



JOÃO PEDRO MIRANDA ROCHA

**LUMINOSIDADE NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Mentha
pulegium* L. (LAMIACEAE): IMPACTOS NO
CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES
QUÍMICOS VOLÁTEIS E FENÓLICOS**

LAVRAS - MG

2024

JOÃO PEDRO MIRANDA ROCHA

**LUMINOSIDADE NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Mentha pulegium* L. (LAMIACEAE):
IMPACTOS NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS
VOLÁTEIS E FENÓLICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Orientadora

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Coorientador

LAVRAS - MG

2024

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

Rocha, João Pedro Miranda.

Luminosidade no cultivo *in vitro* de *Mentha pulegium* L.
(Lamiaceae): impactos no crescimento e produção de constituintes
químicos voláteis e fenólicos / João Pedro Miranda Rocha. - 2024.
66 p. : il.

Orientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Coorientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Plantas Medicinais. 2. Poejo. 3. Produção in vitro. I.
Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. II. Pinto, José Eduardo Brasil
Pereira. III. Título.

JOÃO PEDRO MIRANDA ROCHA

**LUMINOSIDADE NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Mentha pulegium* L. (LAMIACEAE):
IMPACTOS NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS
VOLÁTEIS E FENÓLICOS**

**LIGHT IN THE *IN VITRO* CULTURE OF *Mentha pulegium* L. (LAMIACEAE):
IMPACTS ON GROWTH AND PRODUCTION OF VOLATILE AND PHENOLIC
COMPOUNDS**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2024.

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto UFLA

Dr. Filipe Almendagna Rodrigues UFLA

Dra. Flávia Dionísio Pereira EPAMIG

Documento assinado digitalmente
 SUZAN KELLY VILELA BERTOLUCCI
Data: 10/05/2024 16:36:26-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof (a). Dr (a). Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Orientadora

LAVRAS-MG

2024

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Agradeço a espiritualidade, que me protege e me guia, mesmo em tempos sombrios onde não conseguimos enxergar com clareza, sempre me apontam a ter tranquilidade e empatia. Me ensina a ser sempre a cabeça e nunca a cauda.

A minha querida mãe, Amada. Uma mulher forte e guerreira, que desde o início da vida passa por dificuldades e me criou da melhor forma possível, com tantas dificuldades, sempre me incentivou a estudar. Obrigado mãe!

A minha orientadora Profa. Suzan, pelos ensinamentos, desafios, confiança e parceria para com os experimentos e na vida acadêmica. Obrigado por toda a dedicação e profissionalismo com a docência, pesquisa, no horto e aos alunos, você é uma grande inspiração!

Ao meu orientador Prof. José Eduardo, por me orientar durante esse período de Mestrado e aos ensinamentos da Cultura de Tecidos Vegetais, as conversas da vida, paciência e dedicação para com a pesquisa científica, com os alunos e ao grupo de estudos em Plantas Medicinais.

Aos meus colegas e amigos do programa Marlon, Ione, Jeremias, Lurdes e outros que me ajudaram de diversas formas, tanto na realização do experimento como também em conversas no dia a dia.

Aos amigos do coração, Nadine e Gabriel.

Aos técnicos Leandro (Dico), Evaldo, Annete por todo o ensinamento, conhecimento técnico, e auxílio na realização dos experimentos! Grandes inspirações!

Aos membros da banca, pelas considerações com o estudo realizado.

A Universidade Federal de Lavras e ao programa de pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares pelo acolhimento e desenvolvimento profissional!

Às plantas, em especial as medicinais, que me ensinam a ter outros olhos para o mundo!

RESUMO

A *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae) é uma espécie que possui fitoquímica complexa, incluindo compostos fenólicos e voláteis responsáveis por atividades acaricida, inseticida, antiviral e antimicrobiana. A intensidade e a qualidade espectral da luz podem causar modificações na totipotência das células vegetais, atingindo respostas estruturais e químicas. Objetivou-se avaliar os impactos da intensidade e qualidade de luz no crescimento e na produção de pigmentos fotossintetizantes, compostos fenólicos e flavonas/flavonóis totais e constituintes voláteis de *M. pulegium* cultivada *in vitro*. Segmentos apicais foram excisados de plantas matrizes cultivadas em canteiro no Horto de Plantas Medicinais da UFLA, lavados em água corrente por 30 min, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50 % (v/v) por 15 min, sob agitação constante. Estes foram estabelecidos e multiplicados em meio básico MS (Murashige e Skoog, 1962) até obtenção dos propágulos necessários para a instalação dos experimentos. Segmentos nodais (1 cm) foram excisados das plântulas pré-estabelecidas e inoculados em tubos contendo 15 mL de meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar. Dois experimentos independentes foram instalados. O primeiro experimento foi constituído de 5 tratamentos com diferentes intensidades luminosas (26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e o segundo, com 6 tratamentos de qualidade espectral da luz: azul, vermelho, 30% azul:70% vermelho, 70% azul:30% vermelho; 50% azul:50% vermelho e branco. Após 30 dias, foram realizadas as análises de crescimento, doseamento de pigmentos fotossintetizantes, compostos fenólicos e flavonas/flavonóis totais e análise química da fração volátil. As intensidades de 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tiveram maiores acúmulos de matérias secas, mas não afetaram o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e pulegona. No entanto, pela análise de componentes principais pode-se observar uma tendência de maior acumulação de pulegona em plântulas cultivadas sob baixas intensidades luminosas 26 e 51 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Plântulas cultivadas sob 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ acumularam o maior teor de compostos fenólicos e as cultivadas sob intensidade de 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produziram mais flavonas/flavonóis. No experimento de qualidade espectral da luz observou-se que a luz azul e a combinação de 50% azul:50% vermelho indicaram as maiores respostas biométricas. A luz monocromática azul também proporcionou maior produção de pulegona *in vitro* (80,64%) e a luz monocromática vermelha apresentou uma queda de cerca de 10% no teor em relação a azul (72,95%). A qualidade espectral da luz não afetou o acúmulo de flavonas/flavonóis, porém o componente azul aumenta o teor de compostos fenólicos em *M. pulegium in vitro*. Na luz branca e 30% de azul e 70% de vermelho foram registrados os maiores acúmulos de pigmentos fotossintetizantes. Portanto, no cultivo *in vitro* de *M. pulegium* o uso de intensidade luminosa de 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e de combinações de LEDs azul e vermelho proporcionam melhor crescimento e acúmulo de metabólitos secundários de interesse.

Palavras-chave: poejo; propagação *in vitro*; intensidade de luz; espectro de luz; pulegona.

ABSTRACT

Mentha pulegium L. (Lamiaceae) is a species with a complex phytochemistry, including phenolic and volatile compounds responsible for acaricidal, insecticidal, antiviral, and antimicrobial activities. The intensity and spectral quality of light can cause modifications in the totipotency of plant cells, leading to structural and chemical responses. The aim was to evaluate the impacts of light intensity and quality on the growth and production of photosynthetic pigments, total phenolic and flavones/flavonols compounds, and volatile constituents of *in vitro* cultivated *M. pulegium*. Apical segments were excised from mother plants cultivated in beds at the Medicinal Plants Garden of UFLA, washed in running water for 30 min, followed by immersion in a 50% (v/v) commercial sodium hypochlorite solution for 15 min with constant agitation. These segments were established and multiplied on basic MS medium (Murashige and Skoog, 1962) until obtaining the necessary propagules for the experiments. Nodal segments (1 cm) were excised from pre-established plantlets and inoculated into tubes containing 15 mL of MS medium, supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose and 5.5 g L⁻¹ of agar. Two independent experiments were conducted. The first experiment consisted of 5 treatments with different light intensities (26, 51, 69, 94, and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and the second one with 6 treatments of light spectral quality: blue, red, 30% blue:70% red, 70% blue:30% red, 50% blue:50% red, and white. After 30 days, growth analyses, photosynthetic pigment quantification, total phenolic and flavones/flavonols compounds content, and chemical analysis of the volatile fraction were performed. Intensity levels of 94 and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resulted in higher dry matter accumulation, but did not affect the content of photosynthetic pigments and pulegone. However, principal component analysis showed a tendency for higher pulegone accumulation in seedlings grown under low light intensities of 26 and 51 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Seedlings grown under 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ accumulated the highest content of phenolic compounds, and those cultivated under an intensity of 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produced more flavones/flavonols. In the light spectral quality experiment, blue light and the combination of 50% blue:50% red showed the greatest biometric responses. Monochromatic blue light also provided greater *in vitro* pulegone production (80.64%), while monochromatic red light exhibited a decrease of about 10% in content compared to blue (72.95%). Light spectral quality did not affect the accumulation of flavones/flavonols, but the blue component increased the content of phenolic compounds in *in vitro M. pulegium*. The highest accumulations of photosynthetic pigments were recorded in white light and in the combination of 30% blue and 70% red. Therefore, *in vitro* cultivation of *Mentha pulegium* should be conducted under light intensities in the range of 94 to 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ or under total or partial presence of blue LED.

Keywords: pennyroyal; *in vitro* propagation; light intensity; light spectrum; pulegone.

Impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais

A *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae) é uma espécie difundida nos países, com grande utilização de forma medicinal e condimentar, no continente africano, ocidente, e América Latina. Possui fitoquímica complexa, incluindo compostos fenólicos e voláteis, os quais são responsáveis por diversas propriedades biológicas, como acaricida, inseticida, antiviral e antimicrobiana. O uso popular medicinal, contempla desde chás, tinturas à utilização como condimento em pratos típicos dos países citados, o que desenvolve a economia nesse sentido, a produção de fitoterápicos padronizados, difusão de condimentos específicos com objetivos determinados e produção de óleos essenciais para aplicação na agricultura. Contudo, determinar a intensidade e a qualidade espectral da luz podem otimizar a produção de plântulas elites, em grande escala, livre de patógenos e em ambientes controlados, permitindo a multiplicação desses indivíduos de forma sem agredir o meio ambiente. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar os impactos da intensidade e qualidade de luz no crescimento, composição química volátil, teores de pigmentos fotossintetizantes, compostos fenólicos e flavonoides de *M. pulegium* cultivada *in vitro*. As intensidades 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tiveram maiores acúmulo de biomassa e teores de pigmentos fotossintetizantes, fenólicos e flavonoides. O constituinte majoritário pulegona foi encontrado em todos os tratamentos, sem variações quantitativas (76-77%). Em relação aos espectros luminosos, a luz azul e a combinação de 50% azul: 50% vermelho indicaram as melhores respostas biométricas. O componente da luz azul também indicou aumento na biossíntese de pulegona *in vitro* (80,64%), e a luz monocromática vermelha diminuiu (72,95%). Portanto, o cultivo *in vitro* de *Mentha pulegium* deve ser conduzido em intensidades de luz na faixa de 69 a 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ou sob presença total ou parcial de LED azul, para otimizar a produção com maior massa seca do material vegetal em condições em que a planta cultivada produza os constituintes desejados para aplicação nos países de interesse.

Social, technological, economic and cultural impacts

Mentha pulegium L. (Lamiaceae) is a species widely distributed in various countries, with significant medicinal and culinary use, particularly in Africa, the West, and Latin America. It possesses a complex phytochemistry, including phenolic and volatile compounds, which are responsible for a range of biological properties such as acaricidal, insecticidal, antiviral, and antimicrobial activities. Its popular medicinal use spans from the preparation of teas and tinctures to its use as a condiment in typical dishes of these regions, contributing to economic development through the production of standardized herbal remedies, dissemination of specific condiments for defined purposes, and production of essential oils for agricultural application. However, determining the intensity and spectral quality of light can optimize the production of elite seedlings on a large scale, free of pathogens and in controlled environments, allowing for the multiplication of these individuals without harming the environment. Therefore, the aim of this study was to evaluate the impacts of light intensity and quality on the growth, volatile chemical composition, levels of photosynthetic pigments, phenolic compounds, and flavonoids of *in vitro M. pulegium*. Results showed that light intensities of 69, 94, and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resulted in higher biomass accumulation and higher levels of photosynthetic pigments, phenolics, and flavonoids. The major constituent,

pulegone, was found in all treatments without significant quantitative variations (76-77%). Regarding light spectra, blue light and a combination of 50% blue: 50% red exhibited the best biometric responses. Blue light also indicated an increase in in vitro pulegone biosynthesis (80.64%), while monochromatic red light decreased it (72.95%). Therefore, *in vitro* cultivation of *Mentha pulegium* should be conducted under light intensities in the range of 69 to 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ or under total or partial presence of blue LED, to optimize production with higher dry mass of plant material under conditions where the cultivated plant produces the desired constituents for application in the countries of interest.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 <i>Mentha pulegium</i> L.: Botânica e propagação da espécie.....	12
2.2 Composição química e atividade biológica.....	14
2.3 Micropropagação de <i>Mentha pulegium</i>	17
2.4 Luminosidade como fator abiótico no cultivo <i>in vitro</i> de plantas medicinais.....	19
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2	28
Artigo 1 - Micropropagação de <i>Mentha pulegium</i> L.: intensidade e qualidade de luz no crescimento e na produção de compostos voláteis e fenólicos.....	28
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Local do experimento e material vegetal	32
2.2 Estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i>	32
2.3 Cultivo sob diferentes intensidades luminosas	32
2.4 Cultivo sob diferentes qualidades de luz	33
2.5 Análise de crescimento	33
2.6 Análises metabólicas	33
2.6.1 Doseamento de pigmentos fotossintéticos	33
2.6.2 Doseamento de compostos fenólicos e flavonas/flavonóis totais	34
2.6.3 Análises químicas da fração volátil	35
2.7 Análises estatísticas	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A	66

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

Há milênios, as plantas e os seres humanos se conectam através da agricultura, alimentação, construção civil, vestuário e, de maneira especial, no alívio dos sintomas de diversas doenças por meio das plantas medicinais (Costa et al., 2024). Fitoquímicos de plantas medicinais produzem uma série de benefícios para a saúde e matéria-prima para processos bioindustriais (Ferreira, 2021).

A *Mentha pulegium* L., popularmente conhecida como poejo, é uma importante planta medicinal, com diversas aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e de perfumaria (Domingues e Santos, 2019). Extratos obtidos desta planta, incluindo seu óleo essencial, têm sido tradicionalmente usados nos últimos séculos na preparação de alimentos e, recentemente como suplemento dietético (Yousef et al., 2023). Além disso, a espécie possui atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, leishmanicida, inseticida, dentre outras (Bouyahya, 2017; Aimad et al., 2021; Messaoudi et al., 2022). Além do óleo essencial, o qual é rico em pulegona, a espécie possui numerosos metabólitos secundários, incluindo compostos fenólicos e flavonas/flavonóis responsáveis por suas propriedades e interesses industriais (Aimad et al., 2021).

Outro importante destaque dessa espécie é que ela faz parte da lista da RENISUS. A RENISUS é uma lista de plantas medicinais que possuem potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao SUS. Nessa lista estão espécies amplamente utilizadas pela população brasileira, e que já têm evidências de indicações de uso. No entanto, ainda são necessários estudos para determinar condições de cultivo e produção agrícola, segurança, eficácia e desenvolvimento de formulações (Brasil, 2009).

A cultura de tecidos é uma prática para regeneração *in vitro* de plantas, aplicada especialmente para plantas medicinais de alto valor comercial ou plantas de difícil propagação em ambiente natural. A *Mentha pulegium* não é de difícil propagação e nem possui metabólitos de elevado valor comercial, mas possui uma demanda de mercado considerável. Para se ter uma ideia, estima-se que a produção de óleos essenciais de *M. pulegium* atinja 3 toneladas na Espanha e na Turquia e mais de 7 toneladas em Marrocos (Lawrence, 2006). Uma grande vantagem da propagação *in vitro* é ser uma ferramenta importante para rápida multiplicação de plantas medicinais, bem como para a extração de metabólitos secundários (Jafari et al., 2016). Além da conservação do recurso genético e disponibilidade de plantas

durante todo o ano sem interferências sazonais, livres de doenças e exploração da variação somaclonal (Singh e Singh, 2021).

No entanto, a regeneração *in vitro* de plantas apesar de depender, em grande parte, do genótipo da planta doadora, também depende de fatores nutricionais, concentrações adequadas de reguladores de crescimento, condições de cultivo *in vitro*, dentre outros. Com relação às condições de cultivo, para o crescimento dos explantes, as culturas devem ser mantidas sob condições controladas de luz, temperatura, fotoperíodo e umidade. As condições de iluminação podem ser estressantes para explantes inoculados, resultando em regenerantes com fenótipos anormais (Duta-Cornescu et al., 2023).

Portanto, um conjunto variado de fatores bióticos e abióticos são componentes chave para o estudo do crescimento e metabolismo das plantas medicinais. Dentre eles, a luz se destaca como um dos principais fatores abióticos que exercem impacto significativo nesse processo (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). A intensidade luminosa e a qualidade espectral da luz exercem influência direta na expressão da totipotência das células vegetais. Assim, as respostas podem ser variadas dependendo do genótipo de cada espécie, resultando em variações no crescimento e no metabolismo secundário (Taiz et al., 2017).

