



ELIAS ALVES DA SILVA

**AÇÃO DA QUITOSANA NO METABOLISMO,
TEOR, RENDIMENTO E PERFIL DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Mentha arvensis* L.**

LAVRAS – MG

2015

ELIAS ALVES DA SILVA

**AÇÃO DA QUITOSANA NO METABOLISMO, TEOR, RENDIMENTO
E PERFIL DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha arvensis* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas medicinais, aromáticas e condimentares, área de concentração em cultivo e manejo de plantas medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Amauri Alves de Alvarenga

Coorientadora

Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula

LAVRAS – MG

2015

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

Silva, Elias Alves da.

Ação da Quitosana no metabolismo, teor, rendimento e perfil
do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. / Elias Alves da Silva.

– Lavras : UFLA, 2015.

125 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador(a): Amauri Alves de Alvarenga.

Bibliografia.

1. Metabolismo secundário. 2. Planta Medicinal. 3.
Compostos Terpênicos. 4. Elicitores. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

ELIAS ALVES DA SILVA

**AÇÃO DA QUITOSANA NO METABOLISMO, TEOR, RENDIMENTO
E PERFIL DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha arvensis* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas medicinais, aromáticas e condimentares, área de concentração em cultivo e manejo de plantas medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 23 de Fevereiro de 2015.

Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula IFMG/BambuÍ

Dr. Joaquim Maurício Duarte Almeida UFSJ/Divinópolis

Dr. Amauri Alves de Alvarenga
Orientador

LAVRAS – MG

2015

*Dedico aos meus pais Francisco e Aparecida, fontes inesgotáveis de incentivo
sem os quais eu nada seria.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante, pelos ensinamentos diários, por tudo de perfeito que sempre faz. A Ele seja dada toda a Glória.

Aos meus pais Francisco e Aparecida que sempre me apoiaram em todas as decisões e que influenciaram diretamente no homem que me tornei.

Aos meus irmãos Leandro e Willian pela compreensão nos momentos em que não podia estar presente, pela existência ímpar de cada um.

A minha namorada Vivianny Nayse pela compreensão, paciência, ajuda e presença constante nos momentos mais difíceis. Você é muito especial para mim, obrigado por tudo!

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de cursar o mestrado, o qual contribuiu e muito para minha formação pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, aromáticas e condimentares, área de concentração cultivo e manejo de Plantas Medicinais, pela oportunidade de fazer parte de sua primeira turma. É apenas o começo de uma grande história.

Aos Professores Dr. José Eduardo e Dra. Suzan Kelly pela iniciativa de criação do programa de Plantas Medicinais, pelos ensinamentos fundamentais para minha formação, pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga pelos valiosos ensinamentos, pela amizade, compreensão e confiança, essenciais para minha formação.

À minha Coorientadora Profa. Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula pela presença constante, pelo exemplo de dedicação à docência e à pesquisa, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade, carinho, compreensão e paciência. Seu entusiasmo é um exemplo a ser seguido! Obrigado por tudo!

Às grandes amizades que construí durante o mestrado, em especial Camila Bibiano, Elisson Oliveira, João Antônio e Bety Shiue. Obrigado pela amizade, pelo carinho, compreensão e auxílio.

À amiga Mila Lamounier pela amizade, compreensão e paciência em todos os momentos de convivência.

Aos amigos do Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas Iberê, Crislaine, Nelma Ferreira, Juliene, Paulo César e Roniel pela colaboração nos momentos mais difíceis.

Às amigas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de plantas em especial Kamila Dázio, Cínthia Andrade e Cleide Campos pela prontidão em ajudar, esclarecer dúvidas e auxiliar durante os experimentos. A vocês, meu muito obrigado!

Ao Amigo Antônio do Laboratório de Fisiologia de Sementes pela contribuição nas análises de ELISA.

Aos amigos Odorêncio, Barrinha, Joel, Tanhan e Lena do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento dos trabalhos. Obrigado pelo apoio, compreensão, prontidão e pelos ensinamentos valiosos.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica: Annete Boari, Luiz Gelioli e Léia pela amizade, prontidão, dedicação e presteza em todos os momentos.

Aos amigos do Horto de Plantas Medicinais Dico e Paulo, obrigado pela amizade, pelo carinho, pelo auxílio e, principalmente, ensinamentos a respeito do cultivo das plantas medicinais.

Enfim, a todos aqueles que se envolveram direta ou indiretamente para o desenvolvimento do presente trabalho e minha formação. A todos o meu muito obrigado!

“Porque, assim como a terra faz brotar a planta e o jardim faz germinar a semente, assim o Soberano, o Senhor, fará nascer a justiça e o louvor diante de todas as nações.” Isaías 61:11

RESUMO GERAL

A aplicação de elicitores em plantas medicinais tem sido alvo em estudos envolvendo a produção de metabólitos secundários. Entretanto, não foram relatados estudos do efeito eliciador da quitosana em *Mentha arvensis* L. Objetivou-se no presente trabalho avaliar o desenvolvimento e o comportamento bioquímico/fisiológico de *M. arvensis* submetida a tratamentos com quitosana em diferentes concentrações, verificando, também, possíveis alterações no metabolismo secundário como a produção e qualidade de seu óleo essencial. O trabalho consistiu na realização de dois experimentos, ambos realizados sob condições de viveiro com sombreamento de 50%. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições e cinco tratamentos (Controle, solução de ácido acético glacial 1% e quitosana nas concentrações 0,25%; 0,5% e 0,75%) no experimento I e quatro tratamentos no experimento II (controle, solução de ácido acético glacial 0,25% e quitosana 0,06% e 0,125% com base nos resultados oriundos do primeiro experimento). No primeiro experimento, avaliou-se a atividade das enzimas do metabolismo antioxidante às 24, 48 e 72 horas. A coleta para determinar o teor, rendimento e composição química do óleo essencial ocorreu aos sete dias após aplicação dos tratamentos. No segundo experimento, as coletas de material para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica ocorreram no tempo zero, às 12, 24 horas e 7 dias após aplicação de quitosana. A coleta para massa seca e conteúdo de carboidratos ocorreu no tempo zero e depois às 12 e 24 horas e 7 dias após aplicação dos tratamentos. Para determinar teor, rendimento e constituição química de óleo essencial, as plantas foram coletadas aos sete dias. A concentração elevada do solvente, associada com altas concentrações de quitosana, promoveu danos físicos às plantas refletindo em menor rendimento de óleo essencial. A concentração ajustada do solvente e doses menores de quitosana não causaram danos físicos, estimularam a ativação das enzimas SOD e APX, alteraram o metabolismo de carboidratos bem como o teor e rendimento do óleo essencial em *M. arvensis*. O perfil químico do óleo essencial apresentou variações nos teores de terpenoides em ambos os experimentos.

Palavras-chave: Planta medicinal. Biomoléculas ativas. Estresse oxidativo. Metabolismo secundário.

GENERAL ABSTRACT

The application of elicitors in medicinal plants has been the subject of studies involving the production of secondary metabolites. However, no studies have been reported on the effect of chitosan over *Mentha arvensis* L. In the present work, we aimed at evaluating the development and the biochemical/physiological behavior of *M. arvensis* subjected to treatments with chitosan at different concentrations, also verifying possible changes in secondary metabolism such as the production and quality of its essential oil. The work consisted of two experiments, both conducted under nursery conditions with 50% shading. We used a completely randomized design (CRD) with three replicates and five treatments in experiment I (control, 1% glacial acetic acid solution and chitosan in the concentrations of 0.25%, 0.5% and 0.75%) and four treatments in experiment II (control, 0.25% glacial acetic acid solution and 0.06% and 0.125% chitosan based on the findings of this first experiment). In the first experiment, we evaluated the activity of antioxidant metabolism enzymes at 24, 48 and 72 hours. The collection to determine the content, yield and essential oil chemical composition occurred seven days after treatment application. In the second experiment, the material collections to evaluate the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation occurred at times zero, 12 and 24 hours and 7 days after applying chitosan. The collection for dry mass and carbohydrate content occurred at times zero and later at 12 and 24 hours and 7 days after treatment application. To determine content, yield and essential oil chemical constitution, the plants were collected at seven days. The high concentration of the solvent, associated with high concentrations of chitosan, caused physical damage to plants, resulting in lower yield of the essential oil. The adjusted concentration of the solvent and lower chitosan doses caused no physical damage, stimulated the activation of SOD and APX enzymes, altered carbohydrate metabolism as well as the content and yield of the *M. arvensis* essential oil. The chemical profile of the essential oil showed variations in terpenoid levels in both experiments.

