beta$ -cariofileno	17,10	0,40	0,35	0,32	0,39	0,35	0,34
Acetato de isomentila	17,37	1,07	1,68	1,40	2,13	1,81	1,64
P-menth-2-en-1-ol	17,61	0,29	nd	0,17	nd	nd	nd
Pulegona	18,05	43,87	16,30	26,80	6,51	12,23	12,60
Mentol	18,12	40,89	61,91	53,60	76,91	68,74	61,80
Germacreno D	18,89	0,38	0,51	0,52	0,46	0,50	0,46
Constituintes identificados (%)	-	97,04	96,17	96,30	95,82	95,83	95,04
Número de constituintes	-	15	14	16	13	13	14
Monoterpenos (%)	-	96,26	95,31	95,46	94,97	94,98	94,24
Sesquiterpenos (%)	-	0,78	0,86	0,84	0,85	0,85	0,80

RT : Tempo de retenção; Nd: Não detectado. Fonte: Da Autora (2017).

Tabela 2 - Constituintes voláteis de plântulas de *Mentha viridis* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes doses de sacarose x sistemas de ventilação natural. (Continua)

Constituintes	RT	0 sac/SM	1,5 Sac/SM	3,0 Sac/SM	0 Sac/ SAM1	1,5 Sac/SAM1	3,0 Sac/SAM1
$\alpha$ -pineno	3,50	0,79	1,36	1,22	0,89	1,33	0,95
$\beta$ -pineno	3,70	1,52	nd	0,88	1,68	2,69	1,55
Mirceno	4,44	1,76	1,50	1,02	1,99	1,52	1,81
$\alpha$ -terpineno	4,77	0,60	1,04	Nd	0,29	2,47	0,22
Limoneno	5,18	5,45	2,37	2,86	3,92	1,89	2,65
1-8,cineol	5,45	0,47	0,39	0,25	1,03	2,79	2,35
$\gamma$ -terpineno	6,31	0,94	1,27	Nd	0,42	2,58	0,30
3-octanol	11,18	1,33	1,49	1,33	0,37	1,39	5,74
<i>Iso</i> -mentona	13,10	0,87	3,70	3,92	3,42	2,76	nd
Hidrato de trans sabineno	13,60	14,21	3,16	2,12	4,53	16,67	15,17
Cis-3-hexenil-valerato	14,31	0,61	1,75	0,27	0,58	0,29	0,70
Linalol	16,44	17,50	6,73	3,54	17,52	2,51	42,37
$\beta$ -carofileno	17,11	1,81	0,57	0,38	0,40	0,84	2,61
Neo-mentol	17,37	0,58	1,15	1,00	1,17	0,96	nd
4-terpineol	17,42	0,17	nd	0,17	0,48	0,15	0,14
Pulegona	18,02	0,45	21,98	37,74	31,64	18,89	0,25
Mentol	18,11	30,71	44,64	37,17	25,56	33,79	1,49
Carvona	19,24	18,81	4,04	1,43	nd	2,76	18,85
Constituintes identificados (%)	-	98,57	97,14	95,30	95,89	96,26	97,13
Número de constituintes	-	18	16	16	17	18	16
Monoterpenos (%)	-	95,43	95,08	93,59	95,12	94,03	88,78
Sesquiterpenos (%)	-	1,81	0,57	0,38	0,40	0,84	2,61

RT : Tempo de retenção; Nd: Não detectado.

Fonte: Da Autora (2017)

Tabela 2 - Constituintes voláteis de plântulas de *Mentha viridis* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes doses de sacarose x sistemas de ventilação natural. (Conclusão)

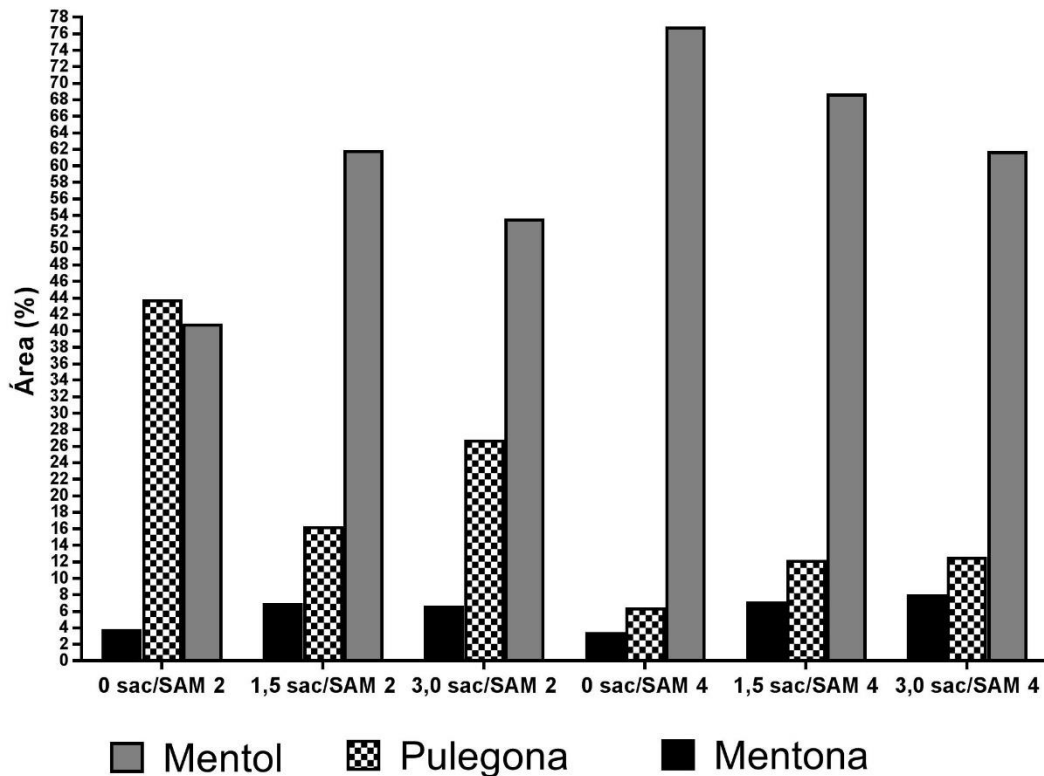
<b>Constituintes</b>	<b>RT</b>	<b>0 sac/SAM2</b>	<b>1,5 Sac/SAM2</b>	<b>3,0 Sac/SAM2</b>	<b>0 Sac/ SAM4</b>	<b>1,5 Sac/SAM4</b>	<b>3,0 Sac/SAM4</b>
$\alpha$ -pineno	3,50	1,14	1,27	0,86	0,79	1,19	1,10
$\beta$ -pineno	3,70	0,92	0,90	0,87	1,67	0,86	0,64
Mirceno	4,44	0,95	0,99	1,15	2,19	1,10	0,85
$\alpha$ -terpineno	4,77	nd	nd	Nd	nd	nd	nd
Limoneno	5,18	1,81	1,87	2,14	5,58	2,40	1,32
1-8,cineol	5,45	0,41	0,47	1,51	1,21	0,31	nd
$\gamma$ -terpineno	6,31	nd	nd	Nd	0,40	nd	nd
3-octanol	11,18	1,00	1,19	0,90	3,09	0,84	1,07
<i>Iso</i> -mentona	13,10	3,43	3,92	5,68	nd	4,66	4,16
Hidrato de trans sabineno	13,60	3,63	1,95	6,75	20,08	1,65	0,31
Cis-3-hexenil-valerato	14,31	1,62	0,35	0,29	0,72	2,38	2,56
Linalol	16,44	5,39	4,10	12,44	36,34	2,43	1,75
$\beta$ -carofileno	17,11	0,48	0,53	0,80	2,79	0,49	0,30
Neo-mentol	17,37	1,28	1,63	1,67	nd	1,76	1,77
4-terpineol	17,42	nd	0,14	0,20	nd	0,17	0,17
Pulegona	18,02	25,19	16,89	11,22	nd	9,85	14,50
Mentol	18,11	47,32	58,19	45,80	2,54	66,26	66,86
Carvona	19,24	2,31	1,06	5,28	20,30	0,51	0,35
Constituintes identificados (%)	-	96,88	95,44	97,55	97,69	96,85	97,71
Número de constituintes	-	15	16	16	13	16	15
Monoterpenos (%)	-	95,40	93,72	95,85	91,81	95,52	96,34
Sesquiterpenos (%)	-	0,48	0,53	0,80	2,79	0,49	0,30

RT : Tempo de retenção; Nd: Não detectado.

Fonte: Da Autora (2017)

Três compostos majoritários foram identificados na *Mentha arvensis*, são eles: mentona, mentol e pulegona (Figura 7). A área relativa desses compostos foi entre 82% a 91%. Na *Mentha viridis* cinco compostos majoritários foram identificados: hidrato de sabineno, linalol, pulegona, mentol e carvona (Figura 8). A área relativa desses compostos foi entre 74% a 83%. Analisando dois compostos majoritários em *M. arvensis* e *M. viridis*, observa-se que houve uma tendência linear de mentol, quando ocorria maior ventilação no frasco e decrescente de pulegona (Figura 7 e 8).

Figura 7 – Compostos majoritários de *Mentha arvensis* cultivada *in vitro*, sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - x sistemas alternativos de membranas - SM sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas, SM1, SM2 e SM4 respectivamente x sistemas de membranas (Continua).



Fonte: Da Autora (2017).

Figura 7 – Compostos majoritários de *Mentha arvensis* cultivada *in vitro*, sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - x sistemas alternativos de membranas - SM sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas, SM1, SM2 e SM4 respectivamente x sistemas de membranas (Conclusão).