A partir do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar os impactos da intensidade e qualidade de luz no crescimento, composição química volátil, teores de pigmentos fotossintetizantes, compostos fenólicos e flavonas/flavonóis de *M. pulegium* cultivada *in vitro*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Mentha pulegium* L.: Botânica e propagação da espécie

O gênero *Mentha* possui espécies vegetais difundidas por quase todos os países. Os usos variam de região para região podendo atingir fins alimentícios a usos medicinais. As espécies vegetais desse gênero possuem óleos essenciais ricos em moléculas promissoras que justificam o seu uso em forma de especiaria e na culinária, cosméticos, produtos de limpeza, perfumaria e fitoterápicos, desenvolvendo o interesse econômico nas espécies (El Hassani, 2020).

Espécies do gênero *Mentha* têm sido utilizadas na medicina indígena há muitos séculos na forma de preparações extemporâneas, extratos e óleos essenciais, atuando, principalmente, em doenças ou distúrbios respiratórios como sinusite, bronquite, tuberculose e resfriado comum e como remédio na cultura popular (Tafrihi et al., 2021).

No Brasil, atualmente existem espécies do gênero *Mentha* exóticas, naturalizadas e difundidas principalmente em áreas antrópicas e nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, tais como: *M. aquatica* L., *M. arvensis* L., *M. piperita* L., *M. pulegium*, *M. spicata* L., *M. suaveolens* Ehrh., sendo no total 6 espécies, mais de 17 variedades e 76 sinônimos (Antar e Harley, 2023b).

O poejo real - *Mentha pulegium* (Lamiaceae) se destaca economicamente em países do Oriente Médio, Marrocos, África do Norte e Brasil devido a sua utilização em pratos típicos, comércio como especiaria, infusos e decoctos de folhas e utilização de seus derivados vegetais na medicina popular (Benamar et al., 2023; Mateus et al., 2023). Essa espécie é nativa da Europa, mas adaptada no Brasil, sendo considerada uma planta medicinal, aromática e condimentar.

No Brasil, as folhas de *M. pulegium* são utilizadas, principalmente, devido ao seu aroma característico quando esmagadas. As formas mais comuns de uso são em chás e tinturas, assim como para dar sabor e refrescância em sucos. Além disso, a *M. pulegium* é uma das 71 espécies presentes na lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais do Sistema Único de Saúde (RENISUS) (Brasil, 2009). Essa lista foi proposta pelo Departamento de Assistência Farmacêutica do Ministério da Saúde brasileiro a fim de valorizar e direcionar pesquisas e estudos com plantas medicinais.

A *M. pulegium* é uma erva rasteira, perene e de crescimento prostrado, podendo atingir de 30 a 50 cm (Figura 1). Essa espécie se caracteriza por possuir numerosas raízes rizomatosas. Os caules são eretos, bastante ramificados e quadrangulares. As folhas são

constituídas de lâminas pecioladas, lanceoladas, pequenas e opostas ao longo do caule, e coloração verde escura. As folhas são pilosas e possuem formato elíptico-oblíquo podendo apresentar bordas dentadas ou lisas, além de liberarem aroma característico quando esmagadas. As flores (Figura 1) são constituídas de inflorescências pequenas de cor róseo-arroxeadas e conformação verticilaster que crescem nas axilas das folhas (Antar e Harley, 2023a; Guedes, 2015).

Figura 1 – Hábito e flores da *Mentha pulegium* cultivados no canteiro do Horto de Plantas Medicinais - UFLA. Do autor, 2023.



Fonte: do autor (2024).

A respeito dos aspectos agrônômicos, existem poucos dados na literatura. A propagação sexuada a partir de sementes pode ser uma forma de cultivo. Entretanto, a semente é muito pequena, o que dificulta a utilização semente em bandejas contendo células e substrato. A germinação pode ocorrer entre 10 e 20 dias após a semente. Para ter sucesso no transplante para a área de interesse é recomendado que a plântula se estabeleça bem (Guedes, 2015).

Já a propagação assexuada ou vegetativa também é possível, a partir de estacas apicais e nodais 2-5 cm, com inoculação em substrato convencional em bandejas com células. Desta

forma, é possível que entre 20 e 30 dias se tenham plantas enraizadas. Segundo Guedes (2015), outra forma de propagação é através do corte das raízes que surgem ao redor da planta nos pontos que a planta toca no solo. Essas raízes ou rizomas podem ser colocadas em bandejas de germinação com substrato específico, entre eles, casca de árvore, turfa e composto, com bastante rega de água. Os propágulos se estabelecem cerca de 4 semanas após o plantio.

A *M. pulegium* prospera em solos ricos e bem drenados, beneficiando-se de exposição solar adequada. Possui uma alta demanda por água, especialmente durante o verão, ou em temperaturas mais elevadas. Porém, é fundamental que o solo possua boa capacidade de drenagem, uma vez que não tolera solos excessivamente úmidos (Guedes, 2015). O cultivo de *M. pulegium* para melhor produção de biomassa e acúmulo de nutrientes pode ser realizada em espaçamento de 0,20 x 0,40 m e 0,30 x 0,60m.

Embora seja resistente, enfrenta desafios em invernos com excesso de chuva e geadas. Além disso, a planta não se desenvolve bem quando a temperatura permanece consistentemente abaixo de -8 °C (Guedes, 2015). Já o cultivo *in vitro* também é possível e relatado na literatura, e será descrito no item 2.3.

2.2 Composição química e atividade biológica

As folhas do poejo são uma poderosa fonte de fitoquímicos e utilizadas em suas várias formas extrativas na medicina popular para tratar desordens humanas. No extrato hidrometanólico à 70% já foram encontradas quantidades significativas de polifenóis, derivados de ácidos hidroxibenzoicos e cinâmicos (clorogênico, cafeico, rosmarínico e ferúlico) e do grupo das flavonas/flavonóis (catequinas, quercetina, neohesperidina, luteolina, diosmina e apigenina) (Aires et al., 2016). No mesmo estudo, foi observado que essas moléculas possuem potente atividade antioxidante e antibacteriana contra cepas isolada em ambiente hospitalar de *Staphylococcus aureus* (Aires et al., 2016).

O extrato hidroalcolico de *M. pulegium* tem efeitos antinociceptivos agudos devido à diminuição do influxo de cálcio através dos canais de cálcio na membrana dos neurônios da via da dor, o que leva a diminuição na sensação de dor (Mokhtari et al., 2009). Também foi verificado efeito espasmolítico em íleo isolado de ratos, o que pode explicar o seu uso tradicional contra a diarreia (Estrada-Soto et al., 2010).

Outro grupo de metabólitos secundários que determinam a importância da *M. pulegium* é o seu óleo essencial. Os óleos essenciais são definidos pela International Organization for Standardization (ISO 9235, 2021) como produtos obtidos a partir do material

vegetal por hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação seca, e por fim expressão mecânica de frutos cítricos. As substâncias presentes no óleo essencial, em sua maioria terpênicas e fenilpropanoídicas, possuem baixo peso molecular, considerável volatilidade e em especial atividades biológicas marcantes.

De acordo com a base de dados Scopus (2024), o óleo essencial de *M. pulegium* tem sido estudado com maior número de publicações a partir dos anos 2000 de forma crescente e exponencial. Os países que mais se destacam é o Iran, Marrocos e Algéria, sendo o Brasil em oitavo lugar, e as áreas científicas mais publicadas são agricultura e ciências biológicas, farmacologia e toxicologia, bioquímica e medicina.

Messaoudi et al., (2022) verificaram atividade anti-*Candida albicans* para o óleo essencial de *M. pulegium* cultivada na Algéria e obtido por hidrodestilação (0,204%, p/v). Nas análises químicas deste estudo foram identificados 26 compostos, sendo a pulegona (74,81%) o principal e mais importante componente do óleo essencial, seguido pela mentona (13,01%), piperitona (3,82%), limoneno (1,55%) e *cis*-isopulegona (1,31%).

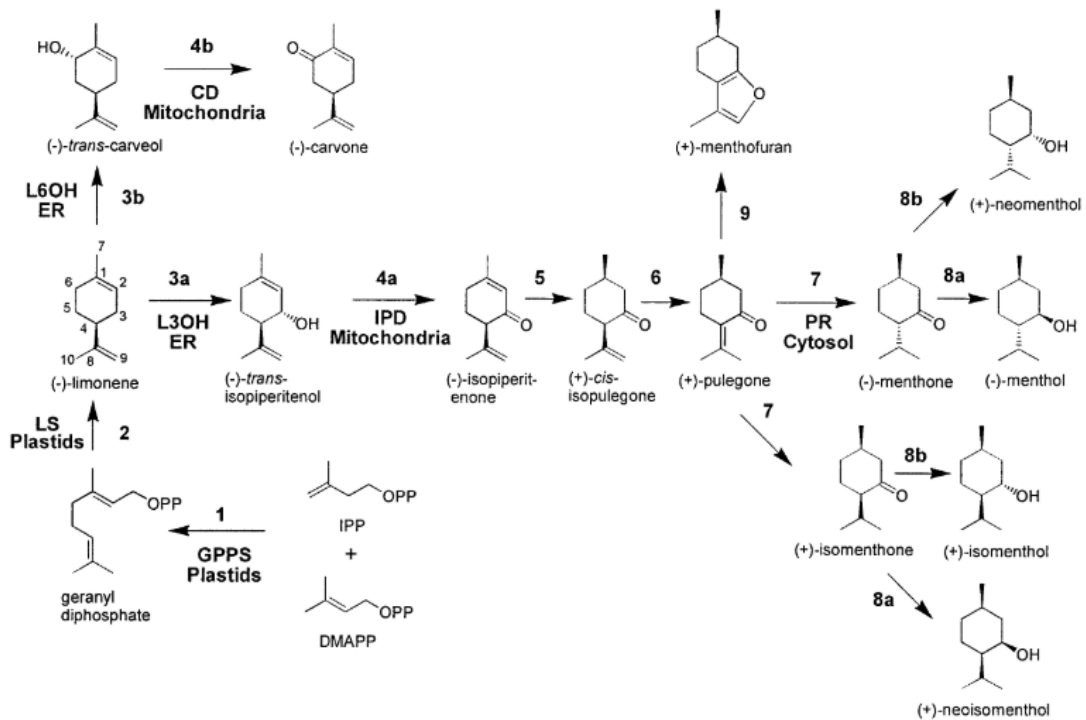
A pulegona é o composto majoritário do óleo essencial de *M. pulegium* e alvo de pesquisas devido ao seu grande potencial biocida contra microorganismos e insetos de amplo espectro (Oualdi et al., 2023; Ainane et al., 2023; Mateus et al., 2022).

Entretanto, é constatado na literatura a variação da pulegona na composição do óleo essencial, podendo atingir desde 27% a 87% nas regiões da Algéria, Marrocos, Portugal, Italia e Chile. Portanto, a existência de quimiotipos, formas de cultivo ou fatores edafoclimáticos influenciam a produção desses metabólitos, sendo essencial os estudos para se ter uniformidade no óleo essencial (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Messaoudi et al., 2022).

A biossíntese da pulegona em *Mentha* ocorre a partir de uma rota plastídica com o precursor MEP (metil-eritritol-fosfato), iniciando-se com geranyl-difosfato (GPP), a molécula base dos terpenos, que logo após sofre uma série de reações enzimáticas específicas (Figura 2). Estudos de imunocitoquímica realizados por Turner e Croteau (2004) foram reportadas a localização de quatro enzimas envolvidas na biossíntese dos monoterpenos *p*-mentanos em hortelã: geranyl difosfato sintase (GPPS, uma preniltransferase que condensa IPP e DMAPP para produzir o precursor C10 do (2)-limoneno; (2)-(4S)-limoneno-6-hidroxilase (L6OH, realiza a hidroxilação regioespecífica do limoneno, a limoneno-3-hidroxilase está relacionada na produção do isopiperitenol); (-)-*trans*-isopiperitenol desidrogenase (IPD, oxidação de isopiperitenol em isopiperitenona) e pulegona redutase (PR, catalisa a redução da ligação dupla D^{4,8} para produzir mentona e, na sequência o mentol). Todos foram localizados nas células secretoras dos tricomas glandulares peltados com marcação abundante correspondente

à fase secretora do desenvolvimento da glândula. A marcação com “*imunogold*” da geranyl-difosfato sintase ocorreu nos leucoplastos das células secretoras. A marcação da 4S-limoneno-6-hidroxilase foi associada ao retículo endoplasmático das células da glândula, a marcação da (-)-*trans*-isopiperitenol desidrogenase foi restrita às mitocôndrias das células secretoras, enquanto a marcação da (1)-pulegona redutase ocorreu apenas na secreção citoplasma celular (Turner e Croteau, 2004).

Figura 2 – Biossíntese de pulegona e suas formas reduzidas.



Fonte: Turner e Croteau, 2004.

Devido aos componentes do óleo essencial obtido de *M. pulegium*, assim como seu extrato, tem sido utilizado tradicionalmente nas últimas décadas na preparação de alimentos como antisséptico (Shahrajabian e Sun, 2023). Recentemente, estudos para a biossíntese de nanopartículas já estão sendo desenvolvidos pelo método de síntese verde mostrando um avanço em comparação com outros métodos porque são relativamente reprodutíveis, ecológicos e prontamente disponíveis e muitas vezes levam a materiais mais estáveis (Dousari et al., 2023; Mahboubi e Haghi, 2008).

Na Europa, o poejo também é popularmente denominado de planta mosquito (Miraj; Kiani, 2016). Na última década houve aumento do interesse em relação as potenciais aplicações do óleo essencial de *M. pulegium*, especialmente como biocida contra pragas. O óleo essencial de *M. pulegium* é rico em monoterpenos oxigenados como pulegona e mentona,

estas possuem aplicações para fins de repelência de insetos e inseticida, utilizado tradicionalmente (Niroumand et al., 2016). A fumigação e o efeito inseticida a partir do óleo essencial de *M. pulegium* contendo alto conteúdo de pulegona (83,3%) em *Musca domestica* e *Spodoptera littoralis* demonstraram resultados promissores em comparação com outros óleos essenciais (Pavela, 2005; 2008).

O óleo essencial do poejo, composto por pulegona (> 99%) na dose de 0,025 microlitro/cm², demonstrou potente atividade acaricida nas espécies de *Dermatophagoides farinae* e *D. pteronyssinus*, que num tempo de exposição de 5 min matou mais de 98% dos ácaros domésticos (Rim e Jee, 2006). Além disso, a toxicidade do óleo essencial de *M. pulegium*, pulegona, mentona, assim como combinações de pulegona-mentona foram avaliadas sobre as espécies *Drosophila melanogaster* e *Bactrocera oleae*, indicando alto potencial inseticida, e mostrando que a pulegona com a presença de mentona apresenta menos toxicidade para as moscas do que os dois compostos individuais (Pavlidou et al., 2004).

O óleo essencial de *M. pulegium* é um antimicrobiano de amplo espectro contra diversas cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurii*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* e o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*, apresentando atividade *in vitro* equivalente ou superior a antimicrobianos usuais, como gentamicina, eritromicina e cloranfenicol (Ait-Ouazzou et al., 2012; Bouyahya et al., 2017; Hajlaoui et al., 2009).

Também foi avaliada a atividade relaxante do óleo essencial de *M. pulegium* e pulegona em músculos lisos isolados da traqueia e da bexiga de ratos, provavelmente mediadas pela inibição do influxo de cálcio (Soares et al., 2012).

Há relatos na literatura que o óleo essencial de *Mentha pulegium* possui propriedades abortivas. O estudo desenvolvido por Soares et al., 2005 indicou que o óleo tem um efeito inibitório na atividade contrátil do miométrio isolado de ratos, sendo, portanto, considerada abortiva.

2.3 Micropropagação de *Mentha pulegium*

A cultura de tecidos é uma ferramenta biotecnológica da expressão da totipotencialidade das células vegetais, e sua potencial organogênese e regeneração em um novo órgão ou uma nova plântula.

Dentre as técnicas da cultura de tecidos, a micropropagação se destaca em sua aplicação na pesquisa e desenvolvimento de novos protocolos de produção de mudas em grande escala e até mesmo as de difícil propagação. Os benefícios são: produção de plantas

com elevada qualidade e livre de patógenos (cultura asséptica), permite o estudo da influência do ambiente na produção de metabólitos secundários de interesse comercial (Espinosa-Leal et al., 2018). Permite a produção sustentável de plantas geneticamente idênticas e livre de patógenos durante o ano todo (Silva et al., 2017). Cada espécie necessita de um protocolo de cultivo *in vitro* de acordo com a finalidade da produção ou pesquisa.

A cultura de tecidos também uma alternativa para estudos fisiológicos e fitoquímicos específicos para as espécies vegetais. Outra possibilidade é a produção de calos, massas celulares indiferenciadas que podem produzir metabólitos secundários de interesse medicinal. Esses compostos químicos podem ser biossintetizados a partir da biotransformação de células e órgãos vegetais, por reações de oxidação, redução, metilação, esterificação e glicosilação (Giri et al., 2001).