Keywords: Medicinal plant. Active biomolecules. Oxidative stress. Secondary metabolism.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Fotografia de *Mentha arvensis* L. cultivada em canteiro.21
- Figura 2 Rotas metabólicas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários observam-se dois precursores principais Ácido chiquímico e acetato. Via Deoxixilulose-5-fosfato (DOXP) associada à biossíntese de terpenoides em plantas24
- Figura 3 Substâncias encontradas nos óleos essenciais de espécies do gênero *Mentha*.....26
- Figura 4 estruturas da quitina e quitosana30

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e APX (B) de folhas de plantas de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (sem aplicação).....59
- Figura 2 Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e APX (B) de folhas de plantas de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II64
- Figura 3 Quantificação de amido na parte aérea (PA) [A] e parte subterrânea (PS) [B] de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II72
- Figura 4 Açúcares solúveis totais (AST) na parte aérea [A] e parte subterrânea (PS) [B] em plantas de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II.....75

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Valores de massa seca da parte aérea (PA) [A] e parte subterrânea (PS) [B] de *M. arvensis*, elicítadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento I. Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) 96
- Figura 2 Valores de massa seca total [A] e relação parte aérea/subterrânea (RPS) de *M. arvensis*, elicítadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento I. Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) 98
- Figura 3 Massa seca da parte aérea (MSPA) [A] e parte subterrânea (MSPS) de *M. arvensis*, elicítadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II. As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as minúsculas comparam dentro dos tratamentos nos diferentes períodos de coleta, com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ... 105
- Figura 4 Massa seca total (MST) [A] e relação parte aérea/parte subterrânea (RPAS) [B] de *M. arvensis*, elicítadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II. As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as minúsculas comparam dentro dos tratamentos nos diferentes períodos de coleta, com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) 107
- Figura 5 Teor (A) e rendimento (B) de óleo essencial de *M. arvensis*, elicítadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II. Médias representadas pela mesma letra não

diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott
($p < 0,05$) 109

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 1	teor e rendimento de óleo essencial de <i>M. arvensis</i> L. após elicitación com quitosana.....	100
Tabela 2	Composição química do óleo essencial da parte aérea de plantas de <i>Mentha arvensis</i> submetidas à pulverização de diferentes concentrações de quitosana de baixo peso molecular no experimento I	102
Tabela 3	Composição química do óleo essencial da parte aérea de plantas de <i>Mentha arvensis</i> submetidas à pulverização de quitosana de baixo peso molecular. Experimento II.....	112

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	16
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Importância das Plantas Medicinais	19
2.2	<i>Mentha arvensis</i> L.: Uma espécie de Interesse Medicinal	20
2.2.1	Óleo essencial de <i>Mentha arvensis</i> L.....	23
2.2.1.1	Biossíntese e composição química	23
2.3	Elicidores.....	28
2.3.1	Quitosana	29
3	OBJETIVOS	34
	REFERÊNCIAS.....	35
	CAPÍTULO 2 Influência da quitosana no metabolismo de carboidratos e no sistema antioxidante de <i>Mentha arvensis</i> L.....	46
1	INTRODUÇÃO	48
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1	Obtenção das mudas	50
2.2	Condução do Experimento I.....	50
2.2.1	Obtenção das variáveis	51
2.2.1.1	Metabolismo antioxidante	52
2.2.2	Delineamento experimental e análise estatística	53
2.3	Condução do experimento II	53
2.3.1	Aplicação da quitosana	53
2.3.2	Obtenção das variáveis	54
2.3.2.1	Peroxidação Lipídica	55
2.3.2.2	Quantificação de Carboidratos	56
2.3.3	Delineamento experimental e análise estatística	57
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
3.1	Influência da quitosana no metabolismo de antioxidantes	58
3.2	Influência da quitosana no metabolismo de antioxidantes	62
3.3	Peroxidação lipídica.....	67
3.3.1	Ação da quitosana sobre o metabolismo de carboidratos.....	69
3.3.1.1	Amido	70
3.3.1.2	Açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR).....	73
4	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	CAPÍTULO 3 Influência de quitosana sobre o crescimento, teor, rendimento e perfil do óleo essencial de <i>Mentha arvensis</i> L...	84
5	INTRODUÇÃO	86

6	MATERIAL E MÉTODOS	88
6.1	Obtenção das mudas	88
6.2	Condução do Experimento I	88
6.2.1	Obtenção das variáveis	89
6.2.1.1	Índice de Crescimento fisiológico	90
6.2.1.2	Extração de óleo essencial	90
6.2.1.3	Determinação da composição química do óleo essencial	91
6.2.2	Delineamento experimental e análise estatística	92
6.3	Condução do experimento II	92
6.3.1	Aplicação da quitosana	93
6.3.2	Obtenção das variáveis	94
6.3.3	Delineamento experimental e análise estatística	94
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
7.1	Produção de Biomassa	95
7.2	Teor e rendimento de óleo essencial	100
7.3	Composição química do óleo essencial	101
7.4	Produção de Biomassa	104
7.5	Teor e rendimento de óleo essencial	108
7.6	Composição química do óleo essencial	111
8	CONCLUSÃO	115
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
	REFERÊNCIAS	117
	APÊNDICES	124

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Os vegetais, com potencial terapêutico ou plantas medicinais, têm sua utilização registrada desde a antiguidade na medicina popular e seus benefícios têm despertado o interesse de diversas pesquisas. Dessa forma, estas espécies compõem um ciclo industrial e comercial de grande importância, preconizando o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo e manejo. Neste contexto, dentro do gênero *Mentha*, que possui diversas espécies potenciais em princípios ativos, encontra-se *Mentha arvensis* L. família Lamiaceae popularmente conhecida como hortelã japonesa, vic dentre outros nomes populares (LORENZI; MATTOS, 2008; SOUZA; LORENZI, 2012).

O emprego de *Mentha arvensis* na medicina caseira sob a forma de chá tem ocorrido em virtude de sua ação estomática, antigripal e descongestionante nasal (BHATIA et al., 2014). Com o objetivo de descobrir ações potenciais do extrato de suas folhas, alguns trabalhos evidenciaram potencial antimicrobiano, antiparasitário e hepatoprotetor (COUTINHO et al., 2008, 2012; PATIL; MALL, 2012; SANTOS et al., 2012).

Além disso, o óleo essencial de *M. arvensis* apresenta considerável valor comercial pelo fato de conter mentol, constituinte majoritário que é comercializado na forma cristalizada para indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos. O óleo parcialmente desmentolado bem como outros monoterpenos obtidos do seu fracionamento, também, são subprodutos demandados pela indústria (RAM; RAM; SINGH, 2006; SRIVASTAVA et al., 2002). Isso faz com que a espécie seja considerada uma das plantas de maior importância para produção mundial de óleos essenciais, atingindo quantidades

comercializadas de óleo superiores a mil toneladas por ano (t/a) (FRANZ; NOVAK, 2009).

Seu cultivo para a produção de óleo essencial ocorre em países como China, Estados Unidos, França e Índia, mas é neste último que sua produção tem sido maior e constituído uma atividade chave para pequenos agricultores (KUMAR et al., 2011). Os óleos essenciais são substâncias voláteis obtidas por arraste a vapor ou pela expressão de pericarpos de frutos cítricos. Derivam principalmente de terpenoides cuja origem biossintética provém de unidades do isopreno (C₅) com base no ácido mevalônico (SIMÕES, 2010). Por se tratar de compostos do metabolismo secundário, sua produção está relacionada com a defesa do vegetal frente às adversidades do ambiente.

Percebe-se que os fatores abióticos influenciam diretamente na produtividade do vegetal, inclusive, na produção de óleo essencial (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003), por isso, é importante conhecer o comportamento da espécie medicinal sob condições adversas. Muitas vezes, a falta de domínio tecnológico das etapas de cultivo pode acarretar na redução de biomassa e, consequentemente, redução do rendimento e de constituintes presentes no óleo essencial (CHAGAS; PINTO; BERTOLUCCI, 2011). Além destes fatores, a aplicação de substâncias exógenas com potencial eliciador também pode interferir na produtividade destes vegetais, pois, desencadeiam respostas simulando o ataque de patógenos ou agindo diretamente na resistência sistêmica adquirida (RSA) (CAMPOS et al., 2009; MATTOS-JUNIOR; QUAGGIO; BOARETO, 2010; MAZARO, 2007).

O emprego de eliciadores na agricultura tem buscado a promoção do desenvolvimento e produção vegetal (BOSE et al., 2013). A aplicação foliar de quitosana, por exemplo, acarretou em maior desenvolvimento vegetal em morangueiros bem como produção de carboidratos totais nos frutos (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). A quitosana consiste em um polímero obtido pelo

processo de desacetilação da quitina de carapaças de crustáceos e tem sido utilizada como eliciador entre outras aplicações.

Dependendo da concentração de eliciador utilizada, esta pode provocar um estresse e ocasionar alterações metabólicas como produção de espécies reativas de oxigênio (Eros), levando à ativação de enzimas do metabolismo antioxidante, bem como alterar rotas metabólicas envolvidas com a produção de substâncias de reserva, além de outras de interesse medicinal provenientes do metabolismo secundário.

Com base nisso, tal proposta foi construída para testar a aplicação da quitosana como substância eliciadora na cultura de *Mentha arvensis* L. e sua influencia no teor, rendimento e composição de óleo essencial, bem como sua ação no metabolismo de resposta da espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

À medida que a pesquisa científica avança no cenário mundial, promove o desenvolvimento intelectual e tecnológico. Por meio do conhecimento da biodiversidade, é possível se relacionar com ambiente e assim criar processos e produtos que poderão facilitar o uso racional dos recursos disponíveis e beneficiar a sociedade de forma sustentável.

2.1 Importância das Plantas Medicinais

As plantas medicinais constituem um grupo de vegetais de grande importância por se tratar de espécies que possuem metabólitos especiais com propriedades medicinais e que podem suprir a demanda da indústria por novas fontes naturais de medicamentos.

Trabalhos já realizados com enfoque na utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos, em determinadas regiões do Brasil, sugerem que a utilização destas plantas se dá em sua maioria entre os moradores de comunidades locais principalmente no serviço público (SANTOS et al., 2009). Assim, percebe-se a influência das informações desse gênero na vida dessas pessoas, podendo contribuir de forma eficaz quando atrelada à pesquisa.