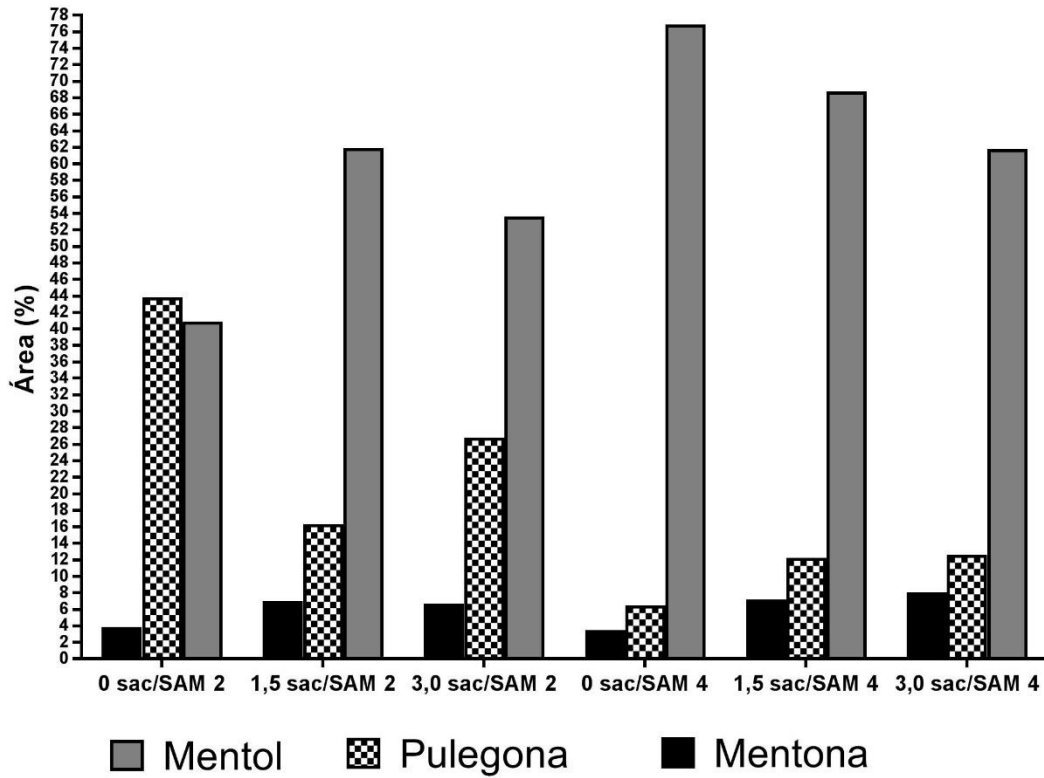
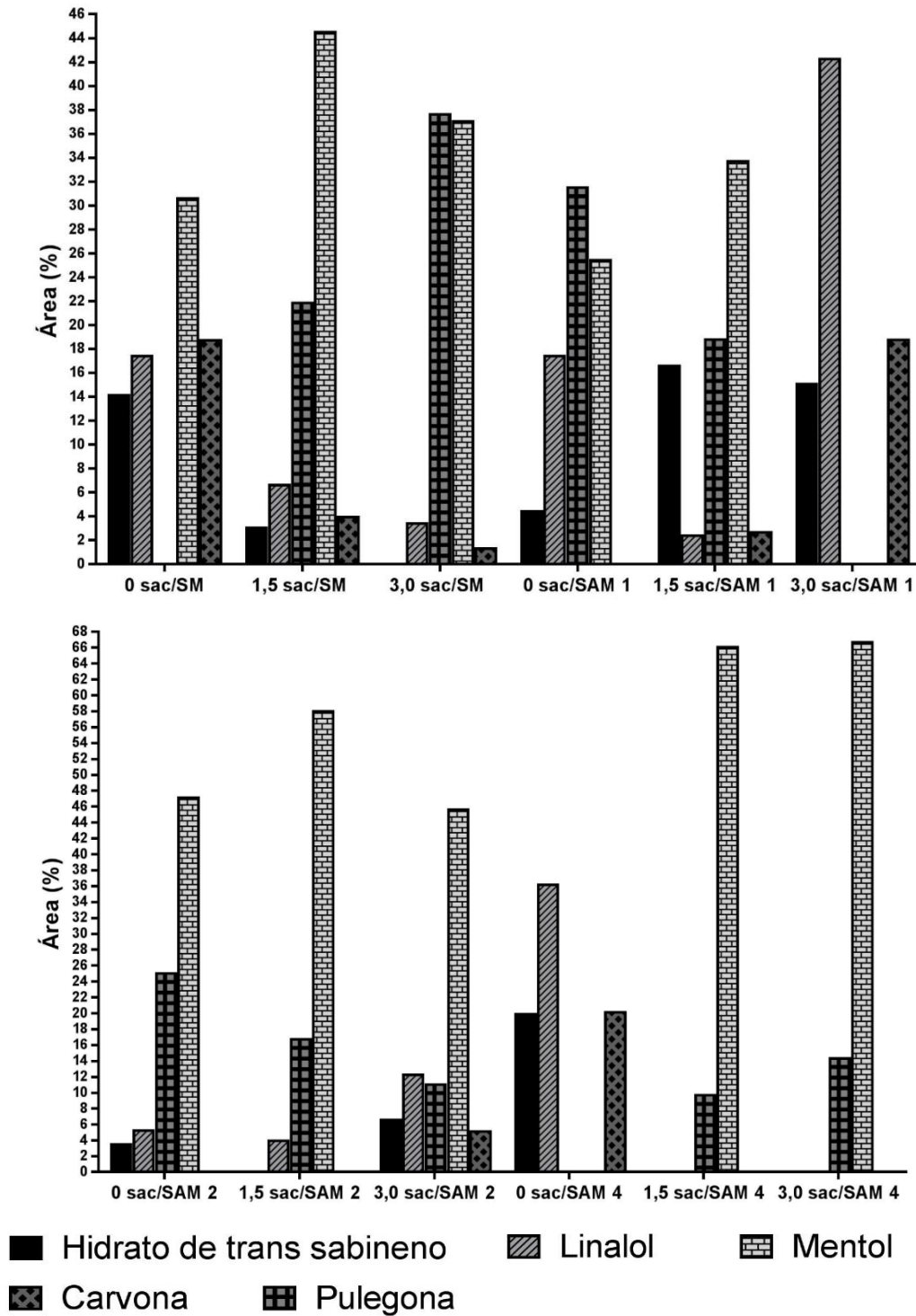


Figura 13 - Compostos majoritários de *Mentha viridis* cultivada *in vitro*, sob diferentes doses de sacarose - 0, 1,5 e 3,0% - x sistemas alternativos de membranas - SM sem membrana, com 1, 2 e 4 membranas porosas, SM1, SM2 e SM4 respectivamente.



Fonte: Da Autora (2017).

Os métodos que promovem ventilação no cultivo *in vitro*, de um modo geral, podem afetar o metabolismo secundário das plantas. Assim como ocorreu com *Ruta graveolens* L., no trabalho de Mohamed e Ibrahim (2012). A maior concentração de CO<sub>2</sub> presente no microambiente afeta a produção de monoterpenos. Baixa disponibilidade de CO<sub>2</sub> resulta em baixas taxas fotossintéticas. Taxa fotossintética reduzida diminui a disponibilidade de gliceraldeído-3-fosfato (GA<sub>3</sub>) que é um dos substratos para a produção de terpenos (SCHURGERS et al., 2009). Sobre os constituintes químicos, em um trabalho de identificação e comparação de óleos essenciais de espécies de Menthas, foi encontrado em *M. arvensis* o mentol como majoritário na proporção de 85,6%, e *M. viridis* apresentou carvona e limoneno como majoritários nas proporções 63,2% e 15,4% respectivamente (GUPTA et al., 2017).

#### 4 CONCLUSÃO

Com a adição de maior número de membranas porosas, e com a diminuição da suplementação de sacarose, houve maior acúmulo de biomassa seca. Os tratamentos também influenciaram a produção de pigmentos fotossintéticos e da fração volátil *in vitro*. Maior quantidade de membrana porosa aumentou a produção de mentol e diminuiu a de pulegona, além de produzir maiores valores de pigmentos fotossintéticos. A *Mentha arvensis* produziu maiores valores de pigmentos clorofila *a*, *b* total e carotenoides com 4 membranas e 3,0% de sacarose. Já a *Mentha viridis* obteve maiores valores para estes pigmentos com 4 membranas e 1,5% de sacarose. O sistema com 4 membranas e 0 sacarose foi o que proporcionou maior área de mentol em *Mentha arvensis*. E o sistema com 1 membrana e 3,0% de sacarose estimulou a maior produção de linalol em *Mentha viridis*.



## REFERÊNCIAS

- BANDEIRA, J. M.; LIMA, C. S. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FALQUETO, A. R.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 472-474, 2007.
- BRAGA, F.T.et al. Luz natural e sistemas de vedação na propagação *in vitro* de crisântemo cv. rage: alterações anatômicas e fisiológicas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 6, n. 2, p. 82-89, 2010.
- CASANOVA, E.; MOYSETT, L.; TRILLAS, M. I. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 52, p. 1–8, 2008.
- CHA-UM, S. et al. Promoting root induction and growth of in vitro macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. ‘Keauu’) plantlets using CO<sub>2</sub>-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, p. 435-444, Sept. 2011.
- DE SOUZA, A. P. et al. Elevated CO<sub>2</sub> increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, cell & environment**, v. 31, n. 8, p. 1116-1127, 2008.
- DORMAN, H.J.D. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E.A. Aplicação de cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Great Britain: Exegetics, 2008. v. 3, 479 p.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. Plant Propagation by Tissue Culture. **The Background**, v. 1, n. 3 p. 501, 2008.
- GUDES, J. P. S. et al. The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. **International Journal of Food Microbiology**. v. 238, p. 183–192, 5 December, 2016.
- GUERRA, I.C.D. et al., Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. **Int. J Food Microbiol.**, v. 214, p. 168–177, 2014.

GUPTA A. K. et al., Genetic variability and correlations of essential oil yield with agro-economic traits in *Mentha* species and identification of promising cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 726–732, January, 2017

HALLIDAY, G.; BEADLE, M. **Flora Europaea**, v. 3, p. 185-186, 1972.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, Coverage, v. 60, p. 143–150, 2010.