Plantas de *Mentha pulegium* foram cultivadas em diferentes condições (casa de vegetação utilizando solo como suporte e ausência solo em condições *in vitro* usando gelose e esferas de vidro) por Benlarbi et al. (2014). Os autores observaram que plântulas cultivadas em condições *in vitro* cresceram mais vigorosamente e exibiram melhor biocinética de crescimento do que aquelas cultivadas em vasos em casa de vegetação. Além disso, houve maior acúmulo de biomassa no cultivo em meio líquido (esferas de vidro) que não foi acompanhada por qualquer aumento significativo na produção de compostos voláteis. Segundo os autores, na ausência de fortes condições de estresse, um alto grau de morfogênese (biomassa, superfície foliar) durante o cultivo *in vitro* levou ao fluxo preferencial de carbono e energia para o crescimento e metabolismo primário. Parece que o aumento da mecânica a impedância do ágar ($0,026 \text{ mg g}^{-1}$ de tecido fresco) às esferas de vidro ($0,028 \text{ mg g}^{-1}$ de tecido fresco) não foi suficiente para desencadear produção massiva de óleo essencial. Entretanto, comparando o teor de pulegona no meio sólido ($5.59 \pm 0.00 \text{ mg mg}^{-1}$ de peso fresco) com o meio líquido ($110.50 \pm 8.24 \text{ mg mg}^{-1}$ de peso fresco), o primeiro foi cerca de 20 vezes menor que o segundo.

O efeito de concentrações de elicitores na produção de metabólitos secundários importantes de suspensão de células de *M. pulegium* também já foram relatadas. A partir de plântulas, calos foram formados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) suplementados com 1 mg L^{-1} , e a quantidade desses metabólitos foram encontradas nos seguintes elicitores, limoneno (60 mg L^{-1} de extrato de levedura), mentona (40 mg L^{-1} de extrato de levedura e 2 mg L^{-1} de ácido salicílico), mentol (6 mg L^{-1} de ácido salicílico), α -pineno (4 mg L^{-1} de ácido salicílico), enquanto pulegona foi encontrada maiores quantidades no controle (Darvishi et al., 2016).

2.4 Luminosidade como fator abiótico no cultivo *in vitro* de plantas medicinais

A luz é a principal fonte de energia para as plantas, através da fotossíntese são capazes de transformar a energia luminosa em energia química para o seu crescimento e desenvolvimento. A qualidade e intensidade da luz são parâmetros ambientais que afetam a micropropagação e o metabolismo secundário das plantas, embora a resposta à luz é espécie-específica (Taiz et al., 2017).

A intensidade luminosa ajustada para cada espécie é imprescindível para uma fotossíntese eficiente. Sob baixa luminosidade, as plantas não produzem fotoassimilados de maneira eficaz, ao passo que sob o estresse luminoso podem sofrer danos, em decorrência da foto-oxidação. Contudo, a intensidade de luz também influencia a biossíntese de metabólitos secundários, tais como terpenos, carotenoides, compostos fenólicos e flavonas/flavonóis, pois quando as plantas são expostas a comprimentos de ondas altamente energéticos, estes metabólitos são produzidos no intuito de controlar os danos causados pela foto-oxidação (Taiz et al., 2017).

Pesquisas com plantas medicinais têm comprovado os efeitos da intensidade de luz no crescimento e no metabolismo secundário de espécies medicinais, como em urtiga (*Urtica dioica*, Urticaceae) (Coelho et al., 2021), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae) (Fernandes et al., 2013), erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae) (Carvalho et al., 2018) e mil-folhas (*Achillea millefolium* L., Asteraceae) (Alvarenga et al., 2015). De acordo com Coelho et al., 2021, a produção de compostos fenólicos, flavonas/flavonóis e atividade antioxidante foi intensificada ao se utilizar maiores intensidades luminosas em *Urtica dioica* L., produzindo 5,53 vezes mais compostos fenólicos em $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Outro aspecto que pode ser utilizado no cultivo *in vitro* é a utilização dos espectros luminosos, assim como combinações de espectros. O espectro de luz também afeta a morfogênese e o metabolismo secundário (Muneer et al., 2014). A luz azul (400-500 nm) é relacionada a processos como fototropismo, fotomorfogênese, abertura estomática, funcionamento fotossintético da folha, assim como acúmulo de carotenóides nas plantas (Whitelam e Halliday, 2007). Por outro lado, a luz vermelha emite um espectro estreito de luz (660 nm) que está próximo da absorção máxima para clorofila e fitocromos (Muneer et al., 2014) esse espectro pode promover o alongamento do hipocótilo e ativar os genes responsáveis pela biossíntese das giberelinas (Darko et al., 2014; Kamiya e García-Martínez, 1999). A luz verde (500-580 nm) diminui a taxa fotossintética em plantas *in vitro*.

Estudos de propagação *in vitro* com plantas medicinais indicam que a manipulação do espectro luminoso pode melhorar o crescimento *in vitro* e o acúmulo de metabólitos secundários de interesse. Um estudo realizado por (Rocha et al., 2022) com a espécie *Lippia dulcis* Trev. avaliaram diferentes espectros de luz, incluindo vermelho (V), azul (A), combinações de azul e vermelho (%A:%V) (30:70, 70:30 e 50:50), diodo emissor de luz branco (LED) (W), verde (Vd), amarelo (Am) obtido por LEDs e luz fluorescente branca fria (FL), ao longo de um período de 45 dias. As análises indicaram que as plântulas cultivadas sob luz vermelha apresentaram uma menor produção de compostos voláteis. De maneira geral, as combinações que proporcionaram melhores resultados foram 50% de luz azul para 50% de luz vermelha e 30% de luz azul para 70% de luz vermelha.

Outra pesquisa, conduzida por Araújo et al., (2021), analisou a espécie *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) sob diferentes espectros de luz de LEDs: branco, verde, amarelo, azul, vermelho e combinações de vermelho e azul (70%V:30%A, 30%V:70%A, 50%V:50%A) e lâmpadas fluorescentes brancas frias. Segundo o autor, a acumulação de compostos orgânicos voláteis foi influenciada pela qualidade espectral da luz. A iluminação com LEDs brancos aumentou os níveis de acetato de linalol nas plântulas, enquanto a luz fluorescente aumentou os teores de α -santaleno e (Z)- β -farneseno. O uso de luz verde e amarela monocromática resultou em um maior acúmulo de lactona de massoia.

No estudo de cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), Lazzarini et al. (2018) verificaram a influência da luz vermelha em maiores biomassas de folhas (32,28 mg/plântula) e biomassa total (58,33 mg/plântula), e a luz LED azul mostrou uma maior produção de carvacrol (48,11%).

Entretanto, a combinação dos espectros luminosos, também podem ser utilizados para otimizar a produção de biomassa. No estudo de cultivo *in vitro* de *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae), observaram que a combinação de luz LED 2,5 vermelho x 1 azul afetou a morfogênese, além de se obter maiores dados biométricos e conteúdo de clorofila (de Hsie et al., 2019). No mesmo estudo, o espectro monocromático azul aumentou o conteúdo de mircenol e limoneno, mas diminuiu o conteúdo de mircenona, que foi aumentado pela luz vermelha. Os maiores teores de pentadecano foram obtidos com o espectro de luz branca e as combinações de luz vermelha e azul.

As lâmpadas LEDs (diodos de emissão de luz) oferecem muitas vantagens como fontes de radiação para as plantas, pois apresentam a emissão de comprimento de onda e intensidade de luz controláveis, distribuição de energia espacial e polarização (Silva et al., 2014). Entretanto as existem dificuldades como por exemplo o custo, que retardam a sua

implementação para aplicações no cultivo de plantas. Com o avanço das tecnologias, as características e o desempenho das lâmpadas LEDs como fontes de radiação para as plantas, tendem a melhorar cada vez mais, porém, essa eficiência varia entre os espectros de luz e as respostas fisiológicas de cada espécie (Lazzarini et al., 2017).

REFERÊNCIAS

AIRES, A. et al. Phytochemical composition and antibacterial activity of hydroalcoholic extracts of *Pterospartum tridentatum* and *Mentha pulegium* against *Staphylococcus aureus* isolates. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.. <https://doi.org/10.1155/2016/5201879>

AIT-OUAZZOU, A. et al. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 313-319, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.004>

AINANE, T. et al. Essential oils rich in pulegone for insecticide purpose against legume bruchus species: Case of *Ziziphora hispanica* L. and *Mentha pulegium* L. **AIMS Agriculture & Food**, v. 8, n. 1, 2023. <https://doi: 10.3934/agrfood.2023005>

ANTAR, G.M.; HARLEY, R.M (A). *Mentha in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB23329>>. Acesso em: 16 nov. 2023

ANTAR, G.M.; HARLEY, R.M (B). *Mentha in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB23330>>. Acesso em: 03 out. 2023

ALVARENGA, I. C. A. et al. In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, p. 299-308, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>

ARAÚJO, D. X. et al. Photon flux density and wavelength influence on growth, photosynthetic pigments and volatile organic compound accumulation in *Aeollanthus suaveolens* (Catinga-de-mulata) under *in vitro* conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 168, p. 113597, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113597>

BENAMAR, K. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the population of Ain Chkef (North central Morocco). **Ethnobotany Research and Applications**, v. 26, p. 1-23, 2023. <https://doi.org/10.32859/era.26.4.1-23>

BENLARBI, K. H. et al. Influence of *in vitro* growth conditions in the production of defence compounds in *Mentha pulegium* L. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 233-244, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.03.007>

BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, v. 45, p. 949-958, 2022. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170889>

BRASIL, Ministério da Saúde, DAF/SCTIE. RENISUS 19 de fevereiro de 2009. Publica a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/ppnpmf/renisus>>. Acesso em: 07.02.2024.

- BOUYAHYA, A. et al. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 41-49, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.015>
- CARVALHO, A. A. de et al. Growth and volatiles in the micropropagation of Santa Maria herb. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, p. 624-635, 2018. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20180071>
- COELHO, A. D. et al. Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, p. 59-74, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01992-2>
- COIMBRA, A. et al. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of six commercial essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 76, n. 1, p. ovac042, 2023. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac042>
- COSSA, M. C.V. et al. Impact of photon flux density and light spectral quality on biomass production and arbutin compound accumulation in *Origanum majorana* L. plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 156, n. 1, p. 12, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02658-5>
- DARKO, E. et al. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1640, p. 20130243, 2014. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0243>
- DARVISHI, E. et al. *In vitro* induction of α -pinene, pulegone, menthol, menthone and limonene in cell suspension culture of pennyroyal (*Mentha pulegium*). **Cellular and Molecular Biology**, v. 62, n. 3, p. 7-9, 2016. <https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.3.2>
- DE CARVALHO, A. A. et al. Densidade do fluxo de fótons e tipos de citocininas influenciam a produção de biomassa e acúmulo de compostos orgânicos voláteis em *Dysphania ambrosioides* L sob condições *in vitro*. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 2, p. e5512239841-e5512239841, 2023. <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i2.39841>
- DE HSIE, B. S. et al. Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 198, p. 111577, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111577>
- DOMINGUES, P. M.; SANTOS, L.. Essential oil of pennyroyal (*Mentha pulegium*): Composition and applications as alternatives to pesticides—New tendencies. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111534, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111534>
- DOUSARI, A. S. et al. *Mentha pulegium* as a source of green synthesis of nanoparticles with antibacterial, antifungal, anticancer, and antioxidant applications. **Scientia Horticulturae**, v. 320, p. 112215, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112215>

DUTA-CORNESCU, G. et al. Somaclonal variation—Advantage or disadvantage in micropropagation of the medicinal plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 838, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>

EL HASSANI, F. Z.. Characterization, activities, and ethnobotanical uses of *Mentha* species in Morocco. **Heliyon**, v. 6, n. 11, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05480>

ESPINOSA-LEAL, C. A.; PUENTE-GARZA, C. A.; GARCÍA-LARA, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, p. 1-18, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>

ESTRADA-SOTO, S. et al. Spasmolytic effect of *Mentha pulegium* L. involves ionic flux regulation in rat ileum strips. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 46, n. 2, p. 107-117, 2010. <https://doi.org/10.1540/jsmr.46.107>

FERREIRA, L. et al. Análise da rotulagem de suplementos alimentares à base de plantas utilizados no sistema nervoso central. **Acta Port Nutr, Porto**, n. 24, p. 12-16, 2021. | <http://dx.doi.org/10.21011/apn.2021.2403>

FERNANDES, V. F. et al. Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 419-424, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000041>

GIRI, A. et al. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. **Biotechnology advances**, v. 19, n. 3, p. 175-199, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00054-4)

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GUEDES, J. I. S. (2015). **A influência do modo de produção (ar livre e estufa em solo) e da variedade na produtividade em matéria vegetal verde, no rendimento na extração de óleo essencial e nas características qualitativas do óleo essencial do Poejo (*Mentha pulegium* L.)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal, 2015.

HAJLAOUI, H. et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 2227-2238, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0130-3>

International Organization for Standardization. *ISO 9235:2021. Aromatic natural raw materials - Vocabulary*. International Organization for Standardization: Geneva, 2021.

KAMIYA, Y.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. **Current opinion in plant biology**, v. 2, n. 5, p. 398-403, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00012-6)

LAWRENCE, B. M. **Mint The Genus Mentha**. 1° ed., NY: CRC press, Taylor and Francis Group, 2006. <https://doi.org/10.1201/9780849307980>

LAZZARINI, L. E. S. et al. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas: revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137-144, 2017. <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v16n1p137-144>

LAZZARINI, L. E. S. et al. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 135, p. 367-379, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1470-1>

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G.. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 119, n. 2, p. 325-327, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.023>

MATEUS, D. M.R.; COSTA, F. MC; TRIÃES, R. P. Essential Oils of Plants as Biocides Against Microorganisms Isolated from Portuguese Convent of Christ in Tomar. In: **International Conference on Environmental Science and Technology**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 129-139. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28212-6>

MESSAOUDI, M. et al. Effect of Extraction Methods on Polyphenols, Flavonoids, Mineral Elements, and Biological Activities of Essential Oil and Extracts of *Mentha pulegium* L. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules27010011>

MIRAJ, S., & KIANI, S. Study of pharmacological effect of *Mentha pulegium*: A review. **Der Pharmacia Lettre**, 8(9), 242-245, 2016.

MOKHTARI, MOKHTAR; SHARIATI, MEHRDAD; KHODAPARAST, L. The antinociceptive effect of hydro-alcoholic extract of leave *Mentha pulegium* in formalin test in male rat. **Journal of Shahrekord University of Medical Sciences**, v. 10 n. 4, p. 7-12, 2009. <https://www.sid.ir/paper/58523/en>

MUNEER, S. et al. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 4657-4670, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms15034657>

NIROUMAND, M. C. et al. An evidence-based review on medicinal plants used as insecticide and insect repellent in traditional Iranian medicine. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 18, n. 2, 2016. <https://doi.org/10.5812/ircmj.22361>

OUALDI, I. et al. Chemical composition and antimicrobial properties of Moroccan *Mentha pulegium* L. essential oil. **Materials Today: Proceedings**, v. 72, p. 3768-3774, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.09.318>

PAVELA, R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 691-696, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.06.001>

PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to**

Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, v. 22, n. 2, p. 274-278, 2008. <https://doi.org/10.1002/ptr.2300>

PAVLIDOU, V. et al. Insecticidal and genotoxic effects of essential oils of Greek sage, *Salvia fruticosa*, and mint, *Mentha pulegium*, on *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). **J. Agric. Urban Entomol**, v. 21, n. 1, p. 39-49, 2004. <http://entweb.clemson.edu/jaue.html>

RIM, I.; JEE, C. Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). **The Korean Journal of Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 133, 2006. <https://doi.org/10.3347/kjp.2006.44.2.133>

ROCHA, T. T. et al. In vitro culture of *Lippia dulcis* (Trev.): light intensity and wavelength effects on growth, antioxidant defense, and volatile compound production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 58, n. 4, p. 636-652, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10270-z>

RUBIO, C. et al. Evaluation of metal concentrations in mentha herbal teas (*Mentha piperita*, *Mentha pulegium* and *Mentha* species) by inductively coupled plasma spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 71, p. 11-17, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.07.015>

SCOPUS. Base científica. Acesso em 21 de dezembro de 2023. Disponível em: <https://www-scopus.ez26.periodicos.capes.gov.br/term/analyzer.uri?sort=plf-f&src=s&sid=281550c7ad6cd7c1137e665a9a7a756c&sot=a&sdt=a&sl=32&s=TITLE-ABS-KEY%28%22Mentha+pulegium%22%29&origin=resultslist&count=10&analyzeResults=Analyze+results>

SILVA, M. M.A. et al. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets *in vitro*. In: **Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII**. SPIE, 2014. p. 373-380. <https://doi.org/10.1117/12.2036200>

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)**, v. 129, p. 501-510, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1195-6>

SINGH, P. R.; SINGH, L. J. *In vitro* propagation for improvement of medicinal plants: a review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 10, n. 1, p. 1484-1489, 2021.

SHAHRAJABIAN, M. H.; SUN, W. Great health benefits of essential oils of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.): a natural and organic medicine. **Current Nutrition & Food Science**, v. 19, n. 4, p. 340-345, 2023. <https://doi.org/10.2174/1573401318666220620145213>

SOARES, P. M. G. et al. Inhibitory effects of the essential oil of *Mentha pulegium* on the isolated rat myometrium. **Planta médica**, v. 71, n. 03, p. 214-218, 2005. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837819>

SOARES, P. M. G. et al. Relaxant effects of the essential oil of *Mentha pulegium* L. in rat isolated trachea and urinary bladder. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 12, p. 1777-1784, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01558.x>

TAFRIHI, M. et al. The wonderful activities of the genus *Mentha*: Not only antioxidant properties. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1118, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26041118>

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal 6ª ed.** Porto Alegre: Editora Artmed, 858p., 2017.