A utilização de plantas medicinais tem fortes ligações culturais uma vez que seus usos se relacionam diretamente aos costumes de determinados povos. É necessário, porém, um acompanhamento desse uso visando, entre outros aspectos, à preservação de espécies vulneráveis à exploração irracional (GOMES et al., 2008; LAMEIRA, 2008). Nesse sentido, faz-se necessário um conjunto de ações que propiciem este equilíbrio e mais ainda, que devolvam de forma elaborada maneiras eficientes de se preparar estas plantas potencializando seus efeitos terapêuticos.

Apesar dos avanços da medicina moderna, nos últimos anos, as plantas continuam sendo utilizadas e estima-se que cerca de 25% a 30% de todas as drogas avaliadas com potencial terapêutico são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR, 2008).

2.2 *Mentha arvensis* L.: Uma espécie de Interesse Medicinal

Entre a variedade de plantas medicinais, encontra-se a *Mentha arvensis* L. pertencente à família Lamiaceae. Trata-se de uma erva anual perene, ereta, com caule quadrangular, ramificado podendo atingir até 90 cm de altura. Suas folhas são grandes, opostas, ovaladas e largas, pubescentes, com limbo mais ou menos plano e bordas serrilhadas. A inflorescência consiste em espiga terminal com a presença de flores violáceas (LORENZI; MATOS, 2008)(Figura1).



Figura 1 Fotografia de *Mentha arvensis* L. cultivada em canteiro.

Entre os nomes populares aplicados a esta espécie, destacam-se os seguintes: hortelã-do-Brasil, hortelã-japonesa, vique, vic, hortelã, menta, hortelã-pimenta, hortelã-das-cozinhas, menta-inglesa (LORENZI; MATOS, 2008).

Seu sistema radicular é formado por grande quantidade de "rizomas" ou estolões que se espalham pela camada superficial do solo, emitindo raízes e novos rizomas, dos quais se originam novas plantas. Esses estolões são quadrangulares, vigorosos e frágeis (HERBOTECHNIA, 2014; MOTA; RODRIGUES, 2014).

Por meio dessa abundante perfilhagem, a planta em pouco tempo passa a ocupar grande área de terreno ao seu redor. Estas características fazem com que *Mentha arvensis* se apresente altamente exigente as questões de solo e clima, com especial referência à fertilidade do solo, ao suprimento de água, à

concorrência de plantas daninhas, não resistindo à seca, à geada e ao excesso de umidade (BRILHO, 1963).

A menta (*Mentha spp.*) apresenta grande utilização na culinária e no uso medicinal, como (analgésico estomacal e intestinal, estimulante de funções cardíacas e utilizada contra cólicas, azia, gastrite e gases). Em comunidades da Índia e do Paquistão, o decocto de suas folhas é utilizado no tratamento de espasmos abdominais e estimulante do apetite. Seu emprego na medicina local se deve principalmente para o tratamento de distúrbios gastrointestinais como aponta os levantamentos etnobotânicos (BHATIA et al., 2014; BIBI et al., 2014).

M. arvensis tem sido empregada em diversas pesquisas demonstrando resultados pertinentes no controle de doenças. No geral os extratos produzidos nos trabalhos são provenientes de folhas e utilizam clorofórmio, etanol, metanol, água ou uma mistura (metanol/água; etanol/água) na extração.

O extrato etanólico das folhas de *M. arvensis* apresentou eficácia contra cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis* apresentando 65 e 47% de inibição na concentração de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Com base nesses resultados, os autores da pesquisa afirmam que a espécie pode ser considerada uma fonte natural alternativa no combate a estes parasitas (COUTINHO et al., 2012). Foi observada atividade inibitória moderada sobre *Helicobacter pylori* do extrato de *M. arvensis* contendo água e etanol (30:70) (ZAIDI et al., 2012).

A utilização concomitante do extrato etanólico de *M. arvensis* e Metronidazol proporciona uma potencialização deste contra *Candida tropicalis* o que justifica o emprego de produtos naturais em formulações com o objetivo de aprimorar o efeito terapêutico (SANTOS et al., 2012). O extrato metanólico mostrou significativa atividade antioxidante e antidepressiva em testes preliminares preconizando novos trabalhos nesse âmbito (TUPE et al., 2010).

O efeito hepatoprotetor de extratos de *M. arvensis* (3000mg Kg⁻¹) foi significativo quando comparado com a utilização de Silimarina em ratos com danos hepáticos.

Foi realizada a análise fitoquímica do extrato de *Mentha arvensis* e evidenciou-se a presença de flavonoides, esteroides, triterpenoides, alcaloides, glicosídeos, hidratos de carbono, taninos e compostos fenólicos (PATIL; MALL, 2012).

2.2.1 Óleo essencial de *Mentha arvensis* L.

Esta espécie é integrante de um grupo de plantas consideradas de maior importância para a produção mundial de óleos essenciais, atingindo quantidades comercializadas de óleo essencial superiores a mil toneladas por ano (t/a) (FRANZ; NOVAK, 2009). O óleo essencial de *M. arvensis* é rico em mentol, constituinte muito utilizado pela indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (RAM; RAM; SINGH, 2006). Seu cultivo tem sido prática comum na Índia onde a extração do seu óleo essencial constitui atividade chave de pequenos agricultores (KUMAR et al., 2011).

2.2.1.1 Biossíntese e composição química

Óleos essenciais ou óleos voláteis são substâncias obtidas de partes de plantas, por meio de destilação por arraste com vapor d'água ou pela expressão de frutos cítricos. São misturas complexas de compostos voláteis, lipofílicas, geralmente apresentam odor característico e apresentam forma líquida. São chamados também de essências pelo fato de muitos óleos possuírem aroma agradável (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO, 2004; SIMÕES, 2010).

Os terpenoides são constituídos de uma gama de substâncias, sendo este termo utilizado para se referir às substâncias que têm sua origem biossintética derivada de unidades do isopreno (C5), esta que, por sua vez, origina-se conforme o ácido mevalônico (SIMÕES, 2010). Essas unidades de isopreno são condensadas em compostos em formato de anel contendo as seguintes nomenclaturas e quantidades de carbono, respectivamente: (monoterpenoides = 10C), (Sesquiterpenoides = 15C), (Diterpenoides = 20C) ou (triterpenos = 30). Os óleos essenciais constituem os terpenoides de 10 ou 15 carbonos (SALISBURY; ROSS, 2012). Observar rota dos terpenos (Figura 2).

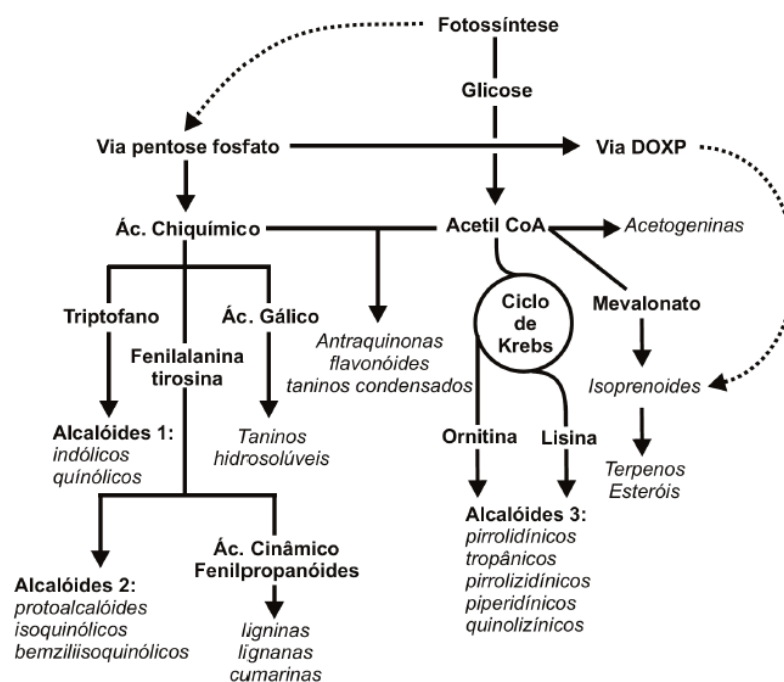


Figura 2 Rotas metabólicas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários observam-se dois precursores principais Ácido chiquímico e acetato. Via Deoxixilulose-5-fosfato (DOXP) associada à biossíntese de terpenoides em plantas

Fontes: Eisenreich, Rohdich e Bacher (2001), McCaskill e Croteau (1999), Simões (2010) e Souza (2010).

Os óleos essenciais do gênero *Mentha* apresentam diferentes classes de substâncias em sua composição, principalmente, terpenoides e fenilpropanoides com estruturas químicas variadas que constituem o metabolismo secundário do vegetal de origem (DURDAREVA; GERSHENZON, 2004; SIMÕES, 2010).

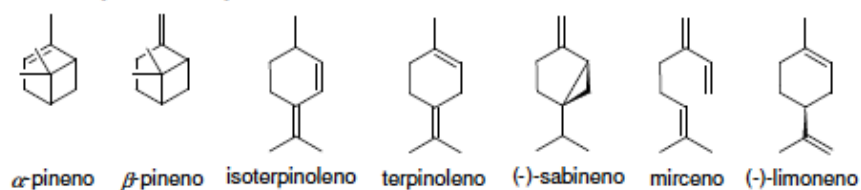
Foi observado que a qualidade do óleo de *M. arvensis* é maior na primeira colheita realizada próxima aos 100 dias de cultivo. Dentre os constituintes de seu óleo encontram-se olimoneno, o octanol, a mentona, a isomentona, o acetato do mentil, o neo-mentol, o mentol e o iso-mentol. Estes constituintes ocuparam aproximadamente 93% do óleo essencial na pesquisa de (KUMAREt al., 2000).