KHAN, P. S. S. V et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 141-146, 2002.

KIFERLE, C. et al. *In vitro* culture of sweet basil: gas exchanges, growth, and rosmarinic acid production. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 58, n. 4, p. 601-610, 2014.

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. Photoautotrophic (sugar free medium) micropropagation and transplant production system. 1. ed. **The Netherlands: Springer**, 2005. 316 p.

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system**. The Netherlands, Dordrecht: Springer, 2005. 315 p.

KOZAI, T.; IWANAMI, Y. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. **Journal Japan Society Horticulture Science**, v. 57, n. 2, p. 279-288, 1998.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV Imprensa Universitária, 2003. 220 p.

MENDES, P. S. et al., Cultivo *in vitro* de plântulas de abacaxizeiro com uso de filtros, ventilação artificial e sacarose. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 9, n. 2, p. 202-207, abr./jun. 2015.

MESSIAS, M.C.T.B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, **Brasil. Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.

MOHAMED, M. A. H.; IBRAHIM, T. A. A. Enhanced *in vitro* production of *Ruta graveolens* L. coumarins and rutin by mannitol and ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, p. 335-343, June. 2012.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MOREIRA, A. L. et al. Crescimento de *Cattleya walkeriana* em diferentes sistemas de micropropagação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.

MOTA, D. S. O.; RODRIGUES, V. G. **Plantas Mediciniais**. Subprojeto Instalação de horto-matriz de plantas medicinais em Porto Velho-RO. Embrapa Rondônia. Folder 08 -Série "Plantas Mediciniais". Dezembro 2001. Disponível em: <[http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/infotec/hortela\\_jap.PDF](http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/infotec/hortela_jap.PDF)>. Acesso em: 5 jan. 2007.

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

PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H. S.; PARK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots in vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 199–205, 2004.

PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, R.; FARIA, R. T. F.; TAKANE, R. J. Crescimento in vitro de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1897-1902, 2010.

Rodrigues M, Costa THF, Festucci-Buselli RA, Silva LC, Otoni WC. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cell Dev Biol Plant.**, v. 48, n. 1, p. 67-72. 2012

SALDANHA, C. W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.

SCHURGERS, G.; ARNETH, A.; HOLZINGER, R.; GOLDSTEIN, A. H. Process-based modelling of biogenic monoterpene emissions combining production and release from storage. Lund University, Department of Physical Geography and Chem. **Phys.**, v. 9, p. 3409-3423, 2009.

SCHURGERS, G. et al. Process-based modelling of biogenic monoterpene emissions combining production and release from storage. **Atmospheric chemistry and physics**, v. 9, n. 10, p. 3409-3423, 2009.

SHUELTER, A. R. et al. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial in vitro de plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* DUNAL). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 183-190, 2015.

SIAHSAR, B. et al. Application of biotechnology in production of medicinal plants. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Dubai, v. 11, n. 3, p. 439-444, 2011.

SILVA A. B. et al. Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (*Bromeliaceae*) micropropagado. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 380-386, mar./apr. 2014.

SILVA, A. B. da; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. de; MIYATA, L. Y.; MELO, L. A. de.; BRAGA; F. T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciência**, Caracas, v. 33, p. 839-843, 2008.

SILVA, S. T. et al. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the in vitro cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, p. 1-10. 2017.

SIMÕES, C.M. et al. **Farmacognosia** - Da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2000. 821p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.e d. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TISSERAT, B.; VAUGHN, S. F. Essential oils enhanced by ultra-high carbon dioxide levels from Lamiaceae species grown in vitro and in vivo. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 4, p. 361-368, Jun. 2001.

TYAGI A.K. et al. Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays. **Food Chem.** v. 137, p. 108–114, 2013.

VERMA, D.Z. et al. Essential oil composition of menthol mint (*Mentha arvensis* L.) and peppermint (*Mentha piperita* L.) cultivars at different stages of plant growth from Kumaon region of western Himalaya. **J. Med Aromatic Plants Res**, v.1, p. 13–18, 2010

WATANABE C.H. et al. Extraction of the essential oil from mint (*Mentha arvensis* L.) through water steam distillation and ethanol extraction. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, p. 76–87, 2006.

ZHU, C. et al. Historical and experimental evidence for enhanced concentration of artemisinin, a global anti-malarial treatment, with recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide. **Climatic Change**, Dordrecht, v. 132, n. 2, p. 295-306, Sept. 2015.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Leaf anatomy of in vitro tabaco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, v. 161, p. 537-548, 2002.

## CAPÍTULO 4

Efeito da concentração de quitosana no crescimento e análise da fração volátil *in vitro* em *Mentha*

### RESUMO

Os elicitores são substâncias que simulam uma situação adversa, fazendo com que a planta produza metabólitos secundários específicos relacionados à defesa das mesmas. Elicitores podem ser de origem biótica, como fungos e insetos ou abiótica, como o ácido salicílico, quitosana dentre outros. Neste trabalho o objetivo foi avaliar o efeito de diferentes doses de quitosana, no crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e análise da fração volátil, no cultivo *in vitro* de *Mentha arvensis* e *Mentha viridis*. Segmentos nodais de aproximadamente 1,00 cm de comprimento, foram inoculados em 15ml de meio MS. O meio de cultura foi solidificado com 6 g/L de ágar, o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . Após o preparo, o meio foi autoclavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos, antes da inoculação dos explantes. Após 30 dias foram feitas as avaliações. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), distribuído em 5 tratamentos por espécie, contendo 5 repetições com 4 tubos por repetição. Os tratamentos constavam de diferentes concentrações do elicitador nas seguintes dosagens, T1 0 (controle), T2 50, T3 100, T4 150 e T5 200mg/L de quitosana. Para ambas as espécies, a adição de quitosana influenciou a análise da fração volátil e o crescimento da plântula. A quitosana afetou o crescimento de *M. arvensis* e *M. viridis*, sendo mais acentuado em *M. arvensis*. A produção de pigmentos fotossintéticos respondeu melhor nos tratamentos que não continham quitosana. O elicitador afetou a concentração dos constituintes *in vitro*. Na menor concentração de quitosana houve maior acúmulo de pulegona e menor de mentol. No entanto, maior concentração ocorreu o inverso.

**Palavras chave:** Elicitor. Hortelã. Metabólitos. Secundários.

Effect of chitosan concentration on growth and analysis of the in vitro volatile fraction in

*Mentha*

### ABSTRACT

The elicitors are substances that simulate an adverse situation, causing the plant to produce specific secondary metabolites related to their defense. These can be of biotic origins, such as fungi and insects or abiotic, such as salicylic acid, chitosan among others. The present study aimed to evaluate the effect of different doses of chitosan on the growth, production of photosynthetic pigments and analysis of the volatile fraction in the in vitro culture of *Mentha arvensis* and *Mentha viridis*. Nodal segments of approximately 1.00 cm in length were inoculated into 15 ml of MS medium. The culture medium was solidified with 6 g / L agar, the pH adjusted to  $5.7 \pm 0.1$ . After the preparation, the medium was autoclaved at 120 ° C and 1 atm for 20 minutes before the inoculation of the explants. After 30 days, the evaluations were made. The experimental design was completely randomized, distributed in 5 treatments per species, containing 5 replicates with 4 tubes per replicate. The treatments consisted of different concentrations of the elicitor in the following dosages: T1 0 (control), T2 50, T3 100, T4 150 and T5 200 mg / L of chitosan. For both species, the addition of chitosan significantly influenced the analysis of the volatile fraction and the growth of the seedling. Chitosan affected the growth of *M. arvensis* and *M. viridis*, being more pronounced in *M. arvensis*. The production of photosynthetic pigments responded better in treatments that did not contain chitosan. The elicitor affected the concentration of constituents in vitro. In the lower concentration of chitosan there was a greater accumulation of pulegone and less menthol. However, higher concentration occurred the inverse.

**Key-words:** Elicitor. Mint. Secondary metabolites

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais teve um aumento expressivo nas últimas décadas (WHO, 2009). Dentre elas, o gênero *Mentha* é um dos mais utilizados, que conta com 61 espécies, de acordo com a última classificação taxonômica, e está entre os principais pertencentes à família das Lamiaceae (BRAHMI et al., 2015).

Este gênero inclui plantas aromáticas perenes, que são cultivadas, principalmente, devido ao seu óleo essencial, que é muito utilizado para fins medicinais, culinários e industriais (CARDOSO et al., 2000; CORRÊA et al., 2003; HÉCTOR et al., 2005; LORENZI; MATOS, 2008). Suas aplicações medicinais variam desde usos contra distúrbios biliares, cólicas menstruais, dor de estômago, constipação, gengivite, dor de dente, reumatismo e até para combater a febre (BRAHMI et al., 2014).

O mentol, presente em algumas espécies, é o principal constituinte, muito utilizado nas indústrias farmacêuticas (para produção de xaropes e pomadas, dentre outros), cosmética e alimentícia (perfumes, balas, chicletes.) (SANGANERIA, 2005).

Segundo Deschamps et al. (2013), o principal produto das plantas deste gênero, é o óleo essencial, que é produzido e armazenado em tricomas glandulares, presentes nas folhas e flores, e em pouca quantidade no caule.

Dentre as formas de estudo sobre a composição da fração volátil destas plantas, a técnica de micropropagação é a mais utilizada. Através desta técnica, é possível se estudar as vias biossintéticas, sua relação entre a produção desses metabólitos e o crescimento celular, fatores que são importantes para futuras aplicações industriais (BOONSNONGCHEEP et al., 2010).

A composição da fração volátil das plantas pode variar de planta pra planta em função de fatores bióticos e abióticos. Ela é altamente dependente das condições climáticas, comprimento do dia, irradiância de luz, temperatura e disponibilidade de água (SOUZA, 2006; FRANZ; NOVAK, 2010).