TURNER, G. W.; CROTEAU, R. Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. **Plant physiology**, v. 136, n. 4, p. 4215-4227, 2004. <https://doi.org/10.1104/pp.104.050229>

YOUSEFI, M. et al. Effects of dietary Pennyroyal essential oil on growth performance, digestive enzymes' activity, and stress responses of common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture Reports**, v. 30, p. 101574, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101574>

WHITELAM, G. C.; HALLIDAY, K. J. (Ed.). **Annual plant reviews, light and plant development**. John Wiley & Sons, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470988893>

CAPÍTULO 2

Artigo 1

Micropropagação de *Mentha pulegium* L.: intensidade e qualidade de luz no crescimento e na produção de compostos voláteis e fenólicos

Resumo

A *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae) é uma espécie medicinal nativa da Europa e adaptada ao Brasil. Contudo, plantas do gênero *Mentha* são matérias-primas de grande importância industrial. A intensidade e qualidade de luz podem afetar as respostas estruturais e químicas em plântulas cultivadas *in vitro*. Objetivou-se avaliar o efeito da intensidade e da qualidade espectral da luz no crescimento e metabolismo de *M. pulegium* cultivada *in vitro*. Segmentos nodais (1 cm) foram excisados de plantas pré-estabelecidas e inoculadas em tubos contendo 15 mL de meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar. A influência da intensidade e da qualidade de luz foi avaliada de forma independente, porém as variáveis de respostas foram as mesmas para ambos experimentos. Após 30 dias de cultivo *in vitro* foram realizadas as análises de crescimento mensurando o comprimento da parte aérea (cm), o número de folhas e as matérias secas (mg) das folhas, do caule, da raiz e total. O metabolismo foi avaliado pelos doseamentos de pigmentos fotossintetizantes e de compostos fenólicos e flavonas/flavonóis totais, assim como análise química da fração volátil. O experimento de intensidade luminosa foi constituído de 5 tratamentos: 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As intensidades de 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tiveram maiores acúmulos de matérias secas, mas não afetaram o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e do constituinte majoritário da fração volátil, a pulegona. No entanto, a análise de componentes principais indicou uma tendência de maior acumulação de pulegona nas plântulas cultivadas sob baixas intensidades luminosas 26 e 51 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Plântulas cultivadas sob 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produziram mais compostos fenólicos e as cultivadas sob intensidade de 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ biossintetizaram mais flavonas/flavonóis. O experimento de qualidade de luz foi realizado empregado-se 6 tratamentos de luz LED: azul monocromático, vermelho monocromático, branco monocromático e as combinações de 30% azul:70% vermelho, 70% azul:30% vermelho e 50% azul:50% vermelho. A luz azul e a combinação de 50% azul:50% vermelho indicaram as maiores respostas biométricas. A luz monocromática azul também proporcionou maior produção de pulegona *in vitro* (80,64%) e a luz monocromática vermelha teve uma queda de cerca de 10% no teor em relação a azul (72,95%). A qualidade espectral da luz não afetou o acúmulo de flavonas/flavonóis, porém o componente azul aumenta o teor de compostos fenólicos em *M. pulegium in vitro*. Na luz branca e 30% de azul:70% de vermelho foram registrados os maiores acúmulos de pigmentos fotossintetizantes. Portanto, o cultivo *in vitro* de *Mentha pulegium* deve ser conduzido em intensidades de luz na faixa de 94 a 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ou sob presença total ou parcial de LED azul.

Palavras-chave: pejo; propagação *in vitro*; intensidade de luz; espectro de luz; pulegona.

Micropropagation of *M. pulegium* L.: intensity and light quality on growth and production of volatiles and phenolic compounds

Abstract

Mentha pulegium L. (Lamiaceae) is a medicinal species native to Europe and adapted to Brazil. However, plants of the *Mentha* genus are raw materials of great industrial importance. Light intensity and quality can affect structural and chemical responses in *in vitro* cultivated plantlets. The objective was to evaluate the effect of light intensity and spectral quality on the growth and metabolism of *in vitro* cultivated *M. pulegium*. Nodal segments (1 cm) were excised from pre-established plants and inoculated into tubes containing 15 mL of MS medium, supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and 5.5 g L⁻¹ agar. The influence of light intensity and quality was evaluated independently, but the response variables were the same for both experiments. After 30 days of *in vitro* cultivation, growth analyses were performed by measuring shoot length (cm), number of leaves, and dry matter (mg) of leaves, stem, root, and total. Metabolism was assessed by quantifying photosynthetic pigments and total phenolic and flavones/flavonols compounds, as well as chemical analysis of the volatile fraction. The light intensity experiment consisted of 5 treatments: 26, 51, 69, 94, and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Intensities of 94 and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resulted in higher dry matter accumulation, but did not affect the content of photosynthetic pigments and the major constituent of the volatile fraction, pulegone. However, principal component analysis indicated a tendency for higher pulegone accumulation in plantlets grown under low light intensities of 26 and 51 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Seedlings grown under 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produced more phenolic compounds, and those cultivated under an intensity of 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ synthesized more flavones/flavonols. The light quality experiment was conducted using 6 LED light treatments: monochromatic blue, monochromatic red, monochromatic white, and combinations of 30% blue:70% red, 70% blue:30% red, and 50% blue:50% red. Blue light and the combination of 50% blue:50% red showed the greatest biometric responses. Monochromatic blue light also provided greater *in vitro* pulegone production (80.64%), while monochromatic red light exhibited a decrease of about 10% in content compared to blue (72.95%). Spectral quality of light did not affect the accumulation of flavones/flavonols, but the blue component increased the content of phenolic compounds in *in vitro* *M. pulegium*. The highest accumulations of photosynthetic pigments were recorded under white light and 30% blue:70% red. Therefore, *in vitro* cultivation of *M. pulegium* should be conducted under light intensities in the range of 94 to 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ or under total or partial presence of blue LED.

Keywords: pennyroyal; *in vitro* propagation; light intensity; light spectrum; pulegone.

1. INTRODUÇÃO

Mentha pulegium L. (Lamiaceae), conhecida como “poejo”, “poejo-real”, “poejinho-da-horta”, é considerada uma planta medicinal, aromática e condimentar, nativa da Europa, e adaptada no Brasil. No Brasil, *M. pulegium* é uma das 71 espécies presentes na lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais do Sistema Único de Saúde (RENISUS) (Brasil, 2022) que tem a finalidade de orientar pesquisas e estudos. Diversas propriedades biológicas são relatadas para a espécie: antimicrobiano (Ait-Ouazzou et al., 2012; Bouyahya et al., 2017); relaxante muscular (Soares et al., 2012), antioxidante (Al-Rajhi et al., 2022), antiviral (Parsania et al., 2017), inseticida (Domingues e Santos, 2019; Topuz, 2023), acaricida (Rim & Jee, 2006). Constituintes voláteis das espécies de *Mentha* são utilizados comercialmente em bebidas alcoólicas, cremes dentais, cigarros e enxaguatórios bucais, medicamentos e produtos alimentícios devido à presença de pulegona, mentol, 1,8-cineol, carvona, mentona, dentre outros (Başer et al., 2012; Eftekhari et al., 2021)

Sabe-se que o conteúdo de metabólitos secundários afeta a qualidade das plantas utilizadas para consumo alimentar ou medicinal. Um conjunto variado de fatores bióticos e abióticos desempenha um papel crucial no crescimento e metabolismo dessas plantas. Dentre eles, a luz se destaca como um dos principais fatores abióticos que exercem impacto significativo nesse processo. Diversos estudos tem apontado os impactos da intensidade e qualidade de luz no crescimento e no metabolismo secundário de espécies medicinais, como em urtiga (*Urtica dioica* L., Urticaceae) (Coelho et al., 2021), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae) (Fernandes et al., 2013), erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae) (Carvalho et al., 2018), e mil-folhas (*Achillea millefolium* L., Asteraceae) (Alvarenga et al., 2015), capim-doce (*Lippia dulcis* Trev., Verbenaceae) (Rocha et al., 2022), *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) (Araújo et al., 2021), *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* (P. Silva e M. Silva) Hinz (Plantaginaceae) (Silva et al., 2022), *Origanum majorana* L. (Cossa et al., 2024). No entanto, cada espécie responde de forma específica aos diferentes estímulos de luz.

Apesar da *Mentha pulegium* não ter problema na propagação seminal ou vegetativa (Ebraheem et al., 2020; Monteiro et al., 2020), sendo uma importante matéria-prima para as indústrias farmacêutica, cosmética, perfumaria e alimentícia se faz necessário a propagação em larga escala e com qualidade. A *M. pulegium* é uma espécie rasteira cujo cultivo em solo tem a desvantagem de aumentar o teor de cinzas no material vegetal, além de estar sujeito às variações edafoclimáticas, comprometendo sua qualidade.

Para superar essas dificuldades, a micropropagação é considerada um fator-chave para a realização da propagação em massa de plantas elites e padronizadas em ambiente com condições otimizadas (Ebraheem et al., 2020). Deste modo, conhecer os efeitos da luminosidade na propagação *in vitro* de *M. pulegium* fornece estratégias para as condições ótimas de cultivo e de como a luz afeta seu metabolismo secundário.

Monteiro et al. (2020) reportaram que a luz tem um papel determinante na germinação de sementes de *M. pulegium*. No entanto, não foram encontrados dados na literatura que descrevam os efeitos das condições luminosas ideais para a propagação *in vitro* desta espécie vegetal. Deste modo, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da intensidade luminosa e qualidade espectral no crescimento e metabolismo de *M. pulegium* cultivada *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento e material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, Brasil. A UFLA está situada nas coordenadas geográficas 21° 14' S e 45° 00' W, a 918 m de altitude. Segundo a classificação de Sá Júnior et al. (2012), o clima regional predominante, de acordo com metodologia proposta por Köppen, é do tipo Cwa, com inverno seco e verão quente.

Explantos foram obtidos a partir de plantas matrizes de *Mentha pulegium*, cultivadas em canteiro de dimensões de 6 x 1,20m localizado no Horto de Plantas Medicinais - UFLA. As plantas foram previamente adubadas com 3,0 kg.m² de esterco bovino e irrigados periodicamente (4 vezes) por semana. No período de floração o material vegetal foi herborizado e as exsiccatas depositadas no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), sob registro PAMG 58939 (ANEXO A).

2.2 Estabelecimento e multiplicação *in vitro*

Inicialmente, segmentos apicais e nodais (1 cm) foram retirados das plantas matrizes e passaram pelo processo de desinfestação em água corrente (30 min), seguida por imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50 % (v/v) por 15 min, sob agitação constante. Em seguida, foram enxaguados três vezes com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar horizontal, sendo inoculados na posição vertical em tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem por 20 min, a 121°C e 1 atm de pressão. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1°C, fotoperíodo de 16/8 h, fornecidas por lâmpadas de LED (*light-emitting diode*) branca e irradiância de 39 μmol m⁻² s⁻¹. A cada 30 dias, o material foi repicado até a terceira repicagem, sem reguladores de crescimento e sem variações morfológicas observadas.

2.3 Cultivo sob diferentes intensidades luminosas

Segmentos nodais (1cm) da segunda repicagem foram inoculados no mesmo meio de cultura do estabelecimento e cultivados sob cinco intensidades luminosas: 26, 51, 69, 94 e 130 μmol m⁻² s⁻¹. As intensidades de luz foram medidas por um dispositivo QSO-S

Procheck + Sensor-PAR Photon Flux (Decagon Devices-Pullman-Washington-EUA). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 5 tratamentos e 5 repetições. Cada repetição foi representada por 4 tubos de ensaio, contendo 1 planta por tubo, totalizando 20 plantas por tratamento. Após 30 dias, foram realizadas as avaliações de crescimento e metabolismo.

2.4 Cultivo sob diferentes qualidades de luz

Segmentos nodais (1 cm) da terceira repicagem foram inoculados no mesmo meio de cultura do estabelecimento e cultivados sob diferentes comprimentos de onda de diodos emissores de luz (LED) (TECNAL[®] Piracicaba, Brazil): azul, vermelho; 30% azul : 70% vermelho; 70% azul : 30% vermelho; 50% azul : 50% vermelho; e branco a $42 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), sendo 6 tratamentos com 4 repetições. Cada repetição foi composta por 5 tubos de ensaio, com 1 planta por tubo, totalizando 20 plantas por tratamento. Após 30 dias, foram realizadas as avaliações de crescimento e do metabolismo.

2.5 Análise de crescimento

As plantas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea (cm), número de folhas e massas seca da folha, do caule (mg), da raiz e total (mg). O comprimento da parte aérea (CPA) foi determinado com o auxílio de uma régua, medindo-se da base da brotação até o meristema apical e número de folhas (NF). Para obter os valores de massa seca das folhas (MSF), massa seca do caule (MSC) e massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MST), os respectivas órgãos foram separados com auxílio de um bisturi, acondicionadas em sacos de papel kraft e desidratadas em estufa de circulação de ar forçado, à 37°C, até peso constante. Posteriormente, o material seco foi pesado em balança de precisão.

2.6 Análises metabólicas

2.6.1 Doseamento de pigmentos fotossintéticos

A extração e o doseamento de pigmentos fotossintéticos foram realizados seguindo o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979) com adaptações propostas por Barnes et al. (1992). Em síntese, 50 mg de folhas frescas foram pesadas diretamente em tubos Falcon cobertos com papel alumínio, onde foram adicionados 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3) e incubados em estufa à 65 °C por 48 h. As

amostras foram preparadas em quadruplicata. A saturação do DMSO seguiu o protocolo de Santos et al. (2008) com modificações. Para isto, o DMSO foi saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3) na proporção de 5 g L^{-1} de DMSO, sob agitação constante por quatro horas, e então filtrado duas vezes à vácuo em papel de filtro duplo. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min.

Em seguida, três alíquotas de 3 mL de cada réplica foram transferidas para cubeta de quartzo, e os valores de densidade óptica em 480, 649 e 665 nm foram lidos em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control[®] (versão 3.37), contra DMSO saturado em branco. O valor de densidade óptica específica de cada amostra foi calculado pela média das leituras das três alíquotas.

Os comprimentos de onda e as equações utilizadas para os cálculos foram baseados na metodologia de Wellburn (1994), sendo:

$$\text{Clorofila } a = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$\text{Clorofila } b = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

$$\text{Carotenoides: } (1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b)/220.$$

A clorofila total ($a + b$) foi calculada pelo somatório dos resultados encontrados das equações para clorofila a e b , sendo todos os resultados expressos em mg g^{-1} de massa fresca.

2.6.2 Doseamento de compostos fenólicos e flavonas/flavonóis totais

Folhas secas provenientes dos experimentos foram pulverizadas por trituração em gral e pistilo. Em microtubos de 5 mL foram pesados 30 mg de folhas de *M. pulegium* pulverizada e adicionado 3 mL de etanol a 70%. Os microtubos foram mantidos em ThermoMixer (Eppendorf ThermoMixer[®] F2.0) durante 24h, empregando-se 3 ciclos de agitação a 400 rpm durante 10 min h^{-1} . O extrato foi centrifugado durante 10 min a 8000rpm e o sobrenadante utilizado para os ensaios.

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (Singleton e Rossi, 1965). Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 20 μL do extrato, 120 μL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu (10% v/v) e 120 μL de Na_2CO_3 (7,0% p/v). A absorbância foi mensurada a 760 nm, após 2 h de incubação em ambiente escuro e temperatura ambiente. A curva de calibração foi construída a partir de solução mãe de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de ácido gálico (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$) na faixa de 0,0078 a $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$. O conteúdo dos compostos fenólicos totais foi calculado a partir da equação $y = 62,481x + 0,0947$, $R^2 = 0,9999$. Os dados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de massa seca de folha (mgEAG gMSF^{-1}).

A quantificação de flavonas/flavonóis empregou-se a metodologia de Pękal e Pyrzynska (2014) com modificações. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 100 μL da amostra seguidas de 100 μL de AlCl_3 (10%) preparados em etanol a 70%. Em seguida, as amostras foram incubadas em ambiente escuro durante 40 min. A absorbância foi mensurada a 420 nm. A curva de calibração foi obtida a partir de solução mãe de 1,5mg mL^{-1} de quercetina (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$) na faixa de 0,0117 a 0,1875 mg mL^{-1} . A quantificação de flavonas/flavonóis nas amostras foi realizada a partir da equação $y = 26,916x + 0,0904$, $R^2 = 0,9994$, sendo os resultados expressos em miligrama equivalente de quercetina por grama de massa seca de folha (mgEQ gMSF^{-1}). Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas.

2.6.3 Análises químicas da fração volátil

As análises químicas da fração volátil foram realizadas em 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, e velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas 40-400 m/z .

Para extração da fração volátil, empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, foi utilizado o extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System* (CTC Analytics AG, Switzerland), acoplado ao sistema de CG/EM. Alíquotas de 30 mg de folhas secas, em triplicatas, 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. Antes da injeção, as amostras foram incubadas por 30 min a 110 °C, com agitação a 250 rpm e a temperatura da seringa foi programada para 120 °C.

Utilizou-se a coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (5%-fenil-metilpolisiloxano, 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 10:1. As temperaturas do injetor e da linha de transferência para o espectrômetro de massas foram mantidas em 240 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C por min até 240 °C, seguida de uma rampa de 10 °C por minuto até 280 °C. As concentrações dos constituintes da fração volátil foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos \pm desvio padrão. Para cada tratamento, as análises foram realizadas em triplicata.