Os monoterpenos majoritários encontrados em *M. arvensis* (Mentol e mentona), podem apresentar variações na porcentagem do óleo essencial em função da condição do material para extração. Folhas frescas geralmente resultam numa maior porcentagem destes compostos quando comparados com a matéria seca (EL-NAKHLAWY; SHAHEEN; AL-SHAREEF, 2013).

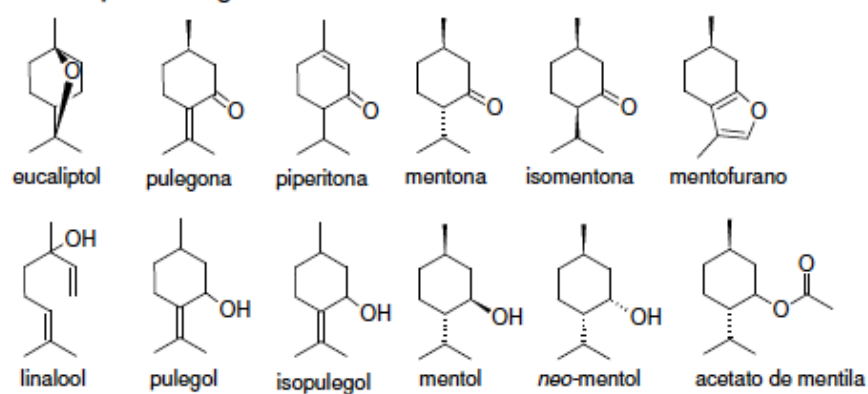
Além disso, a época de colheita também pode interferir substancialmente na constituição do óleo essencial podendo variar o rendimento de 0,40% a 1,10% o que foi verificado no trabalho de (PADALIAet al., 2015) onde analisaram e compararam o rendimento e a qualidade do óleo essencial de espécies de menta incluindo *M. arvensis*, cultivadas no inverno e primavera-verão.

Em virtude do mencionado, observa-se que a constituição química do óleo essencial de determinada espécie, pode ser alterada de acordo com as ações ambientais a que esta foi submetida, alterando o perfil químico, aumentando ou diminuindo substâncias de interesse. Na figura (3) a seguir, estão apresentadas as moléculas dos constituintes mais encontrados no óleo essencial de *M. arvensis*.

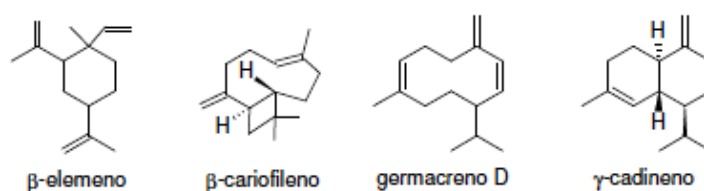
Monoterpenos simples



Monoterpenos oxigenado



Sesquiterpenos



Fenilpropanóides

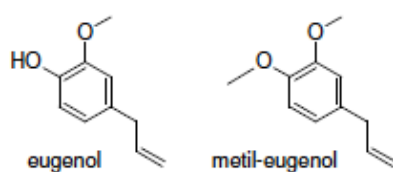


Figura 3 Substâncias encontradas nos óleos essenciais de espécies do gênero *Mentha*

Fonte: Adaptado de Souza (2010).

O interesse econômico em espécies de *Mentha* deve-se, principalmente, à exploração comercial dos óleos essenciais que são substâncias complexas com grande polimorfismo químico. As alterações químicas podem ser advindas principalmente de fatores externos como a sazonalidade (DESCHAMPS et al., 2008). Estas alterações ocasionadas por agentes exógenos podem ser interessantes no que se diz respeito ao perfil químico almejado pela indústria.

O constituinte majoritário do óleo essencial de *M. arvensis* é o mentol um produto de larga aplicação na indústria alimentícia, perfumaria e farmacêuticos (GRISSET et al., 2006). Os monoterpenos fazem parte da constituição química do seu óleo essencial e em ambiente natural são considerados os responsáveis pela defesa do vegetal contra ataques de herbívoros, agentes microbianos e alelopáticos (CARDOSO et al., 2001).

Há ocorrência de diversas movimentações de diferentes tipos de óleo de *Mentha* no sistema ALICE – web (Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior), porém, o óleo de *M. arvensis* é destaque em termos de volume e valor comercializados (ALICE, 2015). O Brasil já chegou a atingir um máximo da produção deste óleo em 1973 com cerca de 6.300 t de óleo bruto sendo considerado o maior produtor mundial do mesmo. À medida que sua produção caía no Brasil, aumentava-se no Paraguai ocorrendo migração da cultura de *M. arvensis*.

Este fato se deve em grande parte à falta de manejo e técnicas eficientes de cultivo, o que levou o Brasil a importar mentol da Índia, fato este que tem impactado negativamente na balança comercial brasileira em cerca de 10 milhões de dólares/ano observado entre 2005 e 2008 (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

2.3 Elicidores

Nos estudos de relevância da atualidade, encontra-se a utilização de compostos químicos eliciadores que desencadeiam a ativação gênica nas plantas. O termo do inglês *Elicitor* em sua forma traduzida é encontrado de duas formas na literatura: “Elicitores” (ASSIS; ANDRADE, 2014; DAPPERet al., 2013; GONZÁLEZ PEÑA; COSTALES; FALCÓN, 2014; SALISBURY; ROSS, 2012; SAUTTERet al., 2011) e “Eliciadores” (MANSUR; SANTOS, 2014; MEINERZet al., 2014; OLIVEIRAet al., 2014). Ambas são utilizadas para se referir às substâncias exógenas que induzem uma resposta de defesa no vegetal, seja produzindo fitoalexinas (substâncias de defesa como antimicrobianos), compostos secundários entre outras. No presente trabalho optou-se por utilizar o termo eliciador.

Com base nisso, diversos trabalhos têm buscado entender a ação destes compostos sobre o vegetal e a síntese de substâncias decorrentes da indução por eliciadores. Os eliciadores agem, muitas vezes, simulando um ataque de patógeno ao vegetal, Como resultado ocorrem a síntese e a acumulação de metabólitos secundários (fitoalexinas e compostos fenólicos), macromoléculas estruturais (calose, lignina e glicoproteína rica em hidroxiprolina) entre outros (ALAMINOet al., 2013).

Pesquisas demonstram que a resposta aos eliciadores envolve, na maioria das vezes, a síntese de compostos secundários (metabólitos especiais) e, portanto, a indução da resistência pode alterar o particionamento de carbono e consequentemente o desenvolvimento vegetal (ANTONIAZZI; DESCHAMPS, 2006).

Um eliciador pode ser mais bem definido como uma substância que, quando introduzida em pequenas concentrações em um sistema de célula viva, inicia ou potencializa a biossíntese de compostos específicos (NAMDEO, 2007;

TAIZ; ZEIGER, 2004;). De certa forma, estas substâncias agem na defesa induzida do vegetal promovendo ou potencializando sua resposta imunitária.

As pesquisas envolvendo eliciadores procuram identificar aquelas substâncias que potencializam a produção de compostos secundários de interesse como é o caso de *Catharanthus roseus* cujo metabólito secundário é um alcaloide anticancerígeno de grande interesse farmacêutico (VÁZQUEZ-FLOTA et al., 2009).

O aumento potencial da produtividade do mentol também foi observado na cultura de células de *Mentha piperita* com adição de extratos do fungo *Aspergillus niger* como eliciador (CHAKRABORTY; CHATTOPADHYAY, 2008). A adição dos eliciadores ácido jasmônico e metil jasmonato em cultura de suspensão de células de *Mentha piperita* forneceu resultados relevantes em relação à produção de ácido rosmarínico pela espécie em comparação com grupo não tratado (KRZYZANOWSKA et al., 2012).

Nesse contexto, a quitosana se enquadra entre as substâncias abióticas sinalizadoras, envolvida principalmente em respostas de defesa sistêmica das plantas por alterar a produção de compostos secundários. Os mecanismos de ação envolvidos nestas respostas ainda não foram totalmente elucidados, uma vez que cada espécie responde de forma diferente a um mesmo agente exógeno.

2.3.1 Quitosana

Quitina e quitosana são copolímeros constituídos por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em proporções variáveis e o primeiro tipo dessas unidades predomina no caso de quitina, enquanto quitosana é composta, predominantemente, por unidades D-glicosamina.

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e

filmes e membranas poliméricas (NAKATSUTA; MICHAELS, 1992; TONHI; GPLEPIS, 2002), apresenta ação fungistática no crescimento micelial de fungos (FREDDOI; MAZAROI; JÚNIOR, 2014; PACHECO et al., 2008; RABEA et al., 2003), ação antimicrobiana contra bactérias fitopatogênicas (LOU et al., 2011), agindo também como filme protetor conservando, mantendo a aparência e prevenindo o escurecimento de frutos (ASSIS; LEONI, 2003; HOJO; DURIGAN; HOJO, 2011).