Existem algumas substâncias que são chamadas de elicitores, com capacidade de induzir a produção de metabólitos secundários específicos. A indução ocorre quando moléculas sinalizadoras dos agentes patogênicos ou dos eliciadores ligam-se às moléculas receptoras na planta, desencadeando, a partir daí, diferentes respostas, como a hipersensibilidade, formação de calos, lignificação, e produção de fitoalexinas (AQUINO; MARCHESE, 2010; CAETANO, 2011).

Elicitores podem ser microrganismos, como vírus, bactérias, fungos e nematóides, de origem biótica ou então produtos químicos dos mais variados grupos, que constituem os de origem abiótica (ROMEIRO; GARCIA 2009).

Dentre esses produtos químicos, tem-se a quitosana. Ela um biopolímero hidrofílico, solúvel em ácidos orgânicos diluídos como os ácidos acético, fórmico, succínico, láctico, tartárico, valérico, glicólico, cítrico e málico, também se dissolve em soluções diluídas de ácidos inorgânicos tais como os ácidos clorídrico e sulfúrico (HAFDANI; SADEGHINIA, 2011).

É o elemento estrutural principal do exoesqueleto de insetos e crustáceos (MUZZARELLI, 1997) e encontrado nas paredes celulares de uma variedade de fungos (BITTELLI et al., 2001). É industrialmente obtida por desacetilação alcalina da quitina (RABEA et al., 2003).

A atividade elicitora da quitosana foi demonstrada pela primeira vez na interação entre a ervilha (*Pisum sativum*) e o agente patogénico fúngico *Fusarium solani* (HADWIGER; BECKMAN, 1980). Palee et al. (2016) em seu trabalho com *Stemona* sob sistemas hidropônicos constataram que a quitosana estimulou a produção de alcaloides.

A quitosana também induziu o aumento das concentrações de compostos terpênicos como mentol, mentona e pulegona (CHANG; SHIN; CHUNG, 1998), linalol (KIM et al., 2005; LOCKWOOD et al., 2007), limoneno (LOCKWOOD et al., 2007) e geraniol (KAHLOS; KIVIRANTA; HILTUNEN, 1994), triterpenoides (FAN et al., 2010) e sesquiterpenos como a artemisinina (PUTALUN et al., 2007; LEI et al., 2011). Em *Pinaceae*, a quitosana estimulou a produção de ciclase, enzima que está envolvida na produção de oleorresinas (LEWINSOHN; WORDEN; CROTEAU, 1994), bem como aumenta a síntese de mono e diterpenos (CROTEAU et al., 1987).

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo verificar a análise da fração volátil, produção de pigmentos fotossintéticos e crescimento de *Mentha arvensis* e *M. viridis* sob diferentes doses do elicitor quitosana.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises químicas da fração volátil foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA, em Lavras-MG. A quantificação dos pigmentos fotossintéticos foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas (Departamento de Biologia UFLA).

### 2.1 Fase de estabelecimento

Estolões de plantas matrizes de *Mentha arvensis* e *M. viridis* do Horto de Plantas Medicinal do DAG/UFLA, foram coletados e cultivados em substrato comercial em bandeja de isopor com 128 células para o crescimento das plantas. O material de propagação foi mantido em casa de vegetação, até produzirem número suficiente de explantes que possibilitasse o início do estabelecimento.

Segmentos nodais foram utilizados como explantes para estabelecer as culturas primárias. Os segmentos foram cortados em tamanho aproximado de 1 cm com o auxílio de uma lâmina e lavados abundantemente com água corrente e sabão neutro. Em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50% e mantidos sob agitação constante, por 15 minutos, seguido de cinco lavagens em água destilada e autoclavada, sob capela de fluxo laminar.

Após a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio  $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 15 g/L de sacarose com pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, sob intensidade luminosa de  $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , à temperatura de  $26 \pm 1$  °C.

Depois de estabelecidas, as plântulas foram multiplicadas no mesmo meio do estabelecimento e mantidas nas mesmas condições de cultivo para formação de um estoque de plântulas que foram usadas nos experimentos.

Plântulas estabelecidas *in vitro* em meio de cultura  $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 30 dias foram utilizadas como fonte de explante para a realização dos experimentos.

## 2.2 Condições gerais dos experimentos

Para a realização deste trabalho, foram montados 2 experimentos descritos a seguir, um com *Mentha arvensis* e o outro com a *Mentha viridis*. Todos os experimentos tiveram as mesmas condições de cultivo. O meio de cultura foi solidificado com 6 g/L de ágar, o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . Após o preparo, o meio foi autoclavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Depois da inoculação, os tubos contendo 15mL de meio, foram fechados com tampas plásticas, mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro, sob intensidade luminosa de  $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , à temperatura de  $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

Aos 30 dias foram avaliados o número de brotos, número de folhas, comprimento médio das brotações, comprimento da maior raiz, biomassa seca da parte aérea, biomassa seca da raiz, biomassa seca total, assim como a composição da fração volátil, e a quantificação de pigmentos fotossintéticos. A altura da brotação e o comprimento das raízes foram determinados com o auxílio de uma régua. Para a altura, a medição foi feita da base da brotação até a gema apical. Para a determinação da biomassa seca, os caules, as folhas e as raízes foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a 37°C, até peso constante. Após esse período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

## 2.3 Composição dos experimentos

Segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento, advindos de plântulas estabelecidas em meio MS, foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio, contendo 15 mL do mesmo meio e em cinco diferentes concentrações de quitosana (0; 50; 100; 150; 200 mg/L). Para o preparo da solução estoque, foi utilizado a quitosana de baixo peso molecular (50-190 KDa) da Sigma-Aldrich® Chemicals, SP, Brasil, com 75 – 85% de desacetilação. Uma solução estoque de quitosana na concentração de  $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  foi diluída em ácido clorídrico 1 N. Em seguida, foi adicionada ao meio de cultura as concentrações finais, antes da autoclavagem.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 5 tratamentos por espécie, contendo 5 repetições com 4 tubos por repetição, 1 explante por tubo.

### 3 Quantificação dos pigmentos fotossintéticos

A extração e quantificação das clorofilas *a* e *b*, e carotenóides, foram realizadas segundo a metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001). Amostras de 0,2g da matéria fresca das folhas foram homogeneizadas em 40 mL de acetona 80%, seguida da leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 663, 645, e 470 nm, respectivamente. Os procedimentos foram realizados na ausência de luz para evitar a degradação dos pigmentos. Os valores foram obtidos em miligrama de pigmento por grama de matéria fresca.

#### 3.1 Análise química da fração volátil

As análises químicas da fração volátil foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z*.

Para extração da fração volátil empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System* (CTC Analytics AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais, estabeleceram-se 30 min de incubação das amostras a 110 °C e a temperatura da seringa foi programada para 120 °C. Folhas foram coletadas de plântulas cultivadas *in vitro* e secas em estufa de circulação de ar a 37 °C. Alíquotas de 20 mg de folhas secas, em triplicatas, que foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE até a análise; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-WAX (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As temperaturas do injetor e da linha de transferência para o EM, foram mantidas em 230°C, seguido por uma rampa de temperatura de 3° C/min até 100, seguida de uma rampa de 15° C/min até 220°.

Os componentes foram identificados por comparação de seus tempos de retenção relativos e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007).

### 3.2 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo teste F ( $p < 0,05$ ) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o software Sisvar<sup>®</sup>, versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de quitosana afetou o crescimento da *Mentha arvensis* e *M. viridis* (Figura 1). A maioria dos parâmetros avaliados apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 2). Em *Mentha arvensis* o número de brotos e de raiz não foram significativos e para *Mentha viridis* foram os parâmetros número de folhas, de raiz e biomassa seca das folhas.

Figura 1- Aspecto das plântulas de *Mentha arvensis* e *Mentha viridis* cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de quitosana (0; 50; 100; 150; 200 mg/L de quitosana).



Fonte: Da autora (2016).

Figura 2 - Desenvolvimento de *Mentha arvensis* e *Mentha viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de quitosana - 0; 50; 100; 150; 200 mg/L - (NB - número de brotos; NF - número de folhas; CPA - comprimento da parte aérea, CMR - comprimento da maior raiz, BSF - biomassa seca da folha; BSC - biomassa seca do caule; BSPA biomassa seca da parte aérea; BSR - biomassa seca da raiz; BST - biomassa seca total) (Continua).