Os constituintes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à série *n*-alcanos (C₉-C₂₀), (Sigma- Aldrich®, St Louis, USA) e comparação dos espectros de massa do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (Adams, 2017). Os índices de retenção foram calculados usando a equação proposta por Dool & Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (Adams, 2017).

2.7 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade com auxílio do *software* SISVAR versão 5.8 (Ferreira, 2011). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando o *software* Statistica®, versão 13.5 (StatSoft – Tulsa, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cultivo sobre diferentes intensidades luminosas

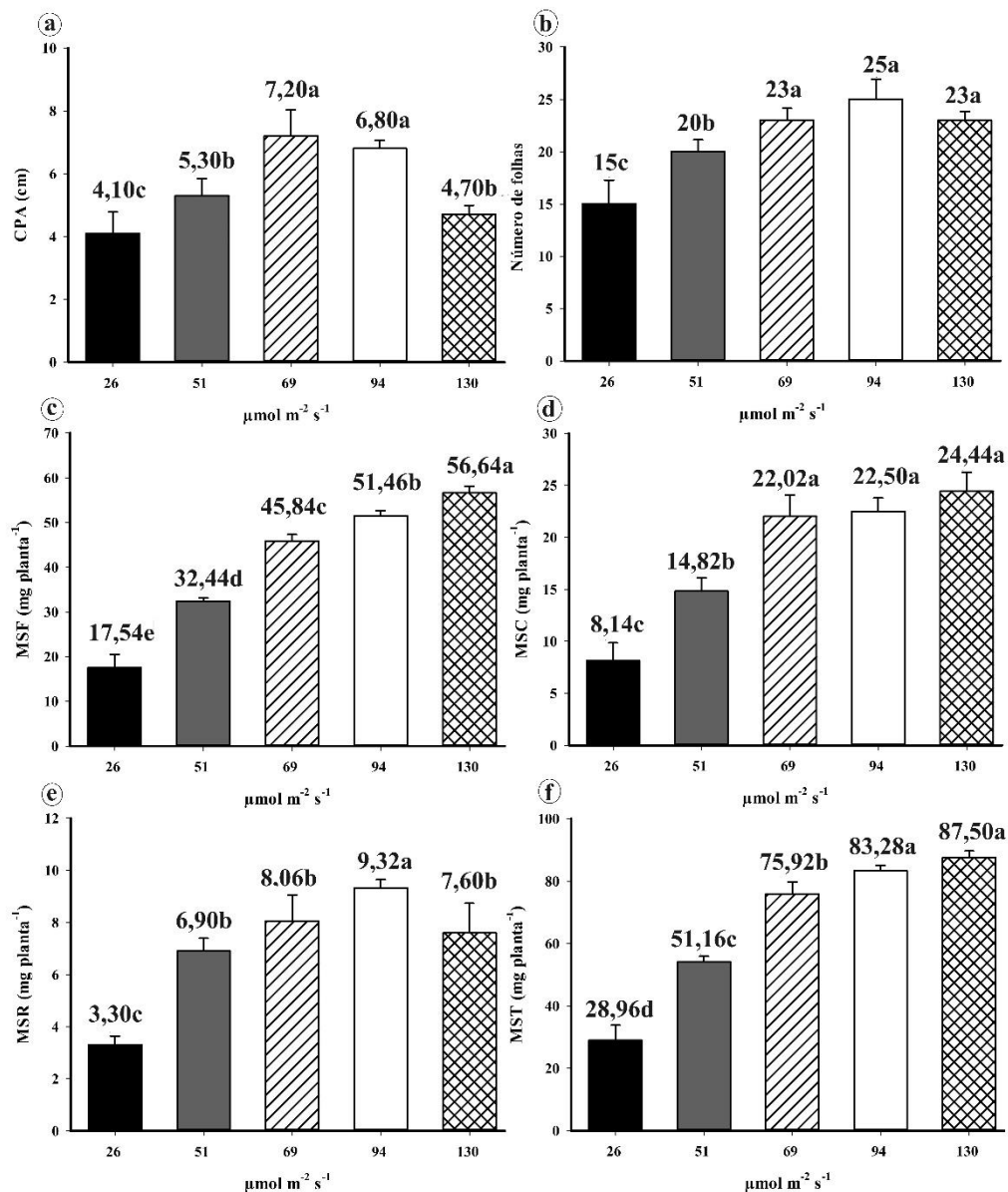
O crescimento *in vitro* de *M. pulegium* foi afetado significativamente ($p > 0,05$) pela intensidade luminosa (Figuras 1 e 2). As plantas cultivadas nas intensidades de 69 e 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram os maiores comprimentos da parte aérea (7,0 cm em média) (Figuras 1 e 2). A intensidade de 26 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi a que mais comprometeu o comprimento e o número de folhas das plântulas de *M. pulegium*. No entanto, nas maiores intensidades luminosas avaliadas (69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o número de folhas foram máximos, não diferindo-se estatisticamente entre si. Contudo, o impacto mais significativo da intensidade luminosa foi observado no acúmulo de massa seca das folhas (MSF). As folhas de *M. pulegium* são a parte vegetativa mais importante da espécie, pois é neste órgão que estão armazenados os constituintes químicos de interesse medicinal e econômico. Houve uma resposta crescente do acúmulo de MSF com o aumento da intensidade luminosa. O ganho de massa seca das das plântulas cultivadas sob a intensidade de 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi cerca de 10% superior em relação àquelas cultivadas sob 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Na menor intensidade de luz (26 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a MSF acumulada foi de 17,54 mg e sob 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi de 56,64 mg, uma amplitude de 3,2 vezes entre a mínima e a máxima MSF.

Maiores intensidades luminosas (94 a 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) também promoveram respostas positivas para o acúmulo de matéria seca de folhas, brotos, raízes e total em *Lippia gracilis* (Lazzarini et al., 2018), *Aeollanthus suaveolens* (Araújo et al., 2021) e *Origanum majorana* (Cossa et al., 2024).

A quantidade de luz, seja em relação a intensidade ou ao fotoperíodo, é recebida pelas plantas através de um mecanismo complexo que inclui a percepção dos sinais luminosos ao nível da folha. A transdução desses sinais para sistemas alvo ativam reações que garantem o controle preciso dos processos fisiológicos e metabólicos (Paik e Huq 2019). Em espécies intolerantes a sombra, pode ocorrer redução da taxa fotossintética devido à baixa presença de luz. Este fenômeno pode reduzir a expressão de genes e a atividade das enzimas do ciclo de Calvin envolvidas na fixação de CO_2 e a regeneração da rubisco-1,5-bifosfato (RuBP), diminuindo assim o potencial de assimilação de carbono nas plantas (Tang et al., 2022). Apesar do suprimento exógeno de carbono nas condições *in vitro*, sob baixas intensidades luminosas, as reações que controlam a fixação do carbono podem não ter sido ativadas, prejudicando o acúmulo de matéria seca nas folhas de *M. pulegium* nestas condições. A produção de matéria fresca no gênero *Mentha*, em condições *ex vitro*, já foi demonstrada que

são significativamente afetadas pela intensidade de luz e, também pelo fotoperíodo (Souza et al., 2015; Burbott; Loomis, 1967).

Figura 1 – Comprimento da parte área (CPA) (a), número de folhas (b) e acúmulo de massas secas de folhas (MSF) (c), caule (MSC) (d), raiz (MSR) (e) e total (MST) (f) de plantas de *Mentha pulegium* cultivadas *in vitro* durante 30 dias sob diferentes intensidades luminosas.



Médias seguidas pela mesma letra nas barras não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Figura 2 – Plântulas de *M. pulegium* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades luminosas, durante 30 dias em sala de crescimento.



Fonte: do Autor (2024).

Com relação as demais variáveis e de forma geral, nas maiores intensidades foram observados maiores acúmulos de massa seca no cultivo *in vitro* de *Mentha pulegium*. Para a massa seca total, por exemplo, observou-se que não houve diferença significativa entre as intensidades de 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Apesar da intensidade de 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ter comprometido o acúmulo de massa seca de raízes (Figura 1).

Segundo Halliday et al. (2009), conforme a condição luminosa que as plantas são expostas, o equilíbrio hormonal, mais especificamente no balanço de auxinas, pode ser afetado. Este fenômeno pode promover mudanças fisiológicas, como alongamento de caule ou produção de maior massa seca total. Resultados similares foram observados para a espécie de *Mentha arvensis* e *Mentha viridis*, em que foram observados correlação positiva com o aumento da intensidade luminosa de 26 para 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e acúmulo de massa seca total (Alvarenga et al., 2017; Oliveira et al., 2021).

O tratamento de menor irradiância ($26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inibiu significativamente o acúmulo de massa seca em todos os parâmetros avaliados (MSF, MSC, MSR e MST) em *M. pulegium*. Isto, possivelmente, pode estar relacionado ao fato de que a baixa disponibilidade de luz dificulta o potencial da planta de mobilizar o aparato fotossintético, resultando em baixa taxa de fotoassimilados e, conseqüentemente, no baixo acúmulo de massa seca (Taiz et al., 2017). Os resultados encontrados por Alvarenga et al. (2017) com *Achillea millefolium* e Oliveira et al. (2021) nas espécies de *M. viridis* e *M. arvensis* corroboram com os observados no presente estudo, pois também apresentaram, em baixas condições luminosas, folhas pouco desenvolvidas e acúmulo de massa seca reduzido. Em *Dysphania ambrosioides* L., Carvalho et al. (2023) também observaram menor acúmulo de matéria seca vegetal sob baixa irradiância ($16,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Por outro lado, em estudo com *Lippia rotundifolia* Cham (Verbenaceae), Hsie et al. (2019) observaram que irradiâncias consideradas baixas (20 e $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) promoveram o crescimento e o acúmulo de pigmentos fotossintéticos nesta espécie.

Portanto, cada espécie responde de forma diferente às condições luminosas para o seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Já em *Achillea millefolium*, a baixa luminosidade beneficiou o crescimento *in vitro* da espécie (Alvarenga et al., 2015). Sendo assim, a propagação *in vitro* de plantas medicinais necessita do controle da irradiância conforme a espécie (Cavallaro et al., 2022). Cada genótipo possui uma resposta única ao regime de luz a que é exposto, o que torna necessário determinar condições ideais de iluminação para cada espécie.

3.2 Pigmentos fotossintetizantes, compostos fenólicos e flavonas/flavonóis sob diferentes intensidades luminosas

Os teores de clorofilas *a* e *b* de *M. pulegium* cultivados *in vitro* não foram afetados significativamente ($p > 0,05$) pelas diferentes intensidades de luz (Tabela 1). O teor de carotenoides totais foi maior na intensidade $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo cerca de 25% maior que os demais tratamentos. Segundo Taiz et al. (2017), os carotenoides são pigmentos acessórios que atuam de forma essencial na cascata de fotoproteção nas membranas fotossintéticas, e que quando são expostas a grandes quantidades de energia absorvida podem ser facilmente danificadas (Taiz et al., 2017). Este fenômeno pode ter ocorrido nas plântulas cultivadas sob as intensidades de 94 e $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabela 1 – Conteúdos de pigmentos fotossintéticos em *M. pulegium* cultivadas durante 30 dias sob diferentes intensidades de luz.

Intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Pigmentos (mg.g^{-1})				
	<i>Cl. a</i>	<i>Cl. b</i>	<i>Cl. Total</i>	Carotenóides	<i>Cl. a/b</i>
26	$1,11 \pm 0,06a$	$0,37 \pm 0,02a$	$1,48 \pm 0,08ab$	$0,27 \pm 0,02b$	3,00a
51	$1,11 \pm 0,05a$	$0,34 \pm 0,07a$	$1,45 \pm 0,04ab$	$0,27 \pm 0,04b$	3,26a
69	$1,14 \pm 0,02a$	$0,41 \pm 0,02a$	$1,55 \pm 0,02a$	$0,34 \pm 0,03a$	2,78a
94	$1,08 \pm 0,07a$	$0,32 \pm 0,01a$	$1,41 \pm 0,07b$	$0,26 \pm 0,02b$	3,37a
130	$1,06 \pm 0,06a$	$0,37 \pm 0,03a$	$1,43 \pm 0,09ab$	$0,25 \pm 0,01b$	2,86a
CV(%)	4,93	10,37	8,93	4,30	12,03

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade. Cl: clorofila.

Por outro lado, na biossíntese de clorofila e carotenoides existem genes que regulam a expressão fotossintética, em que os níveis de irradiância desempenham papel fundamental nesse processo (Pham et al., 2018). Ambientes com baixas irradiâncias afetam o processo de fotossíntese, proporcionando aumento ou diminuição dos pigmentos fotossintetizantes. Em geral, maiores quantidades de pigmentos fotossintéticos são observadas em plantas expostas a baixas intensidades luminosas, por outro lado redução no teor de pigmentos fotossintéticos são observados em maiores intensidades luminosas, provavelmente devido a processos de fotodegradação (Coelho et al., 2021; Oliveira et al., 2021).

Entretanto, os resultados observados em *M. pulegium* demonstraram pequenas variações nos teores de pigmentos fotossintetizantes. Isso pode ser explicado devido a

plasticidade da espécie, embora esse fenômeno esteja sujeito à influência do genótipo e ambiente.

A razão clorofila *a/b* é uma medida utilizada para descrever a proporção entre a quantidade de clorofila *a* e *b* em uma amostra de planta. A razão de clorofila *a/b* pode fornecer informações sobre a eficiência da planta na absorção de luz e na taxa de fotossíntese, isto porque as clorofilas *a* e *b* desempenham papéis distintos no processo de fotossíntese. A clorofila *a* é essencial para a transferência de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, enquanto a clorofila *b* desempenha um papel na coleta de luz acessória. Essa relação pode variar dependendo da planta, das condições de crescimento e de outros fatores ambientais. Na prática, uma relação mais baixa pode indicar adaptação a condições de luz mais branda. (Taiz et al., 2017). Entretanto, no presente estudo não houve variações significativas observadas, dado que não houve diferença estatísticas entre os teores de clorofilas *a* e *b*.

A biossíntese de compostos fenólicos está intimamente ligada à irradiância da luz fotossinteticamente ativa e à qualidade espectral. Por isso, a manipulação das condições de luz pode levar a alterações no conteúdo desses metabólitos e, conseqüentemente, a estados alterados de fotoproteção (Sharma et al., 2019). Plântulas expostas a diferentes intensidades luminosas (26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) exibiram diferentes quantidades de compostos fenólicos e flavonas/flavonóis totais ($p > 0,05$). Para o conteúdo de fenólicos totais, a luminosidade de 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ atingiu o valor máximo de 1,06 mg EAG g^{-1} . Já para o teor de flavonas/flavonóis, as intensidades de 26 e 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ acumularam os maiores conteúdos (4,61 e 4,76 mg EQ g^{-1} , respectivamente). Na intensidade de 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a quantidade de flavonas/flavonóis teve uma queda de cerca de 20% em relação ao teor obtido na intensidade de 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 2).

Tabela 2 – Teores de compostos fenólicos e flavonas/flavonóis totais de *Mentha pulegium* cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades luminosas.

Intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	FEN (mg/g EAG) ¹	FLAV mg/g (EQ) ²
26	0,80 ± 0,01d	4,61 ± 0,09a
51	0,79 ± 0,03d	4,38 ± 0,15b
69	0,99 ± 0,01b	4,14 ± 0,18c
94	0,86 ± 0,01c	4,76 ± 0,21a
130	1,06 ± 0,03a	3,8 ± 0,04d
CV(%)	2,42	2,87

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade. ¹Fenóis totais, expressos em mg equivalente de ácido gálico por g de folha seca (mg EAG g⁻¹). ²Flavonas/flavonóis, expressos em mg equivalente de quercetina por g de folha seca (mg QE g⁻¹).

3.3 Análise da fração volátil de *M. pulegium* sob diferentes intensidades luminosas

Na análise química da fração volátil das folhas secas de *M. pulegium* foram identificados 17 constituintes químicos, compreendendo compostos alifáticos (1,96% - 2,09%), monoterpenos hidrocarbonetos (4,99% - 5,78%) e monoterpenos oxigenados (91,53% - 92,71%). Esses compostos consistuíram em mais de 99% da composição química total (Tabela 2). A pulegona foi o constituinte majoritário (76,24% - 77,74%), seguido da piperitenona (8,28%-10,40%).

Assim como observado para os compostos fenólicos, as diferentes intensidades luminosas promoveram alterações na quantidade dos constituintes voláteis. Embora, os teores do constituinte majoritário não tenham apontado diferença expressiva, outros constituintes como a piperitenona teve seu maior acúmulo na intensidade de 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (10,40%), cerca de 20% a mais que as plântulas crescidas sob 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (8,28%). Plântulas sob intensidades luminosas de 69 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ acumularam as maiores porcentagens de mentona (1,31% e 1,81%) e *iso*-mentona (1,83% e 2,79%), respectivamente. Nas intensidades luminosas de 26 e 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ registraram-se maiores teores de limoneno (2,02% e 2,09%, respectivamente).