Apesar de vários estudos apresentarem uma ação significativa da quitosana como antifúngico e antimicrobiano, o mecanismo pelo qual ela exerce estes efeitos ainda não foi elucidado (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011). Dessa forma, alguns estudos sugerem que a quitosana tem a capacidade de ligar-se com o DNA afetando a síntese de mRNA e alterando a conformação da molécula de DNA. Pode agir exercendo um efeito sobre a membrana plasmática alterando sua permeabilidade, levando a variações ultraestruturais culminando na ruptura da parede celular em fungos (SINGH; SINGH, 2011).

A quitosana interage com o vegetal simulando um ataque de patógeno, com isso, promove o desencadeamento das respostas de defesa na planta. Verifica-se que na interação patógeno planta, a célula responde por meio da explosão oxidativa, considerado um mecanismo de defesa bioquímico, classificado como pós-formado (ativo ou induzível) (PASCHOLATI; LEITE, 1994; STANGARLIN et al., 2011).

Quando submetida a estresses bióticos e abióticos, a planta tende a produzir grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROS), o que pode acarretar em danos celulares e até mesmo ocasionar sua morte. Existe, no entanto, enzimas que atuam no sistema de defesa antioxidante, são elas: Dismutase do superóxido (SOD), Catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) dentre outras (BARBOSA et al., 2014; COSTA et al., 2014). Estas enzimas atuam mantendo os níveis de radicais livres reduzidos. A dismutase do

superóxido age catalisando a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 enquanto que a catalase e a peroxidase do ascorbato quebram o H_2O_2 em H_2O e O_2 (CARNEIRO et al., 2011).

Os açúcares, além de desempenharem diversas funções no metabolismo celular, tiveram seus papéis como antioxidantes elucidados nos últimos anos (ENDE; EL-ESAWI, 2014; KEUNEN et al., 2013). Açúcares solúveis totais (AST) como a sacarose, rafinose e estaquiase são os principais carboidratos com função antioxidante nos vegetais. Estes açúcares têm seus níveis elevados em resposta a condições de estresse, estando diretamente relacionados à homeostase celular, uma vez que atuam no controle das EROS ocasionadas por essas condições. O acúmulo de AST se relaciona com a defesa antioxidante dos vegetais pela neutralização das EROS, em especial, o radical hidroxila, por ser um dos mais reativos (KEUNEN et al., 2013). Além disso, a hidrólise desses açúcares, nas diferentes organelas celulares, inclusive no vacúolo, origina outros açúcares denominados redutores (glicose e frutose) que atuam em importantes processos metabólicos geradores de energia, como a respiração. Dessa forma, a indução de processos metabólicos secundários, por uso de substâncias elicitoras, pode afetar o metabolismo primário, desencadeando estresses (MAZARO, 2007).

As EROS, por serem altamente tóxicas às células, podem acarretar danos às moléculas de ácidos nucleicos, levando à inativação ou mutação, bem como a grupos sulfidrilas das proteínas, além de reagirem com lipídeos, incluindo os presentes nas membranas celulares, degradando-as (BARBOSA et al., 2014). As membranas são os principais alvos de ação das EROS, uma vez que estas reagem com ácidos graxos insaturados desencadeando injúrias, tais como, extravasamento do conteúdo celular, rápida dessecação, acarretando na morte celular. Além disso, a peroxidação lipídica pode comprometer o funcionamento do aparato fotossintético, a deterioração de pigmentos, além de afetar também a

atividade respiratória (FOYER; NOCTOR, 2000; KARABAL; YÜCEL; ÖKTEM, 2003; SCANDALIOS, 1993).

O entendimento acerca destes processos bioquímicos é muito importante, quando se trabalha com eliciadores, uma vez que estes são substâncias exógenas que podem resultar na produção excessiva de EROs no vegetal ocasionando perdas muitas vezes irreversíveis. Além disso, o desenvolvimento de novas técnicas, envolvendo fisiologia vegetal e proteção de culturas, por meio da elicitação de respostas de defesa é necessário, pois procuram elucidar e aprimorar os processos de defesa das plantas (CERON-GARCIA et al., 2012).

Alterações ambientais também podem interferir diretamente na produção de metabólitos secundários. O estudo destas alterações fornece informações acerca de sua influência na regulação de biossíntese destes compostos, contribuindo para o aumento de substâncias de interesse nas espécies aromáticas e medicinais (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003; MORAIS, 2009).

3 OBJETIVOS

Avaliar o desenvolvimento e o comportamento bioquímico/fisiológico de *Mentha arvensis* submetida a tratamentos com quitosana como eliciador, verificando possíveis alterações no metabolismo secundário como a produção e em quantidade e qualidade do óleo essencial.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A. et al. Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application. **European Journal of Scientific Research**, Victoria, v. 39, n. 1, p. 170-177, 2010.

ALAMINO, D. A. et al. Indução de resistência à podridão-amarga em maçãs pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 3, p. 249-254, mar. 2013.

ALICE. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

ANTONIAZZI, N.; DESCHAMPS, C. Análise de crescimento de duas cultivares de cevada após tratamentos com elicitores e fungicidas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1065-1071, jul./ago. 2006.

ASSIS, O. B.; LEONI, A. M. Filmes comestíveis de quitosana. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, n. 30, p. 33-38, 2003.

ASSIS, T. C. de; ANDRADE, D. E. G. T. de. Fitonematoses em Zingiberales ornamentais no Estado de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 4, p. 185-198, 2014.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Bilbao, v. 12, n. 4, p. 195-215, 2011.

BHATIA, H. et al. Ethnomedicinal plants used by the villagers of district Udhampur, J&K, India. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 151, n. 2, p. 1005-1018, Feb. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24365639>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BIBI, S. et al. Ethnobotanical uses of medicinal plants in the highlands of Soan Valley, Salt Range, Pakistan. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 155, n. 1, p. 352-361, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874114004000>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOSE, S. K. et al. Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 66, p. 150-8, May 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514759>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BRILHO, R. C. **A cultura da hortelã pimenta**: manual técnico do engenheiro agrônomo. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1963. 13p.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005.

CAMPOS, Â. D. et al. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 15-21, jan. 2009.

CARDOSO, M. et al. **Metabólitos secundários vegetais**: visão geral química e medicinal. Lavras: UFLA, 2001. 56 p.

CARNEIRO, M. et al. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 752-761, 2011.

CERON-GARCIA, A. et al. **Biochemistry, genetics and molecular biology**. Concordia: Concordia University, 2012. 240 p.

CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 327-334, 2011.

CHAKRABORTY, A.; CHATTOPADHYAY, S. Stimulation of menthol production in *Mentha piperita* cell culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 44, n. 6, p. 518-524, 2008.

COSTA, F. P. et al. Ação da catalase na tolerância de plantas de *Eichhornia crassipes* a Cr^{3+} . In: CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA: O CAMINHO PARA A INOVAÇÃO, 6., 2014, Campos dos Goitacases. **Anais...** Campos dos Goitacases: UENF, 2014. 1 CD-ROM.

COUTINHO, H. et al. Avaliação da atividade anti-Trypanosoma e anti-Leishmania de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 11, n. 2, p. 147-153, 2012.

COUTINHO, H. D. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, Basel, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

DAPPER, T. B. et al. Potencialidades das macroalgas marinhas na agricultura: revisão. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 7, n. 2, p. 295-313, 2013.

DESCHAMPS, C. et al. Avaliação sazonal do rendimento de óleo essencial em espécies de menta. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 725-730, maio/jun. 2008.

DIAS, K. B. et al. Quitina e quitosana: características, utilizações e perspectivas atuais de produção. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3, p. 184-191, 2013.

DURDAREVA, N. P.; GERSHENZON, E. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 4, p. 1893-1902, Aug. 2004.

ENDE, W. van den; EL-ESAWI, S. K. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: a dual function in abiotic and biotic stress responses? **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 108, p. 4-13, Dec. 2014.

EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 78-84, 2001.

EL-NAKHLAWY, F. S.; SHAHEEN, M. A.; AL-SHAREEF, A. R. Response of essential oil and terpene contents of two mint genotypes to different drying temperatures before distillation. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 5, n. 12, p. 126-131, 2013.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Tansley review n° 112: oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. **New Phytologist**, Cambridge, v. 146, n. 112, p. 359-388, June 2000.

FRANZ, C.; NOVAK, J. **3 sources of essential oils: handbook of essential oils: science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC, 2009. 60 p.

FREDDOI, Á. R.; MAZARONI, S. M.; JÚNIOR, E. J. B. A. W. A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 1-4, jan. 2014.

GOMES, E. C. et al. Plantas da caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, Espírito Santo do Pinhal, v. 5, n. 2, p. 1-9, 2008.

GONZÁLEZ-PEÑA, D.; COSTALES, D.; FALCÓN, A. B. Influencia de un polímero de quitosana en el crecimiento y la actividad de enzimas defensivas en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). **Cultivos Tropicales**, La Habana, v. 35, n. 1, p. 35-42, 2014.

GOOSEN, M. F. **Applications of chitin and chitosan**. Lancaster: Technomic, 1997. 336 p.

GRISI, M. et al. Avaliação de genótipos de *Mentha* (*Mentha* ssp) nas condições de Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 33-39, 2006.

HAFDANI, F. N.; SADEGHINIA, N. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, Las Cruces, v. 74, n. 2, p. 257-261, 2011.

HERBOTECHNIA. **Tecnologías de cultivo y poscosecha de plantas medicinales, aromáticas y tintóreas: *Mentha arvensis***. Disponível em: <<http://www.herbotecnia.com.ar/exotica-mentajaponesa.html>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

HOJO, E. T. D.; DURIGAN, J. F.; HOJO, R. H. Uso de embalagens plásticas e cobertura de quitosana na conservação pós-colheita de lichias. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 377-383, 2011.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 9776**:ISO/TC 54 essential oils business plan. Geneva, 2004. 12 p.