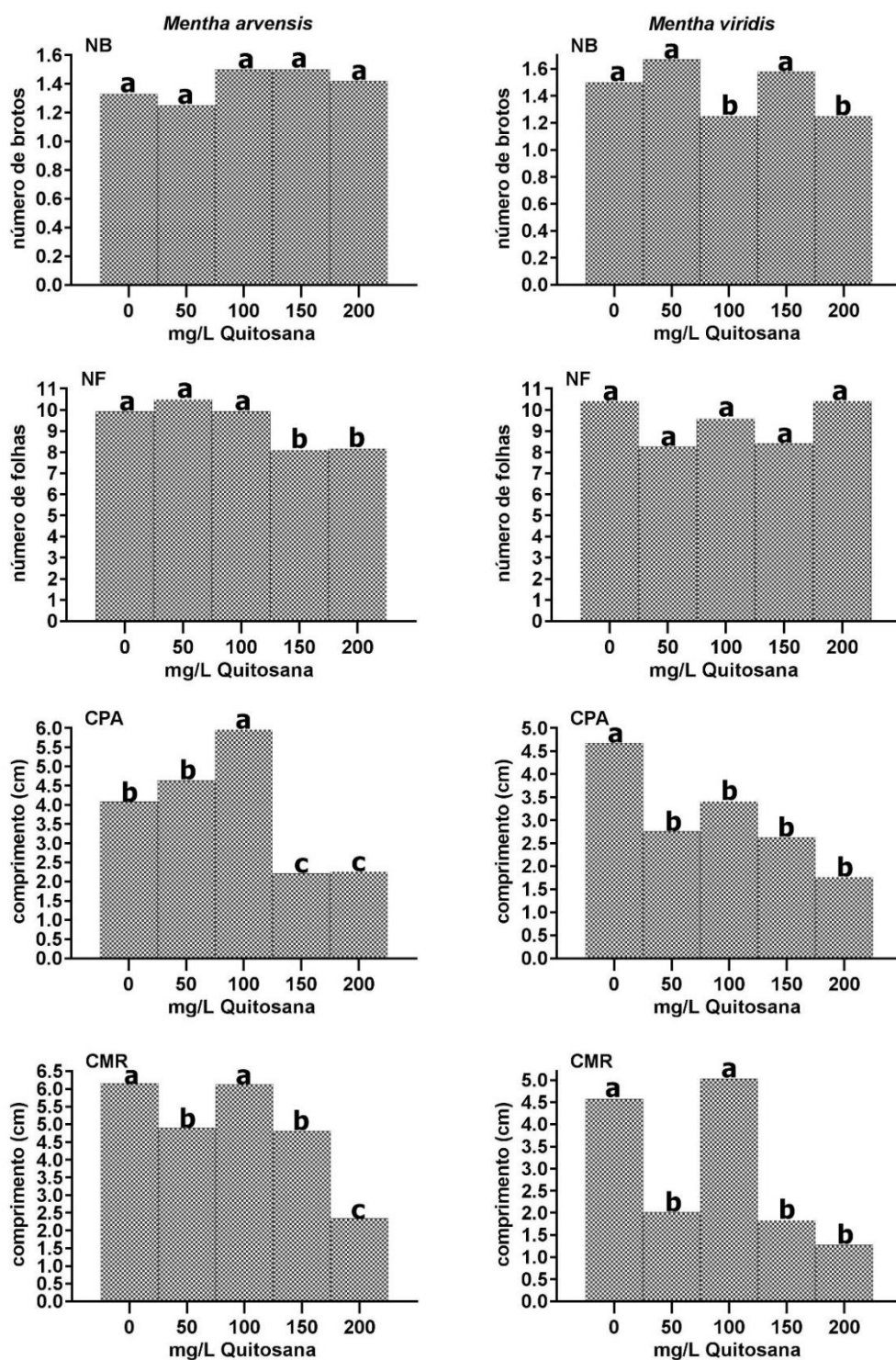


Figura 2 - Desenvolvimento de *Mentha arvensis* e *Mentha viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de quitosana - 0; 50; 100; 150; 200 mg/L - (NB - número de brotos; NF - número de folhas; CPA - comprimento da parte aérea, CMR - comprimento da maior raiz, BSF - biomassa seca da folha; BSC - biomassa seca do caule; BSPA biomassa seca da parte aérea; BSR - biomassa seca da raiz; BST - biomassa seca total) (Continua).

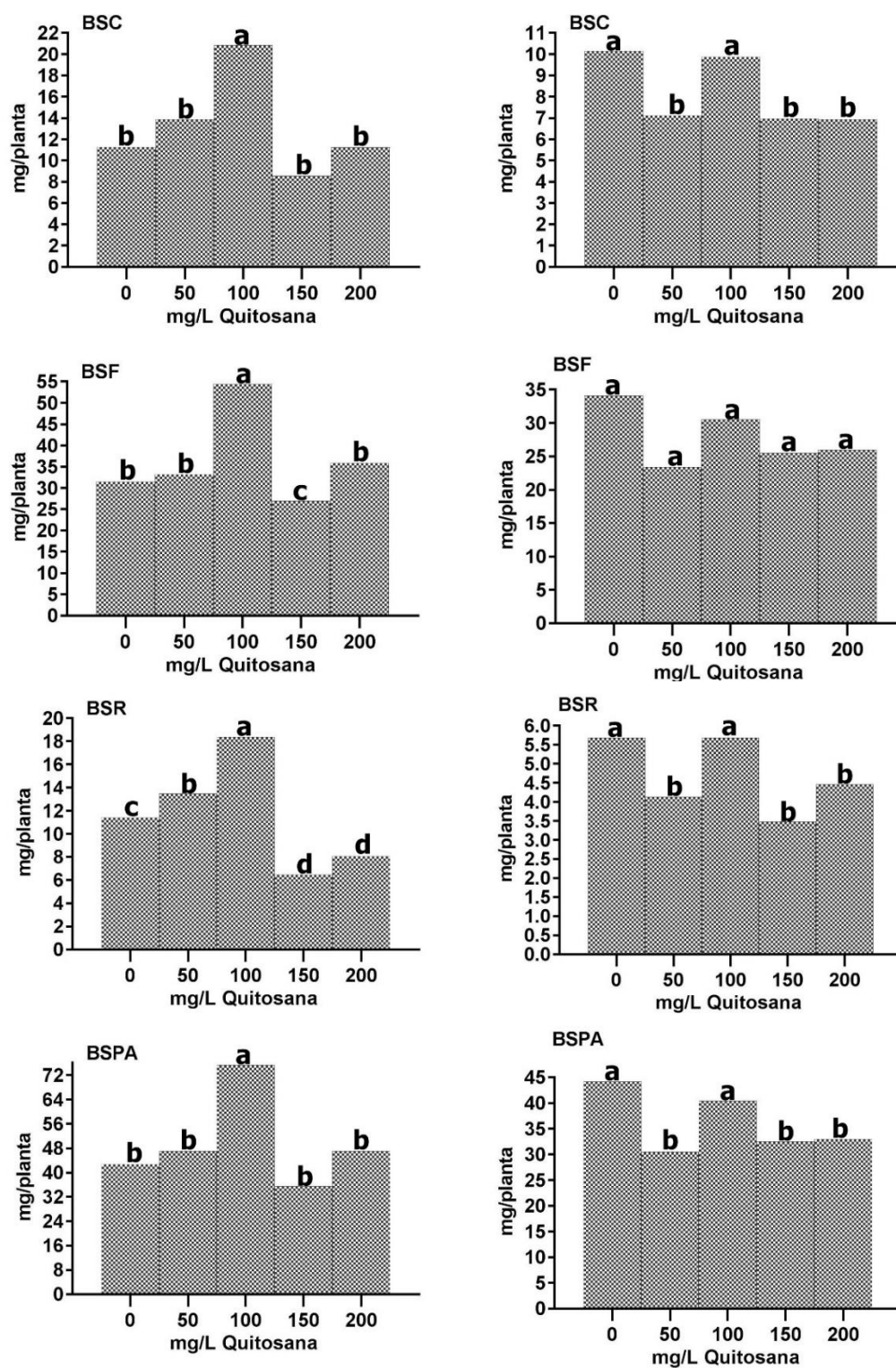
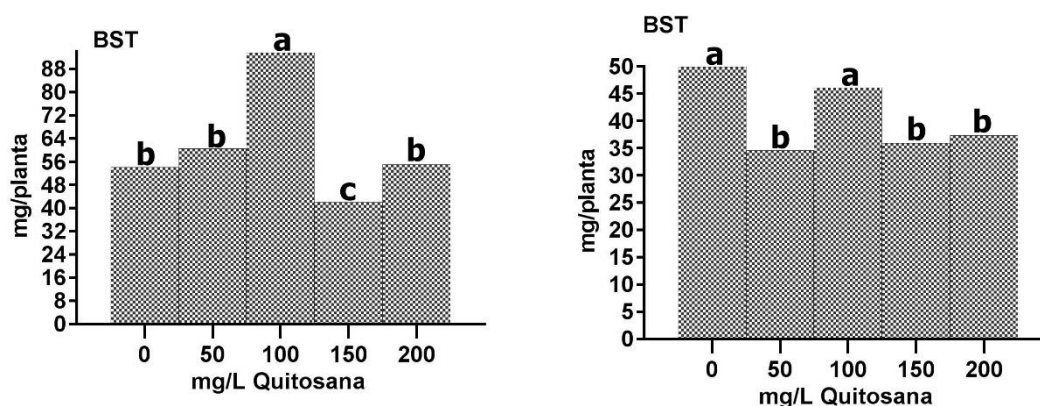


Figura 2 - Desenvolvimento de *Mentha arvensis* e *Mentha viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de quitosana - 0; 50; 100; 150; 200 mg/L - (NB - número de brotos; NF - número de folhas; CPA - comprimento da parte aérea, CMR - comprimento da maior raiz, BSF - biomassa seca da folha; BSC - biomassa seca do caule; BSPA biomassa seca da parte aérea; BSR - biomassa seca da raiz; BST - biomassa seca total) (Conclusão).



A suplementação de quitosana no meio de cultura até 100mg/L induziu um maior acúmulo de biomassa seca crescente em *M. arvensis* (Figura 2). Em *M. viridis* não ocorreu um incremento em biomassa seca. A concentração de 100mg/L de quitosana proporcionou resultados semelhantes ao controle.

A presença do elicitor afetou a altura da plântula. Em *M. arvensis* houve um aumento de 46% na altura, comparado com o controle com adição de 100mg/L, doses mais elevadas inibiram. Em *M. viridis* ocorreu inibição na altura da plântula em todos os tratamentos que continham o elicitor (Figura 2).

Carvacho et al. (2014), obtiveram um crescimento de brotos de brócolis cultivados *in vitro* de 40% a mais que o controle com adição de 50 e 90  $\mu$ M/L de quitosana no meio de cultura. Rocha (2015), em seu trabalho com beterraba, percebeu que quando as sementes de beterraba eram germinadas com adição de quitosana, obtinham maior emergência e maior comprimento, porém, a matéria seca não teve diferença significativa.