A composição química volátil de *M. pulegium* já é bem conhecida, sendo estes mesmos constituintes químicos já identificados em outros estudos, porém apresentam concentrações diferentes conforme as condições e regiões de cultivo (Mohammadhosseini et al., 2023; Oualdi et al., 2023; Rayan et al., 2023). A variação da pulegona na composição do óleo essencial pode atingir desde 27% a 87% nas regiões da Algéria, Marrocos, Portugal, Italia, Chile Assim, a existência de quimiotipos, formas de cultivo ou fatores edafoclimáticos influenciam a produção desses metabólitos, sendo essencial os estudos para se ter uma uniformidade no óleo essencial (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Messaoudi et al., 2022).

A pulegona, assim como a combinação de pulegona-mentona, é utilizada pela indústria farmacêutica, alimentícia e agroquímica. O potencial dessas moléculas já foi estudada na literatura, como antimicrobiano (Ait-Ouazzou et al., 2012; Bouyahya et al., 2017); relaxante (Soares et al., 2012), antioxidante (Al-Rajhi et al., 2022), antiviral (Parsania et al., 2017) e inseticida (M. Domingues e Santos, 2019; Topuz, 2023).

No presente estudo, notou-se pequenas variações nos teores dos compostos voláteis de maior interesse em *M. pulegium* cultivadas sob diferentes intensidades luminosas *in vitro* (Figura 3). Entretanto, futuros estudos são necessários para investigar o crescimento e produção dessas moléculas durante a aclimatização e produção em campo.

Tabela 3 – Composição química volátil de plantas de *Mentha pulegium* cultivadas *in vitro* durante 30 dias sob diferentes intensidades de luz.

Compostos	IR*	Intensidades de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)				
		26	51	69	94	130
		Área (%) \pm DP				
Compostos alifáticos		2,09	2,01	2,00	2,00	1,96
3-metil-ciclopentanona	844	0,15 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01	0,28 \pm 0,05	0,17 \pm 0,02
3-metil-ciclohexanona	945	0,63 \pm 0,05	0,54 \pm 0,05	0,40 \pm 0,01	0,36 \pm 0,09	0,27 \pm 0,01
6-metil-5-hepten-2-ona	985	0,14 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,07 \pm 0,03
3-octanol	995	0,90 \pm 0,07	1,23 \pm 0,03	1,33 \pm 0,02	1,27 \pm 0,06	1,45 \pm 0,04
Monoterpenos hidrocarbonetos		5,67	5,58	5,51	5,78	4,99
α -pineno	930	1,89 \pm 0,04	2,04 \pm 0,04	1,87 \pm 0,03	1,88 \pm 0,09	1,75 \pm 0,09
Sabineno	970	0,31 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01	0,35 \pm 0,01	0,35 \pm 0,02	0,30 \pm 0,03
β -pineno	973	1,35 \pm 0,02	1,48 \pm 0,02	1,36 \pm 0,02	1,37 \pm 0,06	1,29 \pm 0,05
p-menta-1(7),8-dieno	1003	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01
Limoneno	1025	2,02 \pm 0,44	1,57 \pm 0,89	1,83 \pm 0,26	2,09 \pm 0,68	1,56 \pm 0,66
Monoterpenos oxigenados		91,47	92,12	91,98	91,53	92,71
1,8-cineol	1027	0,48 \pm 0,01	0,47 \pm 0,02	0,45 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	0,43 \pm 0,02
Mentona	1148	0,53 \pm 0,17	0,37 \pm 0,31	1,31 \pm 0,43	0,90 \pm 0,50	1,81 \pm 0,68
<i>Iso</i> -mentona	1158	0,51 \pm 0,23	0,47 \pm 0,37	1,83 \pm 0,54	1,28 \pm 0,85	2,79 \pm 0,87
<i>Iso</i> -pulegona	1171	2,22 \pm 0,12	1,84 \pm 0,07	1,88 \pm 0,05	1,77 \pm 0,15	1,73 \pm 0,05
Pulegona	1238	76,91 \pm 1,32	77,74 \pm 1,45	76,65 \pm 0,48	76,24 \pm 1,46	76,73 \pm 2,04
Piperitona	1249	0,05 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,18 \pm 0,13	0,07 \pm 0,01	0,33 \pm 0,21
Ni	1259	0,21 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02
<i>Iso</i> -piperitenona	1266	0,27 \pm 0,03	0,28 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02	0,25 \pm 0,05	0,20 \pm 0,02
Ni	1285	0,98 \pm 0,14	0,41 \pm 0,08	0,52 \pm 0,03	0,44 \pm 0,19	0,36 \pm 0,07
Piperitenona	1335	9,81 \pm 0,95	10,30 \pm 0,62	8,81 \pm 0,47	10,40 \pm 0,41	8,28 \pm 0,31
Total (%)		99,73	99,71	99,52	99,31	99,66
Números de compostos		17	17	17	17	17

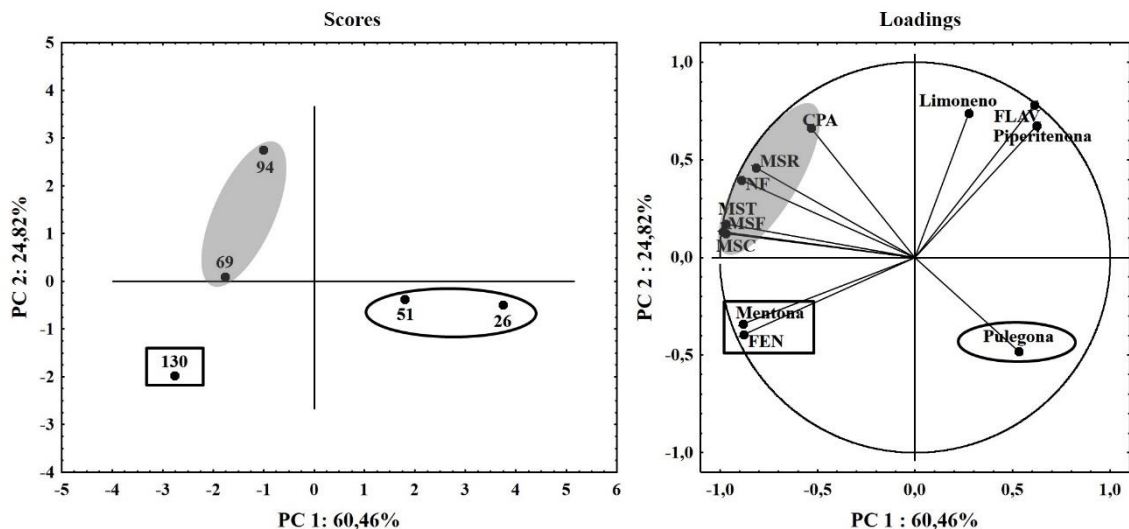
* Índice de retenção relativo a série n-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição conforme a classe. ni = não indentificado; DP: desvio padrão (n=3).

3.4 Análise de componentes principais (PCA) – Intensidade de luz

Os resultados da análise de componentes principais (PCA) representada em *scores* e *loadings*, apresenta uma visão ampliada dos tratamentos, auxiliando na interpretação das variáveis estudadas (Figura 3). A primeira componente principal explica 60,46% da variação dos dados, e a segunda 24,82% totalizando 85,28% da variância total. Pode-se considerar que a PCA apresentada é adequada para avaliar as relações entre as variáveis, uma vez que explica grande parte da variabilidade dos dados; uma vez que as duas primeiras componentes explicam mais de 50% dos dados.

No intervalo de intensidades luminosas avaliado podemos observar a separação de 3 grupos, podendo descrevê-los como de baixa intensidade (26 e 51 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); média (69 e 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e alta (130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os conteúdos de mentona e compostos fenólicos totais (FEN) foram incrementados sob alta intensidade de luz. Já o crescimento *in vitro* de *M. pulegium* foi favorecido em intensidades de luz consideradas medianas. No entanto, para o acúmulo de maior teor de pulegona deve-se considerar o cultivo sob baixa intensidade luminosa. Já os teores de limoneno, piperitenona e flavonas/flavonóis (FLA) não houve agrupamento, demonstrando que não há correlação com as intensidades luminosas.

Figura 3 – Análise de componentes principais (PCA) da matriz de correlação baseada em 12 componentes de *M. pulegium* L. sob diferentes intensidades luminosas *in vitro*. Abreviações: CPA – comprimento da parte aérea, MSR – massa seca da raiz, NF – número de folhas, MSF – massa seca da folha, MSC – massa seca do caule, MST – massa seca total, FEN – compostos fenólicos totais, FLAV – flavonas/flavonóis.



3.5 Cultivo sob diferentes qualidades de luz

A qualidade de luz afetou significativamente ($p > 0.05$) o crescimento de *M. pulegium* cultivadas *in vitro* (Figuras 4 e 5). As plântulas cultivadas sob a luz monocromática vermelha e combinação (30% azul:70% vermelho) apresentaram os maiores comprimento da parte aérea, sendo 42% e 26%, respectivamente maior que os demais que foram estatisticamente iguais entre si. O alongamento do caule sob luz vermelha também foi observado para outras espécies medicinais, tais como *Lippia rotundifolia* (de Hsie et al., 2019), *Vaccinium corymbosum* (Hung et al., 2016), *Ajuga multiflora* Bunge (Lamiaceae) (Jeong e Sivanesan, 2018) e *P. amboinicus* (Silva et al., 2017).

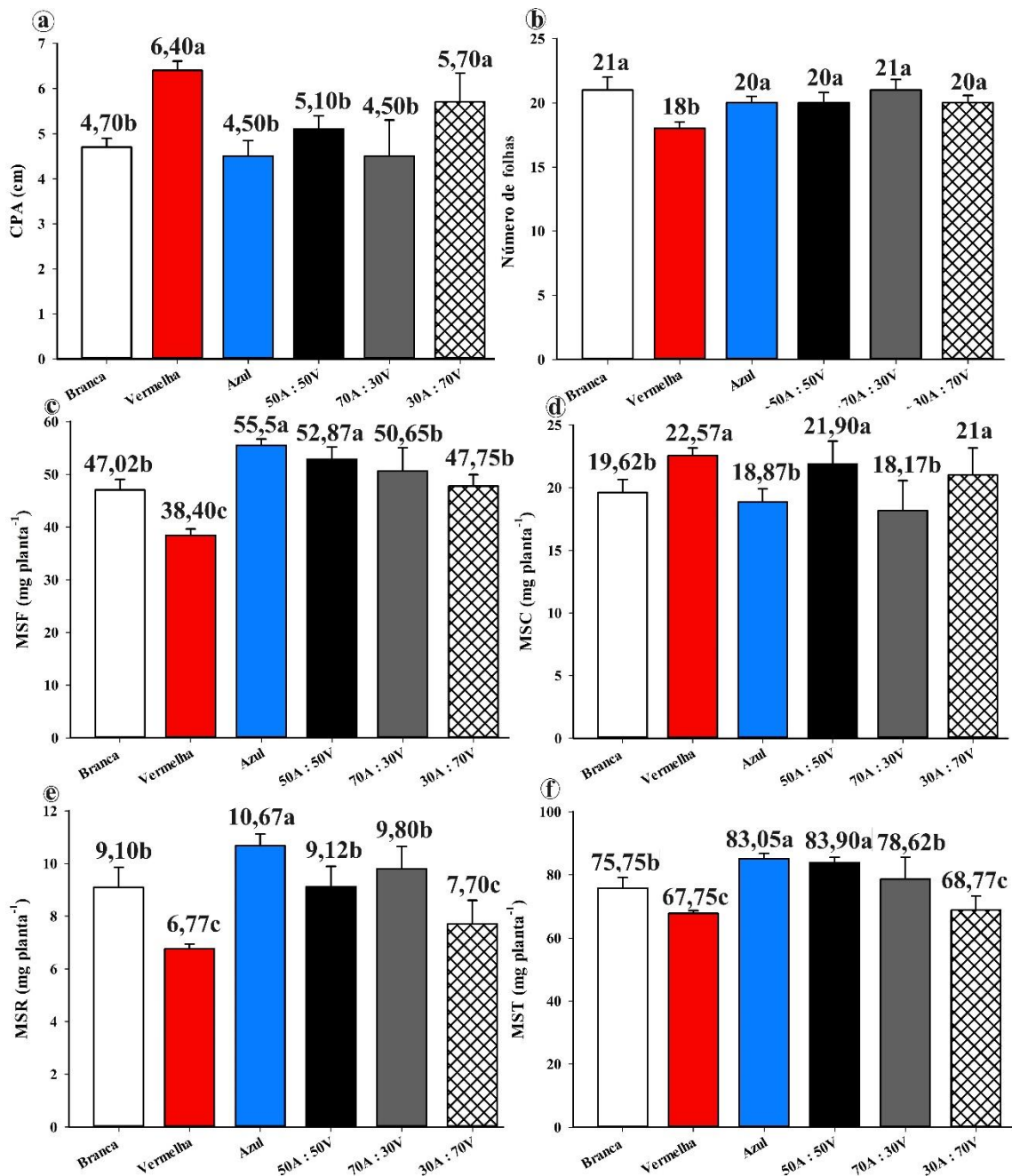
De acordo com Lv et al. (2021), o crescimento das plantas é controlado pela luz, especialmente a luz vermelha/vermelha distante que está associada a sinalização e regulação da biossíntese de auxina. O aumento das concentrações endógenas de auxinas nos tecidos pode levar ao aumento da divisão celular e alongamento celular (Jafari et al., 2016). Por outro lado, a luz vermelha monocromática prejudicou o conteúdo de massa seca foliar, órgão onde estão armazenados os metabólitos secundários de interesse da espécie (Figura 4b). Outra hipótese que pode explicar esse fenômeno, é que a luz vermelha leva a indução da produção endógena de hormônios, como as giberelinas, responsáveis por regular processos de alongamento do caule e senescência de folhas (Kamiya e García-Martínez, 1999; Matsuo et al., 2019). Relação positiva da luz vermelha monocromática com o acúmulo de matéria seca foi observada em *Lippia gracilis* por Lazzarini et al. (2018) e em *Plectranthus amboinicus* por Silva et al. (2017). Entretanto, durante o crescimento *in vitro* de um híbrido de *Cattleya* cultivadas sob a luz vermelha monocromática observaram-se colapso de algumas células do mesofilo e redução nas lâminas foliares e, conseqüentemente, queda na biomassa (Cybularz-Urban et al., 2007).

A luz azul e 50% azul:50% vermelho promoveram o acúmulo de massa seca da folha (MSF) e total (MST) cerca de 15% e 11%, respectivamente, comparada a luz branca. O efeito positivo da luz azul na produção de massa seca foliar foi relatado para *Mentha viridis* (Alvarenga et al., 2017), *Achillea millefolium* (Alvarenga et al., 2015) e *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) (Heo et al., 2006). O mesmo tratamento 50% azul:50% vermelho também tiveram influência positiva no acúmulo de massa foliar em *Pfaffia glomerata* (Silva et al., 2020) e *P. amboinicus* (Silva et al., 2017).

A fotoinativação da auxina AIA (Ácido indolacético) foi reportada para *Nicotiana tabacum* durante o cultivo *in vitro* de plantas expostas a luz azul (Seibert et al., 1975). Isto pode explicar os menores comprimentos e maiores acúmulos de massa foliar em *M.*

pulegium cultivadas sob luz azul monocromática. Pois, com a inativação das auxinas, a dominância apical pode ser quebrada, favorecendo o crescimento lateral dos órgãos fotossintetizantes.

Figura 4 – (a) Comprimento da parte aérea (CPA), (b) número de folhas e (c) massas secas das folhas (MSF), (d) do caule (MSC), (e) da raiz (e) e (f) total (MST) das plântulas de *Mentha pulegium* cultivadas *in vitro* durante 30 dias.



Médias seguidas pela mesma letra nas barras não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Figura 5 – Plântulas de *M. pulegium* cultivadas *in vitro* em diferentes espectros luminosos (branca; vermelha; azul; 50% azul:50% vermelho; 70% azul:30% vermelho; 30% azul:70% vermelho), durante 30 dias em sala de crescimento.



Fonte: do Autor (2024).

É reportado na literatura, que a luz azul pode ser um ótimo recurso a se considerar, na utilização de plantas *in vitro* para otimização e produção de proteínas solúveis, carboidratos, aumento da espessura da folha, síntese de pigmentos fotossintetizantes, desenvolvimento de cloroplastos e abertura de estômatos (Liu et al., 2014; Dutta e Jatothu, 2013; Xu e Cui, 2009). Esses fatores podem ter contribuído também para os maiores acúmulos de massa seca foliar, raiz e total em *M. pulegium*.

3.6 Pigmentos fotossintetizantes, compostos fenólicos e flavonas/flavonóis sob diferentes espectros luminosos

Os pigmentos fotossintéticos, como clorofila *a*, *b* e carotenoides desempenham um papel fundamental na fisiologia das plantas. A absorção de luz e transferência de energia são cruciais na conversão de energia luminosa em energia química. O teor desses pigmentos é utilizado para estimar o potencial fotossintético das plantas, influenciando diretamente seu

crescimento, desenvolvimento e adaptação a diferentes condições ambientais (Taiz et al., 2017).