KARABAL, E.; YÜCEL, M.; ÖKTEM, H. A. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 6, p. 925-933, 2003.

KEUNEN, E. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 1242-1255, 2013.

KRZYŻANOWSKA, J. et al. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha* × *piperita* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 108, n. 1, p. 73-81, 2012.

KUMAR, S. et al. Economic analysis of menthol mint cultivation in uttar pradesh: a case study of barabanki district. **Agricultural Economics Research**, Washington, v. 24, p. 345-350, July/Dec. 2011.

KUMAR, S. et al. Profiles of the essential oils of Indian menthol mint *Mentha arvensis* cultivars at different stages of crop growth in northern plains. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, Lucknow, v. 22, n. 18, p. 774-786, July 2000.

LAMEIRA, O. **Plantas medicinais**: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008. 264 p.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LORENZI, H.; MATTOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 492 p.

LOU, M. M. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 346, n. 11, p. 1294-1301, 2011.

MANSUR, B. D. M.; SANTOS, B. R. dos. Efeitos da substância de alarme no teste claro/escuro no Zebrafish, *Danio rerio*. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 4, n. 1, p. 87-93, 2014.

MARTINSEN, A.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate as immobilization material: I., correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 33, n. 1, p. 79-89, 1989.

MATTOS-JUNIOR, D.; QUAGGIO, J. A.; BOARETO, R. M. Uso de elicitores para defesa em plantas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 65-74, 2010.

MAZARO, S. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007. 105p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 40, n. 4, p. 653-656, 1999.

MEINERZ, C. et al. Elicidores proteicos e glicídicos de *Adiantum capillus-veneris* L. para fitoalexinas em sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 794-803, 2014.

MORAIS, L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

MOTA, D. S. O.; RODRIGUES, V. G. **Plantas medicinais**: subprojeto instalação de horto-matriz de plantas medicinais em Porto Velho-RO. Porto Velho: EMBRAPA Rondônia, 2001. (Série Plantas Mediciniais). Disponível em: <http://www.cpafrp.embrapa.br/embrapa/infotec/hortela_jap.PDF>. Acesso em: 10 out. 2014.

MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C. Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. In: _____. **Polysaccharides I**. Berlin: Springer, 2005. p. 151-209.

NAKATSUKA, S.; MICHAELS, A. S. Transport and separation of proteins by ultrafiltration through sorptive and non-sorptive membranes. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 189-211, 1992.

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

OLIVEIRA, T. et al. Atividades de quitinase após eliciação das defesas da soja contra a ferrugem asiática. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 47.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MOFO BRANCO, 47., 2014, Londrina. **Anais...** Londrina: SBF, 2014. 1 CD-ROM.

PACHECO, N. et al. Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 43, n. 1, p. 20-26, 2008.

PADALIA, R. C. et al. Quality evaluation of elite mint cultivars in two cropping seasons in subtropical conditions of Uttarakhand, India. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 27, n. 1, p. 45-51, Jan. 2015.

PASCHOLATI, S.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-51, 1994.

PATIL, K.; MALL, A. Hepatoprotective activity of *Mentha arvensis* Linn. leaves against CCL4 induced liver damage in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Canberra, v. 2, n. 1, p. S223-S226, 2012. Supplement.
Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S222218081260156X>>.
Acesso em: 10 nov. 2014.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, London, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

RAM, D.; RAM, M.; SINGH, R. Optimization of water and nitrogen application to menthol mint (*Mentha arvensis* L.) through sugarcane trash mulch in a sandy loam soil of semi-arid subtropical climate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 7, n. 7, p. 886-893, May 2006.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia das plantas**. São Paulo: Cengage Learning, 2012. 774 p.

SANTOS, E. B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 1B, p. 321-324, 2009.

SANTOS, K. K. A. et al. Anti-Candida activity of *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia*. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 15, n. 3, p. 322-324, Mar. 2012.

SAUTTER, C. K. et al. Controle da podridão-parda e características físico-químicas de pêssegos 'Magnum' submetidos a tratamentos pós-colheita com elicitores abióticos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 2, p. 172-177, 2011.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 101, n. 1, p. 7-15, 1993.

SILVA, H.; SANTOS, K. dos; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2010. 104 p.

SINGH, T.; SINGH, A. P. A review on natural products as wood protectant. **Wood Science and Technology**, New York, v. 46, n. 5, p. 851-870, 2011.

SOUZA, C. V.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**:guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2012. 768 p.

SOUZA, M. A. A. **Expressão gênica relacionada à produção de óleo essencial e avaliação do metabolismo de *Mentha arvensis* L. sob diferentes condições de cultivo**. 2010. 123 p. Tese (Doutoradoem Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

SRIVASTAVA, R.et al. Characteristics of menthol mint *Mentha arvensis* cultivated on industrial scale in the Indo-Gangetic plains. **Industrial Crops and Products**,London,v. 15, n. 3, p. 189-198,2002.

STANGARLIN, J.et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**,Cascavel,v. 10, n. 1, p. 18-46,dez. 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia do estresse. In: _____. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.p. 738-772.

TONHI, E.; GPLEPIS, A. M. de. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6A, p. 943-948, 2002.

TUPE, P.et al. Comparative study of *Mentha arvensis* Linn whole plant extracts for antioxidant and antidepressant activity. **Planta Medica**,Stuttgart,v. 76, n. 12, p. 1188-1188, Aug. 2010.

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

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **RevistaBrasileira deFarmacognosia**,São Paulo, v. 18, n. 2, p. 308-313,2008.

ZAIDI, S. F. et al. Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 141, n. 1, p. 403-410, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874112001493>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

CAPÍTULO 2 Influência da quitosana no metabolismo de carboidratos e no sistema antioxidante de *Mentha arvensis* L.

RESUMO

A utilização de substâncias que desencadeiam diferentes respostas fisiológicas nos vegetais tem sido alvo de diversas pesquisas nos últimos anos. As moléculas com este potencial são denominadas Elicitores ou Eliciadores. Ainda não consta na literatura a utilização de quitosana como eliciador em plantas de *Mentha arvensis* L. e sua influência sobre o metabolismo de carboidratos bem como no metabolismo antioxidante desta espécie. *Mentha arvensis* L. é uma planta medicinal com importância econômica dada a sua produção de óleo essencial e em especial pelo teor de mentol, constituinte majoritário. Objetivou-se no presente trabalho avaliar o comportamento bioquímico/fisiológico de *M. arvensis* submetida a tratamentos com quitosana em diferentes concentrações. Foram realizados dois experimentos em épocas distintas sob condições de viveiro com sombreamento de 50%. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com três repetições e cinco tratamentos (Controle, solução de ácido acético glacial 1% e quitosana nas concentrações 0,25%; 0,5% e 0,75%) no experimento I, e quatro tratamentos no experimento II (controle, solução de ácido acético glacial 0,25% e quitosana 0,06% e 0,125%. Tomaram-se por base os resultados obtidos no primeiro experimento para a aplicação destes tratamentos). No primeiro experimento, avaliou-se a atividade das enzimas do metabolismo antioxidante às 24, 48 e 72 horas, no segundo, as coletas de material para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica, ocorreram no tempo zero, às 12, 24 horas e 7 dias após aplicação de quitosana. A coleta para determinação do conteúdo de carboidratos ocorreu no tempo zero às 12 horas, 24 horas e 7 dias após aplicação dos tratamentos apenas no segundo experimento. A quitosana juntamente com o solvente promoveu ativação do metabolismo antioxidante de *M. arvensis*. A diminuição da concentração do solvente e redução das doses de quitosana no segundo experimento também proporcionou a ativação das enzimas SOD e APX, bem como a alteração do metabolismo de carboidratos.

Palavras-chave: Planta medicinal. Substâncias estimuladoras. Metabolismo antioxidante. Conteúdo de carboidratos.

ABSTRACT

The use of substances that trigger different physiological responses in plants has been the subject of many researches in recent years. Molecules with this potential are denominated elicitors. In literature, there is still no use of chitosan as elicitor for *Mentha arvensis* L. plants and its influence over carbohydrate metabolism and antioxidant metabolism in this species. *Mentha arvensis* L. is a medicinal plant with economic importance due to its production of essential oil and, in particular, the content of menthol content, its main constituent. In the present work, we aimed at evaluating biochemical/physiological behavior of *M. arvensis* subjected to treatments with chitosan at different concentrations. Two experiments were conducted at different times under nursery conditions with 50% shading. The experimental design was completely randomized (CRD) with three replicates and five treatments in experiment I (control, 1% glacial acetic acid solution and chitosan in the concentrations of 0.25%, 0.5% and 0.75%) and four treatments in experiment II (control, 0.25% glacial acetic acid solution and 0.06% and 0.125% chitosan based on the results obtained in the first experiment). In the first experiment, we evaluated the activity of antioxidant metabolism enzymes at 24, 48 and 72 hours, in the second, the material collections to evaluate the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation occurred at times zero, 12 and 24 hours and 7 days after applying chitosan. The collection to determine carbohydrate content occurred at times zero and later at 12 and 24 hours and 7 days after treatment application only in the second experiment. Chitosan along with the solvent promoted activation of the antioxidant metabolism of *M. arvensis*. The decrease in the concentration of the solvent and reduction of chitosan doses in the second experiment also provided the activation of enzymes SOD and APX, as well as the change in carbohydrate metabolism.