Com isso, pode-se inferir que a quitosana estimulou o aumento no tamanho das plântulas, pela ativação do metabolismo primário ou até mesmo de algum hormônio relacionado ao crescimento vegetal, parâmetros estes, que não foram identificados neste trabalho. Um fator importante a se observar é que com a adição do elicitor na dosagem de 100mg/L, a plântula teve um bom desenvolvimento, e não ocorreram perdas no seu crescimento para defesa vegetal. Tal fato poderia resultar na redução do tamanho das plântulas, conforme afirmam Heil et al. (2000). A produção de proteínas RP (relacionadas a



patogênese) podem competir com as proteínas necessárias para o funcionamento básico da planta, podendo comprometer o crescimento e desenvolvimento da mesma (HEIL et al., 2000).

A presença do elicitor no meio de cultura afetou os pigmentos fotossintéticos. No geral, as concentrações de clorofila e carotenoides foram inibidas pelo elicitor (FIGURA 3).

Figura 3 - Pigmentos fotossintéticos de *Mentha arvensis* e *M. viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de quitosana - 0; 50; 100; 150; 200 mg/L - (Clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenoides).

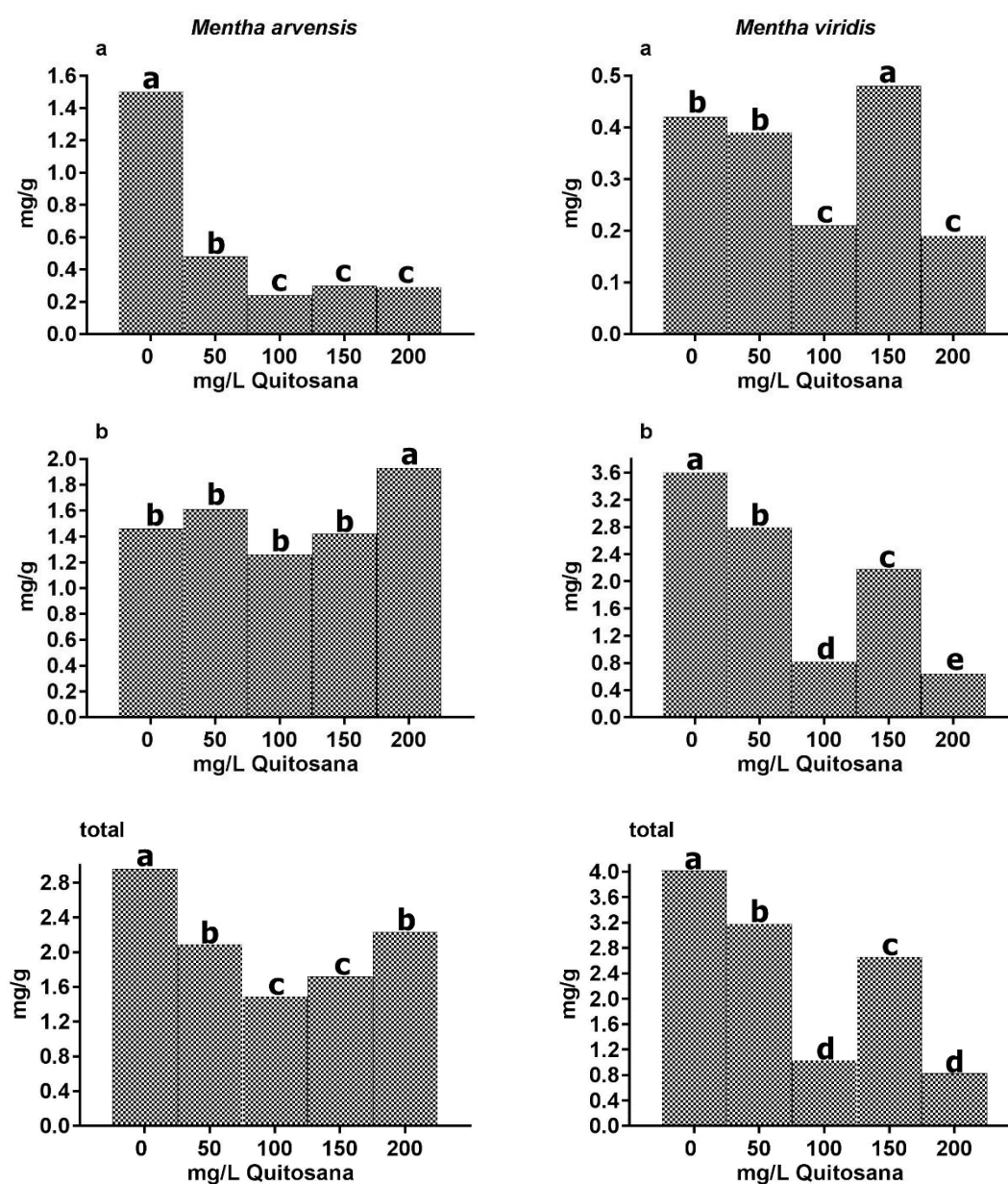
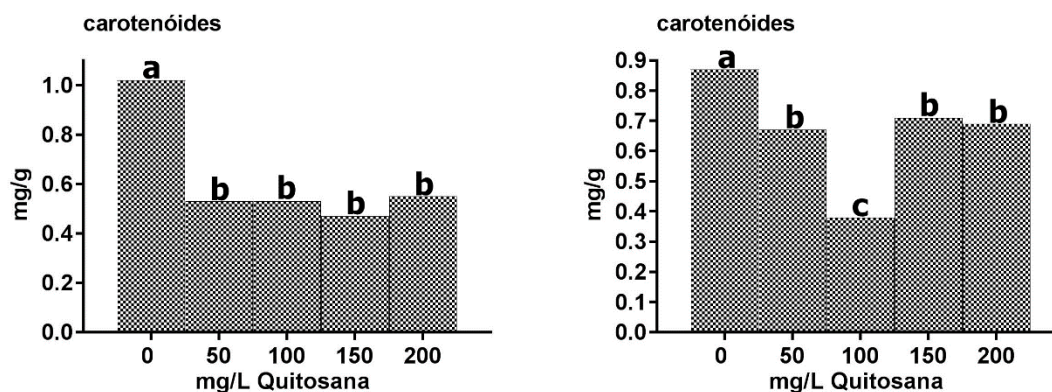


Figura 3 - Pigmentos fotossintéticos de *Mentha arvensis* e *M. viridis*, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de quitosana - 0; 50; 100; 150; 200 mg/L - (Clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenoides).



A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), já os demais pigmentos, denominados de pigmentos acessórios, auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação. Os principais pigmentos acessórios incluem também, outros tipos de clorofilas, como clorofila *b*, presente em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias, clorofila *c*, em feófitas e diatomáceas; e clorofila *d*, em algas vermelhas (TAIZ; ZIEGER, 2013).

As clorofilas *a* e *b* encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respectivamente, e diferem nos substituintes de carbono C-3. Na clorofila *a*, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) no C-3 e a clorofila *b* (considerada um pigmento acessório) contém um grupo aldeído (-CHO), que substitui o grupo metil-CH<sub>3</sub> (VON, 2000).

A clorofila *b* é sintetizada através da oxidação do grupo metil da clorofila *a* para um grupo aldeído. Sabe-se que a clorofila *b* é convertida em clorofila *a* através de uma enzima chamada clorofila *a* oxigenase, que catalisa a conversão do grupo metil ao grupo aldeído (XU et al., 2001). Desta forma, a quitosana pode ter agido no sentido de estimular a produção de clorofila *a*, para *M. arvensis* e *b* para *M. viridis*, e inibiu a produção dos demais pigmentos, e por isso, quando *a* se apresenta em maior quantidade no tratamento o oposto acontece com a *b*, e vice-versa.

Os resultados das análises cromatográficas indicam influências quantitativas quando o meio de cultura foi suplementado com quitosana no cultivo *in vitro* de *M. arvensis* e *M. viridis*. Um total de 17 constituintes foi identificado totalizando acima de 98% da composição

química total da fração volátil em *M. arvensis*. (Tabela 1). Em *M. viridis* um total de 20 compostos foram identificados totalizando acima de 98% (Tabela 2).

Tabela 1 - Constituintes voláteis de plântulas de *Mentha arvensis* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes doses de quitosana.

Constituintes	RT	0 mg	50 mg	100 mg	150 mg	200 mg
$\alpha$ -pineno	2,33	1,60	1,56	1,54	1,36	1,42
$\beta$ -pineno	3,32	1,35	1,35	1,33	1,16	1,19
Sabineno	3,51	0,77	0,74	0,75	0,64	0,72
Mirceno	4,22	0,91	0,89	0,94	0,79	0,99
D-limoneno	4,94	3,06	2,48	4,85	2,58	3,68
3-octanol	10,82	0,69	0,75	0,64	0,57	0,59
Mentona	12,70	6,54	3,34	5,36	4,42	7,05
Iso-mentona	13,67	1,57	1,08	1,34	1,81	2,59
Linalol	16,16	1,04	0,95	1,08	1,05	1,21
Iso-pulegona	16,34	0,34	0,41	0,42	0,21	nd
Iso-pulegol	16,50	0,85	1,12	0,87	0,80	0,54
$\beta$ -cariofileno	16,84	0,31	0,33	0,31	0,30	0,34
Iso-mentol	17,14	0,93	0,65	0,75	1,22	1,54
Iso-pulegol	17,20	0,15	0,17	0,14	0,14	0,09
Pulegona	17,83	40,33	54,06	46,00	31,58	14,63
Mentol	17,93	38,14	28,48	32,20	49,94	61,64
Germacreno D	18,70	0,40	0,39	0,41	0,36	0,40
Constituintes identificados (%)	-	98,98	98,77	98,92	98,91	98,62
Número de constituintes	-	17	17	17	17	16
Monoterpenos (%)	-	97,58	97,30	97,56	97,68	97,29
Sesquiterpenos (%)	-	0,71	0,72	0,72	0,66	0,74

RT : Tempo de retenção; Nd: Não detectado.

Fonte: Da autora (2017).