A qualidade espectral da luz influenciou significativamente os teores de pigmentos fotossintéticos em *M. pulegium* ($p > 0,5$) (Tabela 4). Plântulas cultivadas sob luz branca e 30% azul:70% vermelha acumularam maiores quantidades de clorofila *a* (0,90 e 0,93 mg.g⁻¹, respectivamente). O teor mínimo de clorofila *a* (0,72 mg.g⁻¹) foi observado nas plântulas cultivadas sob a luz azul. No que tange a clorofila *b*, os conteúdos máximos foram observados na luz vermelha (0,57 mg.g⁻¹), 70% azul:30% vermelha (0,59 mg.g⁻¹) e 30% azul:70% vermelha (0,56 mg.g⁻¹). Assim como observado para clorofila *a*, a luz azul também reduziu o acúmulo de clorofila *b* (0,31 mg.g⁻¹) que foi cerca de duas vezes menor que os conteúdos máximos observados nos outros tratamentos. No que tange a clorofila total, o tratamento de 30% de luz azul e 70% de luz vermelha foi o que acumulou o maior teor (1,50 mg.g⁻¹).

Tabela 4 – Pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenóides), *M. pulegium* cultivadas *in vitro* sob diferentes espectros luminosos.

Qualidade de luz	Pigmentos (mg.g ⁻¹)				
	<i>Cl. a</i>	<i>Cl. b</i>	<i>Cl. Total</i>	Carotenóides	<i>Cl. a/b</i>
Branca	0,90 ± 0,06a	0,43 ± 0,04b	1,33 ± 0,16c	0,19 ± 0,03a	2,10a
Vermelha	0,84 ± 0,03b	0,57 ± 0,03a	1,41 ± 0,04b	0,18 ± 0,01a	1,48b
Azul	0,72 ± 0,03c	0,31 ± 0,04c	1,03 ± 0,08d	0,17 ± 0,02b	2,28a
50%A:50%V	0,82 ± 0,04b	0,48 ± 0,07b	1,30 ± 0,01c	0,16 ± 0,01b	1,84b
70%A:30%V	0,83 ± 0,05b	0,59 ± 0,01a	1,42 ± 0,08b	0,17 ± 0,01b	1,40b
30%A:70%V	0,93 ± 0,03a	0,56 ± 0,05a	1,50 ± 0,04a	0,20 ± 0,01a	1,66b
CV(%)	5,23	11,05	3,82	9,25	17,67

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott à de 5% de probabilidade. Cl: clorofila.

O efeito de LEDs vermelhos e azuis, assim como outras colorações e combinações, são eficazes em estimular a fotossíntese e o crescimento em diversas espécies de plantas. Os LEDs azul e vermelho foram desenvolvidos para o cultivo *in vitro* de plantas, uma vez que as clorofilas *a* e *b* apresentam absorção máxima em comprimentos de onda específicos (460 nm para azul e 660 nm para vermelho). A relação de proporções de luz demonstra eficácia tanto

na proliferação quanto na promoção de características de qualidade nas plântulas (Cavallaro et al., 2022).

O efeito de LEDs monocromáticos vermelho e azul no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes é bem relatado, sendo encontrados tanto relações positivas quanto negativas para ambos os espectros no cultivo *in vitro* de plantas. O conteúdo de pigmentos fotossintetizantes estimulados por LEDs varia conforme a espécie, tipo de explante, estágio de desenvolvimento e tempo de exposição (Silva et al., 2014; Lazzarini et al., 2018).

Nota-se que tanto na luz branca e nos tratamentos que continham o componente vermelho, a produção de clorofila *b* foi aumentada em *M. pulegium*. A luz vermelha assim como combinações em maiores concentrações também aumentou os níveis de pigmentos fotossintéticos de *O. majorana* (Cossa et al., 2024), *Passiflora edulis* Sims. (Passifloraceae) (Chen et al., 2020) e *Musa acuminata* (Musaceae) (do Nascimento Vieira et al., 2015) sob cultivo *in vitro* e a luz azul isolada a diminuição. Resultados de Li et al. (2013) demonstraram que plântulas com menores teores de clorofila utilizam o aparato fotossintético de maneira mais eficiente do que plântulas com teores mais elevados sob o espectro de luz vermelha (Li et al., 2013).

O excesso de luz vermelha em plântulas *in vitro* durante um longo período podem resultar em prejuízos, como baixa capacidade fotossintética e crescimento prejudicado (Cavallaro et al., 2022). Além disso, o aumento de níveis de incidência de luz vermelha é proporcional ao desarranjo dos tilacoides no cloroplasto (Maluta et al., 2013). Sendo assim, na literatura é documentado, uma possível solução para esse problema, a adição do espectro luminoso azul, ao qual pode ajudar na regulação do metabolismo de carboidratos (Kowallik, 1982; Miao et al., 2019). Isto pode inclusive estar relacionado aos maiores ganhos de matéria seca obtidos por *M. pulegium*, conforme discutido anteriormente.

Quanto aos teores de compostos fenólicos totais, sob a luz monocromática azul e 70% azul:30% vermelho as plântulas de *M. pulegium* registraram os maiores acúmulos (1,21 e 1,25 mg EAG/g de folhas secas). O conteúdo de flavonas/flavonóis não foi influenciado pelos espectros luminosos (4,54 – 4,79 mg EQ /g de folhas secas). Os resultados observados por Roosta et al. (2023) corroboram com o presente estudo, uma vez que os autores também não encontraram variação na produção de flavonas/flavonóis em *M. pulegium* cultivadas em solo e em casa de vegetação com luzes LEDs branca, vermelha, azul e combinações vermelho-azul.

Tabela 5 – Fenóis totais, expressos em mg equivalente ao ácido gálico por g de folha seca (mg EAG g⁻¹) e flavonas/flavonóis (flavonóis e flavonas), expressos em mg equivalente de quercetina por g de folha seca (mg QE g⁻¹), de *Mentha pulegium* cultivada *in vitro* nos tratamentos de qualidade de luz (branca, vermelha, azul, 50% azul:50% vermelho, 70% azul:30% vermelho, 30% azul:70% vermelho).

Qualidade de luz	Fen (EAG)	Flav (EQ)
Branca	1,13 ± 0,03b	4,68 ± 0,18a
Vermelha	0,98 ± 0,03c	4,57 ± 0,14a
Azul	1,21 ± 0,03a	4,54 ± 0,13a
50%A:50%V	1,04 ± 0,01c	4,69 ± 0,13a
70%A:30%V	1,25 ± 0,02a	4,79 ± 0,21a
30%A:70%V	1,10 ± 0,03b	4,77 ± 0,19a
CV(%)	2,2	4,62

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott à de 5% de probabilidade. Cl: clorofila.

A produção de compostos fenólicos está associada a mecanismos antioxidantes protetivos, pois estão envolvidos na neutralização de danos oxidativos causados pela formação de radicais livres induzidos pela luz (Taiz et al., 2017). A influência da luz azul na produção de compostos fenólicos e atividade antioxidante foi relatada para as espécies *Lippia dulcis* (Rocha et al., 2022), *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Schisandraceae) (Szopa e Ekiert, 2016), *Dracocephalum forrestii* W.W.Sm. (Lamiaceae) (Weremczuk-Jeżyna et al., 2021).

Entretanto, também é encontrado na literatura, o efeito da luz vermelha no aumento da produção de arbutina, um polifenol em *O. majorana* e a luz amarela a sua inibição (Cossa et al., 2024). Sendo assim, o espectro luminoso afeta a biossíntese de compostos fenólicos nas plantas de diferentes formas, dependendo da espécie e dos tipos de condição de crescimento (Zhang et al., 2018; Taiz et al., 2017).

3.7 Análise da fração volátil de *M. pulegium* sob diferentes espectros luminosos

Na fração volátil de folhas secas de *M. pulegium* cultivadas sob diferentes espectros luminosos foram identificados 15 a 17 constituintes químicos (Tabela 6). A fração volátil consistiu majoritariamente de constituintes químicos monoterpênicos oxigenados (91,96% a 93,16%), seguido de monoterpênicos hidrocarbonetos (3,50% a 5,59%) e compostos alifáticos (1,88% a 2,04%). Esses compostos corresponderam a mais de 99% da porcentagem de área relativa total. As plântulas que apresentaram componentes de luz azul acumularam maiores teores de pulegona (78,11 a 80,64%). O tratamento com luz monocromática vermelha foi o que registrou o menor teor de pulegona (72,95%). A biossíntese *in vitro* de piperitenona também foi influenciada por maiores composições de vermelho. Na luz vermelha monocromática e de 30% azul:70% vermelho foram observados os menores acúmulos (8,89% e 8,53%, respectivamente). Ainda assim nesses dois tratamentos foi observado maior conteúdo de mentona (2,90% e 1,26%, respectivamente) e *iso*-mentona (3,36% e 1,22%). De forma geral, a composição da luz é importante para a fotossíntese, assim como o fornecimento de açúcares para a biossíntese de terpenos. A absorção da luz azul pelas plantas, aumenta o estado energético comparado com a luz vermelha, devido a maior energia disponível nesse comprimento de onda (Taiz et al., 2017). Nesse sentido, o acúmulo de monoterpênicos oxigenados, como a pulegona e piperitenona pode ter sido influenciado por pela excitação fotoquímica provida da luz azul.

Outros estudos da literatura corroboram com o que foi observado para *M. pulegium*. O aumento da produção de pulegona e mentona pela luz azul já foi relatada em *Mentha canadenses* L. (Lamiaceae) (Ueda et al., 2021). O carvacrol, constituinte majoritário de *Lippia gracilis* e *Plectranthus amboinicus*, também apresentaram maiores acúmulos sob luz azul (Lazzarini et al., 2018; Silva et al., 2017). O mirceno e o óxido de piperitenona em *Lippia rotundifolia* também indicaram maiores teores sob luz azul (de Hsie et al., 2019). Entretanto, isto depende do constituinte químico, pois o sabineno em *Achillea millefolium* indicou maiores conteúdos sob luz vermelha (Alvarenga et al., 2015). No estudo de Rocha et al. (2022) foi observado que *Lippia dulcis* sob luz vermelha, produziu poucos compostos voláteis em comparação as combinações 50% azul:50% vermelho e 30% azul:70% vermelho.

Apesar de não termos realizado, estudos anatômicos a *M. pulegium* sob luz azul obteve maior acúmulo de matéria seca nas folhas, órgão da planta que estão presentes os tricomas secretores e o local de síntese e armazenamento da pulegona (Fuchs et al., 2022; Croteau et al., 2005). Conforme Ueda et al. (2021), o efeito de LEDs nos fotorreceptores ou fatores relacionados, como os fatores de transcrição genética, podem desempenhar papel

direto ou indireto na facilitação dos processos enzimáticos envolvidos na biossíntese de terpenos em células secretoras. Assim, é possível notar que os efeitos da luz azul podem atuar em partes específicas da biossíntese de terpenos, assim como também, podem estimular a produção de precursores como o dimetilalildifosfato (DMAPP) ou isopentenildifosfato (IPP), na produção de pulegona, mentofurano, mentona e mentol (Ueda et al., 2021).

Monoterpenos oxigenados como pulegona e mentona e *iso*-mentona são intermediários do mentol, composto responsável pela sensação de resfriamento e descongestionamento causado pela reação direta com o receptor melastatina 8 (TRPM8) (Xu et al., 2020). Ambos são comuns em óleos essenciais de plantas do gênero *Mentha* e têm várias aplicações industriais e medicinais. O espectro luminoso pode afetar a fotodegradação desses compostos e, por isso a determinação das condições ótimas de luminosidade é importante para otimizar a produção de moléculas de interesse.

Tabela 6 – Fração volátil das folhas de *M. pulegium* cultivadas *in vitro* sob diferentes espectros luminosos, durante 30 dias.

Compostos	IR*	Branca	Vermelha	Azul	50A:50V	70A:30V	30A:70V
		Área (%) ± DP					
Compostos alifáticos		1,88	1,92	1,99	2,03	2,04	2,01
3-metil-ciclohexanona	844	0,10 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,15 ± 0,02
3-metil-ciclohexanona	945	0,59 ± 0,05	0,45 ± 0,12	0,54 ± 0,11	0,59 ± 0,06	0,63 ± 0,07	0,53 ± 0,02
6-metil-5-hepten-2-ona	985	0,06 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,01
3-octanol	995	1,13 ± 0,01	1,14 ± 0,07	1,29 ± 0,05	1,28 ± 0,04	1,28 ± 0,01	1,25 ± 0,01
Monoterpenos hidrocarbonetos		5,14	4,96	3,50	5,59	5,05	5,36
α-pineno	930	1,87 ± 0,04	1,82 ± 0,16	1,82 ± 0,07	1,97 ± 0,11	1,96 ± 0,04	1,97 ± 0,08
Sabineno	970	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,02
β-pineno	973	1,34 ± 0,03	1,31 ± 0,11	0,30 ± 0,05	1,40 ± 0,08	1,39 ± 0,03	1,41 ± 0,05
p-menta-1(7),8-dieno	1003	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Limoneno	1025	1,50 ± 0,29	1,40 ± 0,33	0,95 ± 0,21	1,76 ± 0,73	1,25 ± 0,14	1,52 ± 0,11
Monoterpenos Oxigenados		92,66	92,48	93,16	91,96	92,56	92,30
1,8-cineol	1027	0,42 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,50 ± 0,02
Mentona	1148	0,61 ± 0,14	2,90 ± 0,07	0,13 ± 0,10	0,69 ± 0,21	0,46 ± 0,15	1,26 ± 0,22
<i>Iso</i> -mentona	1158	1,00 ± 0,15	3,36 ± 0,09	0,29 ± 0,05	1,06 ± 0,31	0,51 ± 0,32	1,22 ± 0,72
<i>Iso</i> -pulegona	1171	1,81 ± 0,07	1,81 ± 0,12	1,78 ± 0,15	1,84 ± 0,11	1,91 ± 0,06	1,86 ± 0,04
Pulegona	1238	79,24 ± 0,60	72,95 ± 0,75	80,64 ± 0,23	78,11 ± 0,23	79,31 ± 1,07	78,21 ± 1,06
Piperitona	1249	0,10 ± 0,03	0,67 ± 0,06	-	0,15 ± 0,07	0,06 ± 0,02	0,25 ± 0,03
Ni	1259	0,06 ± 0,01	0,21 ± 0,05	-	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,11 ± 0,01
<i>Iso</i> -piperitenona	1266	0,23 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,23 ± 0,06	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,24 ± 0,01
Ni	1285	0,26 ± 0,01	0,98 ± 0,24	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,50 ± 0,03
Piperitenona	1335	9,07 ± 0,44	8,89 ± 1,08	9,59 ± 0,88	9,19 ± 0,42	9,60 ± 0,56	8,53 ± 0,33
Total (%)		99,68	99,36	98,65	99,57	99,64	99,67
Números de compostos		17	17	15	17	17	17

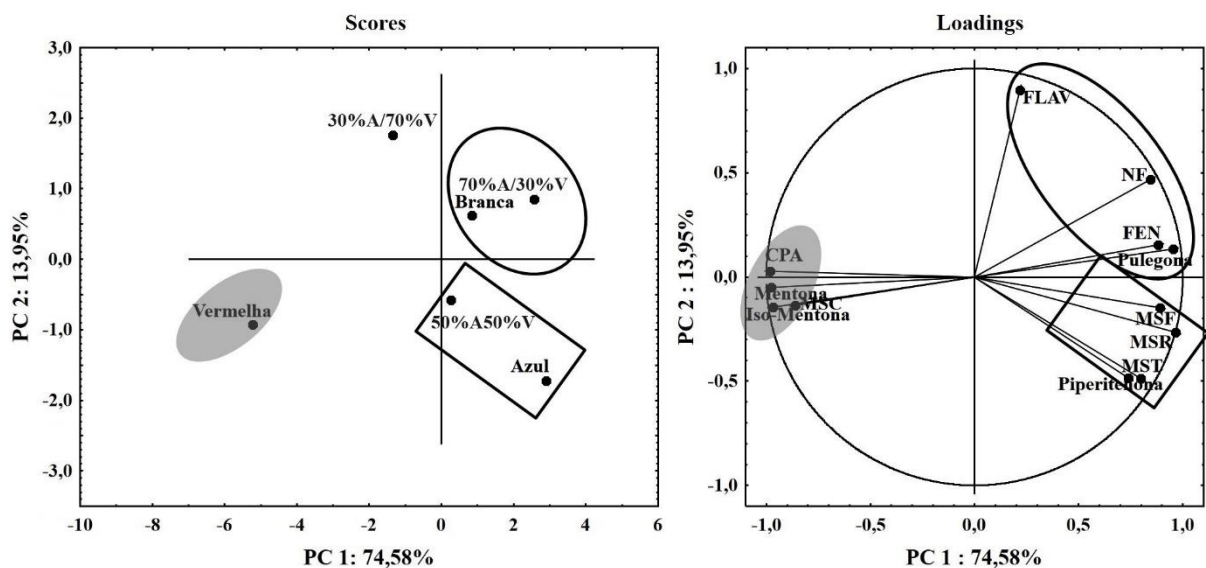
* Índice de retenção relativo a série n-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição conforme a classe. ni = não indentificado; DP: desvio padrão (n=3)

3.8 Análise de componentes principais (PCA) – Qualidade de luz

Na análise de componentes principais utilizando doze componentes, a variância acumulada pelos dois primeiros componentes foi de 88,53% da variação total observada, visto que a primeira componente principal explicou 74,58% e a segunda, 13,95% (Figura 6). Segundo Mardia et al. (1979), se os primeiros componentes acumularem acima de 80%, eles explicam satisfatoriamente a variabilidade manifestada entre as variáveis avaliadas.