Keywords: Medicinal plant. Stimulating substances. Antioxidant metabolism. Carbohydrate content.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é fato que remonta a antiguidade e suas aplicações tem acompanhado o homem desde então. É fato que o avanço da ciência moderna tem proporcionado o aprimoramento de seu uso empírico, avaliando formas eficazes de aproveitamento das propriedades destes vegetais.

A família Lamiaceae reúne muitas ervas aromáticas com propriedades medicinais como as pertencentes ao gênero (*Mentha* spp.). Neste, encontramos *Mentha arvensis* L. ou hortelã japonesa como é referida popularmente dentre outros nomes populares (LORENZI; MATTOS, 2008; SOUZA; LORENZI, 2012). Esta espécie tem seu cultivo consolidado principalmente na Índia e faz parte de variados trabalhos envolvendo seu cultivo.

Na medicina popular, a infusão de suas folhas é empregada para o tratamento de transtornos digestivos, descongestionante nasal e antigripal. Seu estudo fitoquímico evidencia a presença de álcoois, cetonas e hidrocarbonetos terpênicos, o que tem propiciado o desenvolvimento de estudos que visam a sua eficiência antiparasitária, antimicrobiana (COUTINHO et al., 2008, 2012), hepatoprotetora (PATIL; MALL, 2012), entre outras ainda em fase de testes.

O interesse pela espécie advém principalmente do valor comercial de seu óleo essencial rico em mentol. A produção anual pode chegar até mil toneladas por ano. Vários produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios utilizam-no em suas composições em razão do aroma mentolado e refrescante (RAM; RAM; SINGH, 2006).

Com o intuito de promover respostas metabólicas nos vegetais, diversos estudos vêm empregando o uso de substâncias eliciadoras bióticas e abióticas. Em alguns casos, estas moléculas, quando aplicadas no vegetal, simulam o ataque de insetos patógenos resultando na produção de fitoalexinas e outras substâncias de defesa ligadas ao metabolismo secundário.

Dependendo da concentração de eliciador utilizada, esta pode provocar um estresse no vegetal, ocasionando em alterações metabólicas como produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem levar à ativação de enzimas do metabolismo antioxidante como estratégia de neutralizar esses radicais.

Algumas enzimas envolvidas neste processo são: a Catalase (CAT), dismutase do superóxido (SOD) e peroxidase do Ascorbato (APX) que constituem um importante sistema antioxidante enzimático do vegetal (BARBOSA et al., 2014; COSTA et al., 2014). Além disso, rotas metabólicas também podem ser influenciadas, atingindo tanto a produção de substâncias de reserva como outras de interesse medicinal provenientes do metabolismo secundário.

A quitosana é considerada um eliciador e está envolvida com a produção de fitoalexinas e substâncias de defesa em plantas (ASSIS; ANDRADE, 2014). Consiste num polissacarídeo obtido da desacetilação da quitina originária da carapaça de crustáceos e seu emprego tanto na indústria como na agricultura vem demonstrando o valor industrial deste biopolímero.

De posse dessas informações, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a interferência da quitosana como substância eliciadora em diferentes concentrações, na produção de substâncias de reserva como açúcares e amido, bem como sua influencia no metabolismo de antioxidantes de *Mentha arvensis* L.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das mudas

Mudas de *M. arvensis* foram preparadas a partir de estacas apicais de matrizes obtidas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA. Utilizaram-se bandejas de poliestireno expandido de 128 células, contendo substrato comercial Plantimax® e cada estaca mantida com dois pares de folhas. As mudas foram mantidas em casa de vegetação, com nebulização controlada até atingirem em média sete centímetros de comprimento e quatro pares de folhas expandidas (aproximadamente 30 dias).

Após esta fase, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de três litros, contendo um substrato constituído por uma mistura de terra, areia e esterco de codorna na proporção 2:1:1, acrescida de adubo comercial NPK 10:10:10 e mantidas sob sombreamento de 50% por 76 dias até a aplicação dos tratamentos com o eliciador, momento este em que as plantas atingiam pleno florescimento.

2.2 Condução do Experimento I

A quitosana utilizada possui 85% de desacetilação e apresenta fórmula molecular $(C_8H_{13}NO_5)_n$. Para sua solubilização, utilizou-se uma solução aquosa de ácido acético glacial 1% sendo o pH final ajustado entre 6 e 6,5 com hidróxido de sódio (NaOH) 10M segundo recomendação de Aguiar (2011).

O experimento I consistiu na aplicação de cinco tratamentos: O controle onde as plantas não foram pulverizadas com quitosana; Um tratamento com aplicação de solução aquosa de ácido acético glacial 1% com pH entre 6e6,5); outro tratamento foi constituído da aplicação de quitosana 0,25%. No

quarto tratamento foi realizada a pulverização de quitosana 0,5% e no quinto tratamento as plantas foram pulverizadas com quitosana 0,75%.

Após a aplicação das substâncias, as plantas foram mantidas em viveiro e protegidas com uma estrutura de metal com cobertura plástica, evitando, assim, a ação de chuvas sobre os tratamentos.

As características analisadas e as épocas de avaliações para diagnosticar a resposta de *M. arvensis* frente à aplicação de quitosana foram: atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX) a qual foi realizada em três épocas: um dia, quatro dias e sete dias após aplicação de quitosana. (APÊNDICE A)

2.2.1 Obtenção das variáveis

Foram analisadas três plantas por tratamento. De cada planta foram analisadas folhas completamente expandidas, localizadas entre o terceiro e quarto nós a partir do ápice. A coleta ocorreu entre às 7h e 8h e as folhas coletadas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer Forma Scientific* a -80 °C, até o preparo do extrato proteico, para a avaliação das atividades enzimáticas.

O extrato enzimático foi obtido pela maceração de 200 mg de folhas frescas em nitrogênio líquido com 50% de PVPP, em seguida, foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração em cada amostra. Composição do tampão de extração: 375 µl de tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), 15 µL de EDTA 0,1 mM, 75µl de ácido ascórbico 200 mM 1035 µl de água destilada. O extrato foi centrifugado a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posteriores análises das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX).

2.2.1.1 Metabolismo antioxidante

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 5 µL do extrato enzimático ao meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 mM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. As placas, contendo o meio de incubação mais amostra, foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos. Para o controle, foi utilizado o mesmo meio de reação sem a amostra. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi realizado com base na Equação 1 - Obtenção da atividade da SOD. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

$$Inibição(\%) = \frac{A560 \text{ (amostra com extrato enzimático)} - A560 \text{ (controle sem enzima)}}{A560 \text{ (controle sem enzima)}} \quad (1)$$

A atividade da CAT foi monitorada pelo consumo do peróxido de hidrogênio, em que se observa o decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos por 3 minutos. A CAT foi avaliada conforme Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 9 µL do extrato enzimático foi adicionada a 180 µL do meio de incubação, contendo 90 µL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 72 µL de água destilada e 9 µL de peróxido de hidrogênio 250 mM, incubado a 28°C. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 36 mM⁻¹ cm⁻¹.

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 9 µL do extrato enzimático foi adicionada ao tampão de incubação

composto por fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), de ácido ascórbico 10 mM, água destilada e peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981).

2.2.2 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), consistindo em cinco tratamentos (controle, solvente, quitosana 0,25%, 0,5% e 0,75%). A parcela experimental foi composta por 4 plantas, totalizando 80 plantas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados) (FERREIRA, 1999). Quando encontradas diferenças significativas, as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) ou Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

2.3 Condução do experimento II

O experimento II foi conduzido sob condições de viveiro no setor de Fisiologia Vegetal da UFLA e o preparo das mudas e do solo utilizados seguiu a mesma metodologia do experimento I.

2.3.1 Aplicação da quitosana

Para a dissolução da quitosana utilizou-se uma solução aquosa de ácido acético glacial 0,25% e seu pH foi ajustado entre 6 e 6,5 com hidróxido de sódio (NaOH) 10M (AGUIAR, 2011) (modificado com base nos resultados do experimento I).

Quando as plantas estavam em pleno florescimento, (90 dias após o transplântio), estas foram submetidas à pulverização de quitosana. Esta época de aplicação (florescimento) se deve ao fato de a farmacopeia europeia recomendar a extração do óleo essencial das sumidades floridas da parte aérea de *Mentha arvensis* L como processo imprescindível para garantir a qualidade do óleo bem como sua comercialização (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION- ISO, 2004; MARTINSet al., 2011).

Em relação aos tratamentos utilizados, estes consistiram em: Tratamento controle: Aplicação de água destilada, tratamento um (T1): solução aquosa de ácido acético glacial 0,25%, tratamento dois (T2): Solução de quitosana 0,06% e tratamento três (T3): Solução de quitosana 0,125%, sendo pulverizado um volume de 60 mL em cada planta.

Após a aplicação das substâncias, as plantas foram mantidas sob as mesmas condições descritas no experimento I e as características analisadas bem como épocas de avaliação para diagnosticar a resposta de *M. arvensis* frente à aplicação de quitosana foram: atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica realizadas em quatro períodos: tempo zero (T0), doze horas (12h), vinte e quatro horas (24h) e sete dias (7d) após a aplicação dos tratamentos e quantificação de carboidratos realizada em três períodos: tempo 0 (T0), vinte e quatro horas (24h) e sete dias (7d) após a aplicação de quitosana. (APÊNDICE B).