Tabela 2 - Constituintes voláteis de plântulas de *Mentha viridis* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes doses de quitosana. (Continua)

Constituintes	RT	0 mg	50 mg	100 mg	150 mg	200 mg
$\alpha$ -pineno	2,33	1,42	1,66	1,31	1,25	1,54
$\beta$ -pineno	3,32	1,09	1,21	1,02	1,00	1,23
Sabineno	3,51	1,01	1,67	1,07	0,89	1,08
Mirceno	4,22	1,12	1,72	1,16	0,97	1,42
Limoneno	4,93	3,71	5,06	3,26	3,23	5,19
1-8,cineol	5,20	0,48	1,67	0,98	0,66	0,87
3, octanol	10,82	1,32	2,80	1,97	1,54	1,48
Mentona	12,69	3,22	3,31	1,97	2,30	5,74
Hidrato de trans Sabineno	13,20	5,61	10,34	7,36	5,07	3,37
Iso-mentona	13,67	0,65	0,91	0,71	0,87	1,91
Valerato de cis-3-hexenila	13,91	0,39	0,34	0,40	0,37	0,27

RT : Tempo de retenção; Nd: Não detectado. Fonte: Do autor (2017) (Continua)

Tabela 2 - Constituintes voláteis de plântulas de *Mentha viridis* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes doses de quitosana. (Conclusão)

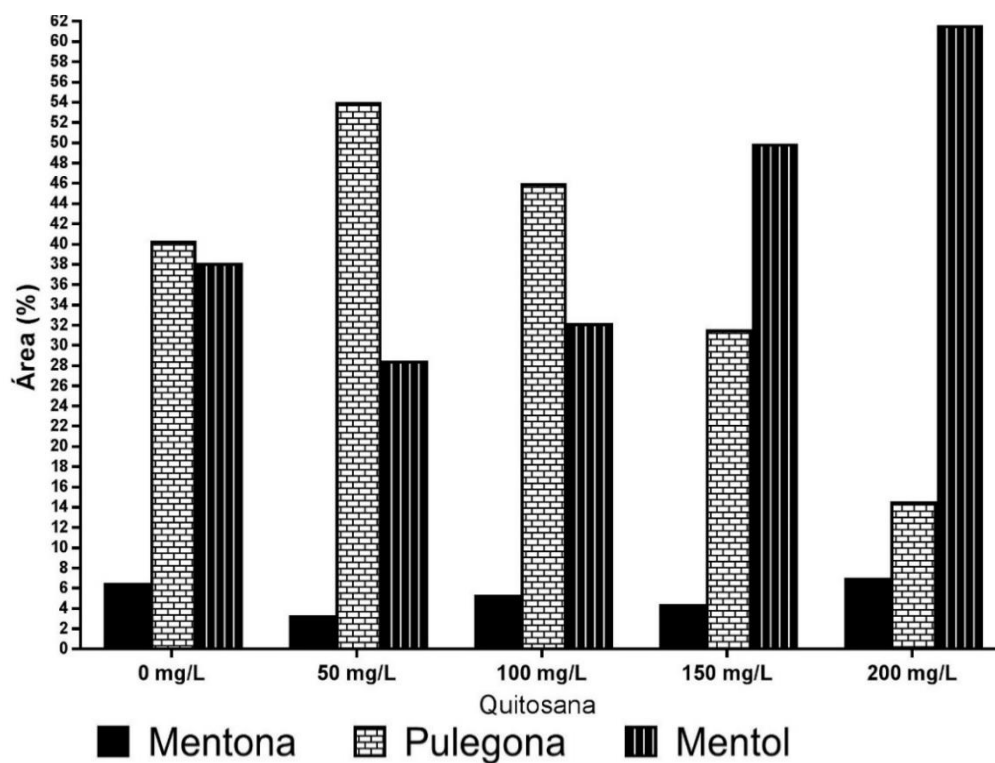
Linalol	16,17	7,82	11,34	14,81	9,73	8,80
<i>Iso</i> -pulegona	16,34	0,36	nd	0,25	0,30	nd
<i>Iso</i> -pulegol	16,50	0,79	0,37	0,61	0,72	0,41
$\beta$ -cariofileno	16,84	0,56	0,59	0,66	0,55	0,47
<i>Iso</i> -mentol	17,14	0,44	0,79	0,58	0,71	1,04
Pulegona	17,83	44,06	18,09	28,17	32,83	14,00
Mentol	17,92	20,61	27,94	26,14	31,78	45,96
$\alpha$ -terpineol	18,70	0,47	0,51	0,58	0,51	0,49
Carvona	19,05	4,27	8,25	6,58	4,48	2,96
Constituintes identificados (%)	-	99,41	98,71	99,56	99,75	98,25
Número de constituintes	-	20	19	20	20	19
Monoterpenos (%)	-	97,53	95,32	96,93	97,66	96,30
Sesquiterpenos (%)	-	0,56	0,59	0,66	0,55	0,47

RT : Tempo de retenção; Nd: Não detectado.

Fonte: Da Autora (2017).

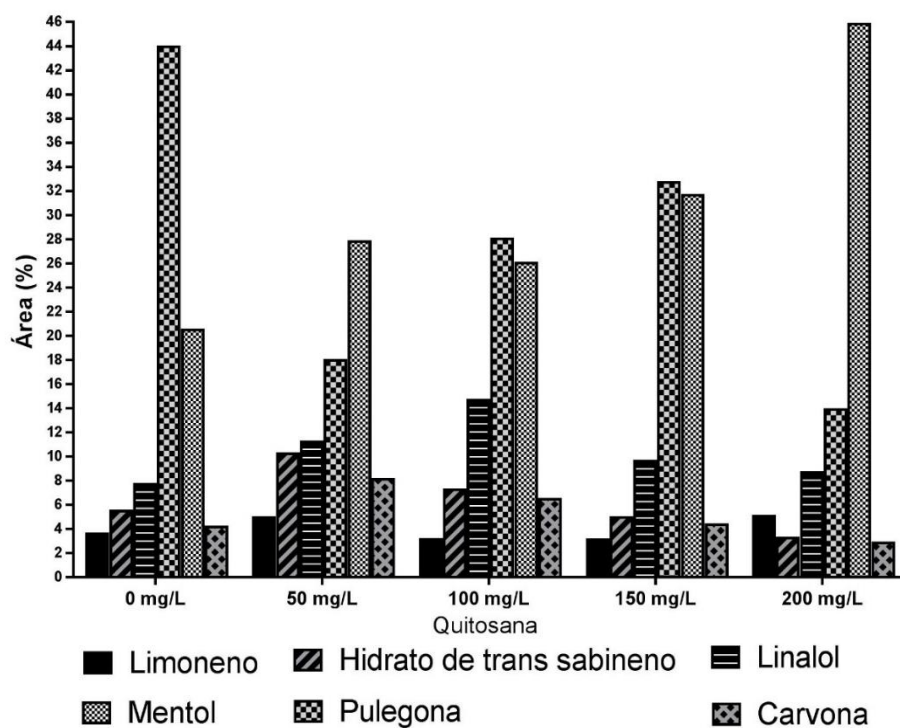
Três constituintes majoritários foram identificados, em plântulas de *M. arvensis*, mentona, pulegona e mentol, totalizando acima de 83% da composição química (Figura 4). E seis compostos majoritários identificados em *M. viridis*, limoneno, hidrato de sabineno, linalol, pulegona, mentol e carvona totalizando acima de 80% da composição química (Figura 5). Analisando dois compostos majoritários, mentol e pulegona em *M. arvensis*, observa-se o efeito da dose de quitosana. Em doses abaixo de 100mg/L, ocorreu um aumento de pulegona e uma diminuição do mentol. Entretanto, com o aumento da dose ocorreu o inverso (Figura 4). Isto é devido à pulegona ser um precursor do mentol. Com a dose menor há um acúmulo de pulegona que não converte para o mentol. Com o aumento há um fluxo para a síntese de mentol. Com a espécie *Mentha viridis*, esta conversão também ocorreu (Figura 5).

Figura 4 - Compostos majoritários de *Mentha arvensis* cultivada *in vitro* sob diferentes taxas de nitrogênio



Fonte: Da Autora (2017)

Figura 5 - Compostos majoritários de *Mentha viridis* cultivada *in vitro* sob diferentes taxas de nitrogênio



Fonte: Da Autora (2017)

Na rota biossintética, a pulegona é convertida para mentona, e depois para mentol. Isto demonstra que com maiores concentrações de quitosana no meio de cultura, a pulegona é convertida para mentol e em taxas menores a conversão é menor. A pulegona é a precursora do mentol, que é um dos compostos considerados mais significativos dos óleos de *Mentha spp* (MAHMOUD; CROTEAU, 2003). A pulegona pode reduzir a (-)-mentona e sintetizar mentol, através da pulegona redutase, ou oxidar a (+)-mentofurano, pela mentofurano sintase (MAHMOUD; CROTEAU, 2003).

Vale ressaltar, que o geranyl difosfato origina o linalol, limoneno e hidrato de sabineno e o limoneno origina a carvona e terpinoleno (CROTEAU et al., 2000). O limoneno é precursor dos principais monoterpenos de *Mentha*, e é obtido a partir do pirofosfato de geranyl por isomerização cis-trans da ligação dupla (GARLET, 2007). É o precursor da carvona e pulegona, que por reações sucessivas pode formar mentofurano, mentona, isomentona, mentol e seus isômeros e acetato de mentila (CROTEAU et al., 2000).

O linalol é outro monoterpeno referido como um componente prevalente nos óleos essenciais em várias espécies de plantas aromáticas. Na rota biossintética dos terpenos, a síntese de linalol é realizada pela enzima linalol sintase, que ocorre anteriormente à do mentol (CROTEAU et al., 2000).

Em alguns trabalhos, a adição de quitosana estimulou a produção dos terpenos como mentol, mentona, pulegona, linalol, limoneno (CHANG; SHIN; CHUNG, 1998; KIM et al., 2005; LOCKWOOD et al., 2007; LOCKWOOD et al., 2007). Em outro com manjerição doce, o ácido rosmarinico e a quantidade total de compostos fenólicos aumentou significativamente após tratamentos com quitosana, ácido rosmarínico e eugenol aumentaram 2,5 vezes e 2 vezes, respectivamente, com 0,1% e 0,5% de quitosana (KIM et al., 2005).