A PCA indicou a separação de três grupos, o grupo da luz azul e combinação 50% azul:50% vermelho, demonstrou uma interação positiva com o acúmulo de MSF, MSR, MST e piperitenona. Observar-se que em outro agrupamento a luz branca e combinação 70% azul:30% vermelho, se interagiram de forma positiva com o conteúdo de flavonas/flavonóis (FLAV), compostos fenólicos totais (FEN), NF e pulegona. Entretanto, nota-se que há o agrupamento da luz vermelha que correlacionou positivamente com as variáveis CPA, MSC, mentona e *iso*-mentona, e negativamente com as demais variáveis de respostas. A combinação luminosa 30% azul:70% vermelho não obteve interação ou relação com nenhuma variável pesquisada.

Figura 6 –Análise de componentes principais (PCA) da matriz de correlação baseada em 12 componentes de *M. pulegium* L. sob diferentes espectros luminosos *in vitro*. Abreviações: CPA – comprimento da parte aérea, MSR – massa seca da raiz, NF – número de folhas, MSF – matéria seca da folha, MSC – matéria seca do caule, MST – matéria seca total, FEN – compostos fenólicos totais, FLAV – flavonas/flavonóis.



4. Conclusão

A luz afeta o crescimento e a composição volátil e fenólica de *M. pulegium*. A intensidade luminosa de $94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, assim como a luz monocromática azul e a combinação de 50% azul:50% vermelho proporcionam melhores respostas de crescimento *in vitro* de *M. pulegium*. O teor de pulegona não é afetado pela variação na intensidade luminosa, porém o componente azul aumenta sua produção. A intensidade luminosa não afeta consideravelmente os teores de pigmentos fotossintetizantes. Há uma correlação linear da produção de compostos fenólicos com o acréscimo de intensidade luminosa, porém o conteúdo de flavonas/flavonóis não responde do mesmo modo. O efeito de LEDs vermelhos e azuis, assim como as combinações, são eficazes em estimular a produção de pigmentos fotossintéticos assim como as flavonas/flavonóis totais em *M. pulegium*. Portanto, *M. pulegium* é uma espécie que possui condições ótimas para cultivo *in vitro* com foco em produção de pulegona. Assim, o uso de intensidade luminosa de $94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e o uso de combinações de LEDs azul e vermelho podem melhorar a produção de matéria vegetal e de metabólitos secundários em estudos futuros para a aplicação em grande escala.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.1 ed (online). Illinois: Allured Publishing, 804 p. 2017.

AIRES, A. et al. Phytochemical composition and antibacterial activity of hydroalcoholic extracts of *Pterospartum tridentatum* and *Mentha pulegium* against *Staphylococcus aureus* isolates. **BioMed research international**, v. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5201879>

AIT-OUAZZOU, A. et al. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 313-319, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.004>

AL-RAJHI, A. Mh. et al. Molecular interaction studies and phytochemical characterization of *Mentha pulegium* L. constituents with multiple biological utilities as antioxidant, antimicrobial, anticancer and anti-hemolytic agents. **Molecules**, v. 27, n. 15, p. 4824, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27154824>

ALVARENGA, I. C. A. et al. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, p. 299-308, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>

ALVARENGA, J. P. et al. *In vitro* culture of *Mentha viridis*: Quality and intensity of light on growth and production of volatiles. In: **VII International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1224**. 2017. p. 175-182. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1224.23>

ARAÚJO, D. X. et al. Photon flux density and wavelength influence on growth, photosynthetic pigments and volatile organic compound accumulation in *Aeollanthus suaveolens* (Catinga-de-mulata) under in vitro conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 168, p. 113597, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113597>

BARNES, J. D. et al. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental botany**, v. 32, n. 2, p. 85-100, 1992. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(92\)90034-Y](https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90034-Y)

BAŞER, K. H. C. et al. Essential oils of *Mentha* species from Marmara region of Turkey. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 3, p. 265-272, 2012. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.676775>

BEST, R. A Review of the Digestive, Respiratory and Nocioceptive Benefits, Associated Performance Outcomes and Clinical Considerations following Mint and Menthol application. **Medical Research Archives**, v. 11, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.18103/mra.v11i1.3321>

BRASIL, Ministério da Saúde, DAF/SCTIE. RENISUS 19 de fevereiro de 2009. Publica a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Disponível em:

<<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/ppnpmf/renisus>>. Acesso em: 07.02.2024.

BOUYAHYA, A. et al. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 41-49, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.015>

BURBOTT, A. J.; LOOMIS, W. David. Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. **Plant physiology**, v. 42, n. 1, p. 20-28, 1967. <https://doi.org/10.1104/pp.42.1.20>

CARVALHO, A. A. de et al. Growth and volatiles in the micropropagation of Santa Maria herb. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, p. 624-635, 2018. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20180071>

CAVALLARO, V. et al. Light and plant growth regulators on in vitro proliferation. **Plants**, v. 11, n. 7, p. 844, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11070844>

CHEN, Y.; CHANG, C.; LIN, H. Topolins and red light improve the micropropagation efficiency of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) 'Tainung No. 1'. **HortScience**, v. 55, n. 8, p. 1337-1344, 2020. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15078-20>

CHEYNIER, V. et al. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant physiology and biochemistry**, v. 72, p. 1-20, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>

COELHO, A. D. et al. Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, p. 59-74, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01992-2>

COSSA, M. C. V. et al. Impact of photon flux density and light spectral quality on biomass production and arbutin compound accumulation in *Origanum majorana* L. plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 156, n. 1, p. 12, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02658-5>.

CROTEAU, R. B. et al. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. **Naturwissenschaften**, v. 92, p. 562-577, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0055-0>

CYBULARZ-URBAN, T.; HANUS-FAJERSKA, E.; SWIDERSKI, A. Effect of light wavelength on *in vitro* organogenesis of a *Cattleya* hybrid. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 49, n. 1, p. 113-118, 2007.

DA SILVA, G. M. et al. Influence of the wavelength and intensity of LED lights and cytokinins on the growth rate and the concentration of total cardenolides in *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* (P. Silva and M. Silva) Hinz cultivated in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 151, n. 1, p. 93-105, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02333-1>

DE CARVALHO, A. A. et al. Densidade do fluxo de fótons e tipos de citocininas influenciam a produção de biomassa e acúmulo de compostos orgânicos voláteis em *Dysphania ambrosioides* L sob condições *in vitro*. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 2, p. e5512239841-e5512239841, 2023. <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i2.39841>

DE HSIE, B. S. et al. Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 198, p. 111577, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111577>

DE OLIVEIRA, T. et al. The effect of alternative membrane system, sucrose, and culture methods under photosynthetic photon flux on growth and volatile compounds of mint *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, p. 529-540, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10147-z>

DE SÁ JÚNIOR, A. et al. Application of the Köppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 108, p. 1-7, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00704-011-0507-8>

DOMINGUES, P. M.; SANTOS, L. Essential oil of pennyroyal (*Mentha pulegium*): Composition and applications as alternatives to pesticides—New tendencies. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111534, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111534>

DUTTA GUPTA, S.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant biotechnology reports**, v. 7, p. 211-220, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>

EBRAHEEM, R.; AL-AWAD, D.; YAZIJI, M.. *In vitro* Propagation of *Mentha pulegium* L. and Testing, The Antifungal Activity of Stem Nodes Callus and Shoots Extracts Against *Acremonium strictum* L. 2020.

EFTEKHARI, A. et al. Phytochemical and nutra-pharmaceutical attributes of *Mentha* spp.: A comprehensive review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 103106, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103106>

EL-GAZAR, A. A. et al. *Mentha pulegium* L.(Pennyroyal, Lamiaceae) extracts impose abortion or fetal-mediated toxicity in pregnant rats; evidenced by the modulation of pregnancy hormones, MiR-520, MiR-146a, TIMP-1 and MMP-9 protein expressions, inflammatory state, certain related signaling pathways, and metabolite profiling via UPLC-ESI-TOF-MS. **Toxins**, v. 14, n. 5, p. 347, 2022. <https://doi.org/10.3390/toxins14050347>

FERNANDES, V. F. et al. Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 419-424, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000041>

FERREIRA, D. F. (2011) **Sisvar: a computer statistical analysis system**. *Ciência e agrotecnologia* 35(6):1039–1042

FUCHS, L. K. et al. Genetic manipulation of biosynthetic pathways in mint. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 928178, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.928178>

- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- HALLIDAY, K. J.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J. F.; JOSSE, E. Integration of light and auxin signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a001586, 2009. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001586>
- HEO, J. W.; LEE, C. W.; PAEK, K. Y. Influence of mixed LED radiation on the growth of annual plants. **Journal of Plant Biology**, v. 49, p. 286-290, 2006. <https://doi.org/10.1007/BF03031157>
- HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal of botany**, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979. <https://doi.org/10.1139/b79-163>
- HUNG, C. D. et al. LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, p. 1-9, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2164-0>
- JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. **Scientia Horticulturae**, v. 236, p. 222-228, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.056>
- KAMIYA, Y; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. **Current opinion in plant biology**, v. 2, n. 5, p. 398-403, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00012-6)
- KOWALLIK, W. Blue light effects on respiration. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 33, n. 1, p. 51-72, 1982. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.33.060182.000411>
- KWON, A. et al. Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana*. **Acta physiologiae plantarum**, v. 37, p. 1-9, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1812-0>
- LAZZARINI, L. E. S. et al. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 135, p. 367-379, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1470-1>
- LI, H.; TANG, C.; XU, Z.. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 117-124, 2013.
- LIU, M. et al. Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light

spectra. **Scientia Horticulturae**, v. 174, p. 112-118, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.006>

LV, B. et al. Light participates in the auxin-dependent regulation of plant growth. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 5, p. 819-822, 2021. <https://doi.org/10.1111/jipb.13036>

MACEDO, A. F. et al. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and experimental botany**, v. 70, n. 1, p. 43-50, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.012>

MAHENDRAN, G.; RAHMAN, L. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha × piperita* L.) —A review. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 9, p. 2088-2139, 2020. <https://doi.org/10.1002/ptr.6664>

MALUTA, F. A. et al. *In vitro* culture of sugarcane exposed to different light sources. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1303-1307, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900015>

MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. **Multivariate analysis**. London: Academic, 1979. 521 p. <https://doi.org/10.1002/zamm.19810610315>

MATSUO, S. et al. Effects of blue and red lights on gibberellin metabolism in tomato seedlings. **The Horticulture Journal**, v. 88, n. 1, p. 76-82, 2019. <https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-005>

MESSAOUDI, M. et al. Effect of Extraction Methods on Polyphenols, Flavonoids, Mineral Elements, and Biological Activities of Essential Oil and Extracts of *Mentha pulegium* L. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules27010011>

MIAO, Y. et al. Blue light alleviates ‘red light syndrome’ by regulating chloroplast ultrastructure, photosynthetic traits and nutrient accumulation in cucumber plants. **Scientia Horticulturae**, v. 257, p. 108680, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108680>

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in plant science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>

MOHAMMADHOSSEINI, M.; VENDITTI, A.; MAHDAVI, B. Characterization of essential oils and volatiles from the aerial parts of *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae) using microwave-assisted hydrodistillation (MAHD) and headspace solid phase microextraction (HS-SPME) in combination with GC-MS. **Natural Product Research**, v. 37, n. 2, p. 338-342, 2023. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1960523>

MONTEIRO, P. et al. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal, anamonteiro@isa.utl.pt 2 Escola Superior Agrária de Elvas, Rua de Alcamim, nº19, 7350-903 Elvas, Portugal, opovoa@esaelvas.pt.

MUNEER, S. et al. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 4657-4670, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms15034657>

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library**. Gaithersburg, 2008.

OUALDI, I. et al. Chemical composition and antimicrobial properties of Moroccan *Mentha pulegium* L. essential oil. **Materials Today: Proceedings**, v. 72, p. 3768-3774, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.09.318>

OUZOUNIS, T. et al. Blue and red LED lighting effects on plant biomass, stomatal conductance, and metabolite content in nine tomato genotypes. In: **VIII International Symposium on Light in Horticulture 1134**. 2016. p. 251-258. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1134.34>

PAIK, I.; HUQ, E. Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2019. p. 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2019.03.007>

PARSANIA, M. et al. Antiviral screening of four plant extracts against acyclovir resistant herpes simplex virus type-1. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 30, 2017.

PHAM, V. N.; KATHARE, P. K.; HUQ, E. Phytochromes and phytochrome interacting factors. **Plant physiology**, v. 176, n. 2, p. 1025-1038, 2018. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01384>

PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K.. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 1776-1782, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>

RAYAN, A. et al. Chemical composition of Moroccan commercial essential oils of mint: *Mentha spicata*, *Mentha piperita*, and *Mentha pulegium*. **Trop J Nat Prod Res**, v. 7, n. 4, p. 2708-2712, 2023.. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v7i4.6>

RIM, I.; JEE, C. Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). **The Korean Journal of Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 133, 2006.. <https://doi.org/10.3347/kjp.2006.44.2.133>

ROCHA, T. T. et al. *In vitro* culture of *Lippia dulcis* (Trev.): light intensity and wavelength effects on growth, antioxidant defense, and volatile compound production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 58, n. 4, p. 636-652, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10270-z>

SÆBØ, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, p. 177-185, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00051588>

SEIBERT, M.; WETHERBEE, P. J.; JOB, D. D. The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. **Plant Physiology**, v. 56, n. 1, p. 130-139, 1975. <https://doi.org/10.1104/pp.56.1.130>

SILVA, M. M.A. et al. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets *in vitro*. In: **Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII**. SPIE, 2014. p. 373-380. <https://doi.org/10.1117/12.2036200>

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)**, v. 129, p. 501-510, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1195-6>

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>

SHARMA, A. et al. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2452, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>

SOARES, P. M. G. et al. Relaxant effects of the essential oil of *Mentha pulegium* L. in rat isolated trachea and urinary bladder. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 12, p. 1777-1784, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01558.x>

SPIRLING, L. I.; DANIELS, I. R. Botanical perspectives on health peppermint: more than just an after-dinner mint. **The journal of the Royal Society for the Promotion of Health**, v. 121, n. 1, p. 62-63, 2001. <https://doi.org/10.1177/14664240011210011>

SZOPA, A.; EKIERT, H. The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 127, p. 115-121, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1034-1>

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal 6ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed**, 2017. 858p.

TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends in plant science**, v. 13, n. 4, p. 178-182, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.005>

TANG, W. et al. Effect of light intensity on morphology, photosynthesis, and carbon metabolism of alfalfa (*Medicago sativa*) seedlings. **Plants**, v. 11, n. 13, p. 1688, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11131688>

ТКАЧЁВ, А.В. **Исследование летучих веществ растений**. Новосибирск: Офсет, 2008, 969 с.

TOPCHYIY, N. M. et al. The effect of additional red irradiation on the photosynthetic apparatus of *Pisum sativum*. **Photosynthetica**, v. 43, p. 451-456, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0072-4>

TOPUZ, E. Insecticidal activity of *Mentha pulegium* essential oil against *Thrips tabaci*, *Bemisia tabaci* and tuta absoluta adults. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 43, n. 5, p. 1475-1483, 2023. <https://doi.org/10.1007/s42690-023-01050-2>

UEDA, T.; MURATA, M.; YOKAWA, K. Single wavelengths of LED light supplement promote the biosynthesis of major cyclic monoterpenes in Japanese mint. **Plants**, v. 10, n. 7, p. 1420, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10071420>

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

DO NASCIMENTO, L. V. et al. Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) 'Nanicão Corupá' *in vitro* plantlets. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 27, p. 91-98, 2015. <https://doi.org/10.1007/s40626-015-0035-5>

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

WEREMCZUK-JEŻYNA, I.; KUŹMA, Ł.; GRZEGORCZYK-KAROLAK, I. The effect of different light treatments on morphogenesis, phenolic compound accumulation and antioxidant potential of *Dracocephalum forrestii* transformed shoots cultured *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 224, p. 112329, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112329>

XU, L. et al. Molecular mechanisms underlying menthol binding and activation of TRPM8 ion channel. **Biophysical Journal**, v. 118, n. 3, p. 413a, 2020.

ZHANG, T. et al. Effects of different LED sources on the growth and nitrogen metabolism of lettuce. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 134, p. 231-240, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1415-8>

Anexo A



EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS



Avenida José Cândido da Silveira, 1647, Bairro União - Belo Horizonte - Minas Gerais – Brasil
 CEP 31.170-495 - Fone: 31 3489-5069 - Fax: 31 34895064
 E-mail: herbario@epamig.br ou andreiasilva@epamig.br

DECLARAÇÃO

Declaro que Rogério S. de Freitas Micaela, estudante de doutorado do Programa de Plantas Mediciniais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), depositou no Herbário PAMG, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), exsicata (exemplar-testemunho) da espécie abaixo, coletada no Horto de Plantas Mediciniais da UFLA, Lavras, MG.

Espécie	Família	Registro PAMG
<i>Mentha pulegium</i> L.	Lamiaceae	58939

Belo Horizonte, 06 de fevereiro de 2023.

Andréia Fonseca Silva
 957.639.106-72

Pesquisadora da EPAMIG, Curadora do Herbário PAMG
 Herbário PAMG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)
 Instituição Fiel Depositária, conforme Deliberação N° 45, de 18 de Dezembro de 2003