Sathiyabama, Bernstein e Anusuya (2016), também observaram o efeito elicitor da quitosana. Em sua pesquisa com *Curuma longa L.* cultivada em casa de vegetação, a aplicação de 0,1% de quitosana estimulou 100% das plantas a aumentarem a produção de curcumina em até 56%. O elicitor pode ser amplamente utilizado para induzir o acúmulo de fitoalexina em tecidos vegetais, e aumentar os rendimentos de metabólitos secundários (KOMARAIHAH et al., 2003; EILENBERG et al., 2010).

Raízes de *Hypericum perforatum*, cultivadas *in vitro* com a adição da quitosana ao meio, os níveis de valina, isoleucina, glutamina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, frutose, sacarose, ácidos graxos poliinsaturados, epicatequina, xantonas, dimetilalil-pirofosfato e

estigmasterol aumentaram, enquanto os níveis de histidina diminuíram. (BRASIL I et al., 2014).

Trabalhos de suspensão celular com *Scrophularia striata* Boiss também constaram que a quitosana induz a produção de metabólitos secundários, neste estudo ela induziu a produção de compostos fenilpropanóides (KAMALIPOURAZAD et al., 2016).

A quitosana também controlou a infecção por *Fusarium graminearum*, e aumentou a resistência em mudas, estimulando o acúmulo de fenóis e lignina (BHASKARA REDDY et al., 1999 ).

Sendo assim, a aplicação de quitosana como eliciador, pode ser considerada uma perspectiva promissora na produção biotecnológica de fitoalexinas biologicamente ativas, e de outros metabólitos secundários de interesse, sem a necessidade de uma alteração genética na planta.

## 5 CONCLUSÃO

A quitosana afetou o crescimento de *M. arvensis* e *M. viridis*, sendo mais acentuado em *M. arvensis*. A produção de pigmentos fotossintéticos respondeu melhor nos tratamentos que não continham quitosana. O elicitor afetou a concentração dos constituintes *in vitro*. Na menor concentração de quitosana houve maior acúmulo de pulegona e menor de mentol. No entanto, em maior concentração ocorreu o inverso.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. London: Allured Pub. Corp. 804 p. 2007.
- AQUINO, J.V.N.; MARCHESE, J.A. **Indução de resistência em plantas de morangueiro (*Fragaria vesca* L.) Com uso dos eliciadores harpina e Acibenzolar-s metil em pré e pós colheita**. 2010. 110 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnologia Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2010.
- BHASKARA REDDY, M. V. et al. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1208-1216, 1999.
- BITTELLI, M. et al. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Agricultural and Forest Meteorology**, Pullman, v. 107, n. 3, p. 167– 175, Apr. 2001.
- BOONSNONGCHEEP. P. et al. Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 101, p. 119–126, 2010.
- BRAHMI F.; HAUCHARD, D.; GUENDOUZE, N.; MADANI, K.; KAMAGAJU, L.; STÉVIGNY, C.; CHIBANE, M.; DUEZ, P. Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). **Ind Crop Prod.**, v. 74, p. 722–730, 2015.
- BRAHMI, F.; MADANI, K.; STÉVIGNY, C.; CHIBANE, M.; DUEZ, P. Algerian mint species: HPTLC quantitative determination of rosmarinic acid and *in vitro* inhibitory effects on linoleic acid peroxidation. **J Coast Life Med.**, v. 2, p. 986–992, 2014.
- BRASIL, E. et al. A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum* in vitro roots. **Metabolomics**, v. 10, n. 6, 2014.
- CAETANO, M.L. **Vacinas, Agora para as plantas**. Campo e Negócios HF. Uberlândia, MG: Agro Comunicação. v. 74, ano VII, p. 46-52, julho, 2011.
- CARDOSO, M.G. et al. **Óleos essenciais**. Lavras: UFLA, 2000. 42 p.
- CARVACHO, H. B. et al., Effect of methyl jasmonate, sodium selenate and chitosan as exogenous elicitors on the phenolic compounds profile of broccoli sprouts. **Journal of the Science of food and agriculture**. v. 94, n. 12, p. 2555-2561, 2014.
- CHANG, J. H.; SHIN, J. H.; CHUNG, I. S. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, n. 12, p. 1097-1099, Dec. 1998.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica. 6. ed. Petrópolis: Bozes, 2003. 247 p.

CROTEAU, R. et al. Biochemistry of oleoresinosis: monoterpene and diterpene biosynthesis in lodgepole pine saplings infected with *Ceratocystis clavigera* or treated with carbohydrate elicitors. **Plant Physiology**, Washington, v. 85, n. 4, p. 1123-1128, Dec. 1987.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites) Chapter 24 – In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. 2000. p. 1250-1318.

DAVID, E. F. S. et al. Índices fisiológicos, macro e micronutrientes no tecido vegetal e óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com variação de N, P, K e Mg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 1, p. 97-106, 2014.

DESCHAMPS, C.; SIMON, J. E. Terpenoid essential oil metabolism in Basil (*Ocimum basilicum* L.) following elicitation. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 18, n. 6, p. 618-621, nov./dec. 2006.

EILENBERG, H.; PNINI-COHEN, S.; RAHAMIM, Y.; SIONOV, E.; SEGAL, E.; CARMELI, S.; ZILBERSTEIN, A. Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. **J Exp Bot**, v. 61, p. 911–922, 2010.

FAN, G. et al. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 9, n. 19, p. 2816-2820, May 2010.

FERREIRA D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FRANZ, C.; NOVAK, J. Sources of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Eds.) **Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications**. New York, NY: CRC Press, 2010. p.39-81.

GARLET, T M B. **Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de *Mentha* L.(Lamiaceae) cultivadas em hidroponia com variação de potássio**. 2007. 113 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2007.

HADWIGER, L.A.; BECKMAN, J.M. Chitosan as a component of pea *F solani* interactions. **Plant Physiol**. v. 66, p. 2005–2011, 1980.

HAFDANI, F. N.; SADEGHINIA, N. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. World Academy of Science, **Engineering and Technology**, Oxford, v. 50, p. 252-256, 2011.

HÉCTOR, E. et al. Un método para la desinfección y el establecimiento in vitro de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L.). **Cultivos Tropicales**, v. 26, n. 1, p. 69-71, 2005.

- HEIL, M. et al. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: Does systemic acquired resistance (sar) incur allocation costs? **Journal of Ecology**, v. 88, n. 4, p. 645–654, 2000.
- KAHLOS, K.; KIVIRANTA, J. L. J.; HILTUNEN, R. V. K. Volatile constituents of wild and in vitro cultivated *Gloeophyllum odoratum*. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 36, n. 4, p. 917-922, July 1994.
- KAMALIPOURAZAD, M. et al. Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in *Scrophularia striata* Boiss. cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 107, p. 374-384, 2016.
- KIM, H. J. et al. Effect of chitosan on the biological properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 9, p. 3696-3701, Sept. 2005.
- KOMARAIHAH, P.; RAMAKRISHNA, S. V.; REDDANNA, P.; KAVI, K. P.B. Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and in situ adsorption. **J Biotechnol**, p. 101-181–187, 2003.
- LEI, C. et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2011.
- LEWINSOHN, E.; WORDEN, E.; CROTEAU, R. Monoterpene cyclase in grand fir callus cultures: modulation by elicitors and growth regulators. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 36, n. 3, p. 651-656, June 1994.
- LI, T. et al. Designer TAL effectors induce disease susceptibility and resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. **Molecular plant**, v. 6, n. 3, p. 781-789, 2013.
- LICHTENTHALER, H.K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. et al. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Davis: John Wiley & Sons, 2001.
- LOCKWOOD, G. B. et al. Production of d-limonene in Chitosan elicited citrus *Japonica* suspension cultures. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, n. 2, p. 113-116, mar./apr. 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.
- MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14481-14486, 2003.
- MUZZARELLI, R. A. A. Some modified chitosans and their niche applications. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. **Chitin handbook**. Italy: Atec. 1997. p. 47-52.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. **Topic detection and tracking evaluation**. 2008. Disponível em: <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

PALLE, J. et al., Effects of Chitosan and Salicylic Acid on Stemonal Alkaloid Production in Hydroponic Culture of *Stemona curtisii* Hook. f. **Chiang Mai J. Sci.** v. 43, n. 5, p. 1070-1076, 2016.

PUTALUN, W. et al. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, n. 7, p. 1143-1146, mar. 2007.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 3, p. 1457-1465, 2003.

ROCHA, R. de C. D. S. Quitosana na indução de resistência ao tombamento de plântulas de espécies olerícolas e no controle de fitopatógenos in vitro. 2015. 66 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2015.

ROMEIRO, R.S., GARCIA, F.A.O. Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana. Departamento de Fitopatologia. **Universidade Federal de Viçosa**. Viçosa, MG. 12 p, 2009.

SANT, S. Vibrant India. Opportunities for the flavor and fragrance industry. **Perfumer and flavorist**, v.30, p.24-34, 2005.

SATHIYABAMA, M; BERNSTEIN, N; ANUSUYA, S. Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Industrial Crops and Products**, India, v. 89, p. 87-94, 2016.

SIMÕES, C.M. et al. **Farmacognosia - Da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2000. 821 p.

SOUZA, M.A.A. **Produção de biomassa e rendimento de óleos essenciais de plantas de hortelã (*Mentha piperita*) em cultivo hidropônico com diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo**. 2006. 87 p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TANAKA, A. et al. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. **Plant Biology**, v. 95, p. 12719-12723, 1998.

VON ELBE, J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Wisconsin-Madison, 2000. Cap.10, p.782-799.

WHO. World Health Organization. **WHO monographs on selected medicinal plants**.v. 4. Spain:WHO, 2009. 456 p.

XU, H. et al. Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complexos of cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, nov. 2001.