2.3.2 Obtenção das variáveis

Foram analisadas três plantas por tratamento. De cada planta foram analisadas folhas completamente expandidas, localizadas entre o terceiro e quarto nós a partir do ápice. A coleta de material para enzimas do sistema antioxidante e peroxidação lipídica ocorreu entre às 7h e 8h e as folhas coletadas

foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer Forma Scientific* a -80°C , até o preparo do extrato proteico, para a avaliação das atividades enzimáticas (conforme descrito no subitem 2.2.1.1 Metabolismo antioxidante, do experimento I), lembrando que neste experimento II também foi coletado material para avaliar a peroxidação lipídica. O mesmo foi armazenado sob as mesmas condições das enzimas antioxidantes descritas no referido subitem.

Para a quantificação de carboidratos as plantas foram seccionadas separando-se a parte aérea da parte subterrânea (considerando nesta porção raízes e estolões). A parte subterrânea foi lavada para remover o substrato, em seguida, as diferentes partes das plantas foram acondicionadas em sacos de papel Kraft e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, até atingirem massa constante. Posteriormente, a matéria seca foi pulverizada em moinho de facas (Velocidade de rotação: 5 a 18 ms^{-1}) e o material obtido da parte aérea e parte subterrânea foram armazenados em frascos de 30 mL tampados, identificados e mantidos sob proteção da incidência de luz e calor até as análises subsequentes.

2.3.2.1 Peroxidação Lipídica

A Peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (BUEGE; AUST, 1978). Para tanto, 200 mg de folhas e raízes foram maceradas em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m,v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos, e alíquotas de 250 μL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação, composto por 0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA, incubando-se, em seguida, a 95°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pelo resfriamento

rápido em gelo e as leituras determinadas em ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*). Nessa reação, o TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixo peso molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de Peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada de acordo com a Equação 2 - Quantificação de peroxidação lipídica :

$$[MDA] = \frac{(A_{535} - A_{600})}{(\xi \cdot b)} \quad (2)$$

Onde “ ξ ” é o coeficiente de extinção molar = $1,56 \times 10^{-5}$, e “b” o comprimento ótico = 1.

2.3.2.2 Quantificação de Carboidratos

Os carboidratos foram extraídos de 200 mg da massa seca pulverizada proveniente da parte aérea e subterrânea, as quais foram homogeneizadas em 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, seguido de banho-maria a 40°C por 30 minutos. O homogeinato foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos coletando-se o sobrenadante. O procedimento foi repetido por mais duas vezes, e os sobrenadantes combinados.

Para a extração do amido, o pellet foi novamente ressuscitado com 8 mL de tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8. Em seguida, foi adicionado 2 mL da solução da enzima amiloglucosidase 1 mg mL^{-1} , incubando-se em banho-maria a 40°C por duas horas. Logo após, houve a centrifugação a 10.000 g por 20 minutos, o sobrenadante coletado, o volume completado para 15 mL com água destilada, transferido para tubos cônicos tipo *Falcon* de 50 mL devidamente identificados e armazenados a -20°C.

Para a quantificação do amido e açúcares solúveis totais (AST) foi utilizado o método da Antrona (DISCHE, 1962) e para os açúcares redutores (AR), foi utilizado o método do reagente DNS (MILLER, 1959).

2.3.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), sendo três repetições e quatro tratamentos (controle, solução de ácido acético glacial 0,25%, quitosana 0,06%, 0,125%). A parcela experimental foi composta por sete plantas, totalizando 84 plantas.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F ($p < 0,05$) e sendo significativos, as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974), utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados) (FERREIRA, 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência da quitosana no metabolismo de antioxidantes

No experimento I, a atividade da enzima SOD às 24 horas foi maior nas plantas pulverizadas com quitosana independente da sua concentração. Às 48 horas observou-se um acréscimo na atividade apenas para as plantas tratadas com solvente e quitosana 0,25%. Em 72 horas após a imposição dos tratamentos, verificou-se que as plantas controle e as tratadas com quitosana, apresentaram maior atividade desta enzima. Ao longo do tempo, verificou-se que plantas controle aumentaram a sua atividade às 72 horas, já plantas tratadas com solvente apresentaram um aumento apenas às 48 horas. Plantas tratadas com quitosana 0,25% mantiveram a sua atividade ao longo do período experimental, quitosana 0,5% provocou um aumento da atividade apenas nos tempos 24 e 72 horas e plantas tratadas com 0,75% apresentaram uma maior atividade às 72 horas (Figura 1-A).

No tratamento controle a atividade da APX às 24 horas foi maior do que os demais tratamentos, já às 48 horas verificou-se que o tratamento com 0,25% apresentou maior atividade, quando comparado com os demais, às 72 horas houve um aumento expressivo na atividade de plantas tratadas com 0,5% de quitosana quando comparada com os outros tratamentos. Ao longo do tempo, verificou-se para todos os tratamentos um aumento na atividade desta enzima (Figura 1-B).

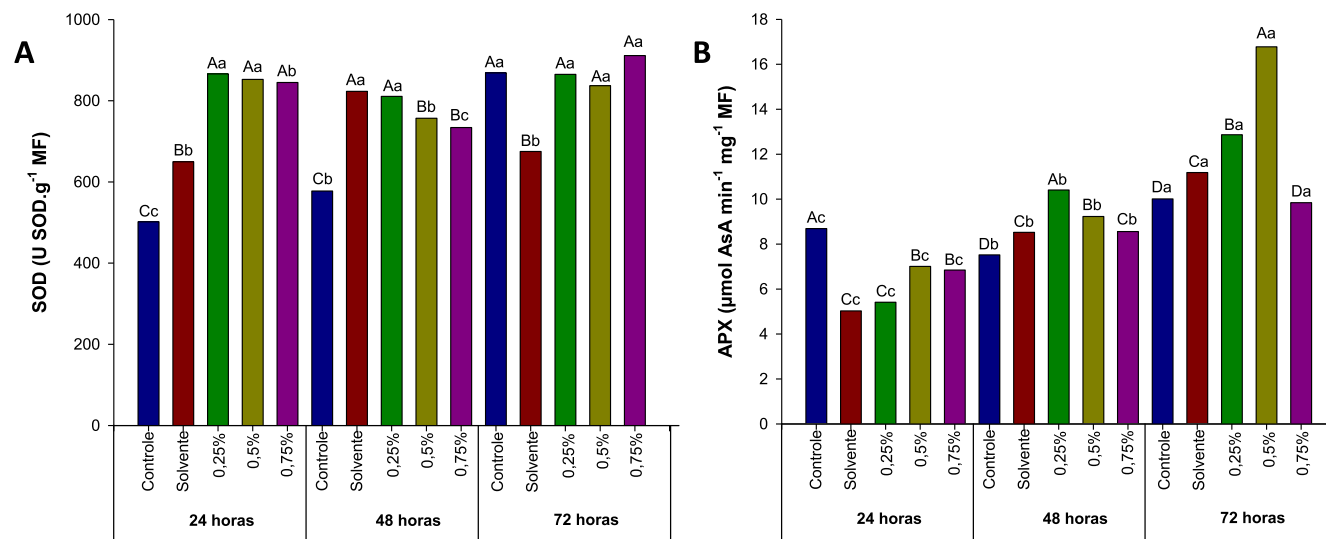


Figura 1 Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e APX (B) de folhas de plantas de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (sem aplicação)

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as minúsculas comparam dentro dos tratamentos nos diferentes períodos de coleta, com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A enzima catalase (CAT) não apresentou atividade nas análises realizadas. Foram efetuadas quatro tentativas modificando - se as condições de incubação para verificar a atividade, porém as leituras não apresentaram resultados pertinentes em relação à atividade da mesma.

A extensão do estresse oxidativo em uma célula é determinada pelas atividades das enzimas antioxidantes, pois estas são importantes para a redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os resultados indicam que no geral os tratamentos com quitosana levaram a um acréscimo na atividade das enzimas avaliadas, quando comparadas com o controle, indicando que estas plantas estavam mais estressadas (FAN et al., 2010; LEI et al., 2011).

A quitosana constitui um biopolímero oriundo da quitina considerado um eliciador abiótico, pois quando aplicado sobre o vegetal, pode desencadear respostas de defesa por simular o ataque de insetos. Resultados de outros trabalhos sustentam essa afirmação. Quando aplicada em maçãs pós-colheita, a quitosana reduziu consideravelmente as lesões ocasionadas por fungos causadores da podridão-amarga (CAPDEVILLE et al., 2002; FELIPINI; DI PIERO, 2009). Ela age sobre o vegetal desencadeando mecanismos de defesa estruturais e ou bioquímicos (CAVALCANTE, 2005).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos vegetais tende a aumentar decorrente de estresses bióticos ou abióticos, porém, este aumento pode resultar em danos celulares severos acarretando em morte. Este fato pode ser evitado pelas enzimas do metabolismo antioxidante como a CAT, SOD e APX (BARBOSA et al., 2014; COSTA et al., 2014).

O fato das plantas do tratamento controle terem apresentado aumento na atividade da SOD a partir das 48 horas e, principalmente, às 72 horas, merece algumas considerações. Para isso, é preciso entender alguns processos que ocorrem inerentes à interferência humana. No ambiente natural, as plantas estão sujeitas a diversas interações bióticas e abióticas. A herbivoria, por exemplo,

configura uma forma de interação biótica que exige do vegetal a produção de substâncias que podem agir em sua defesa como os produtos oriundos do seu metabolismo secundário (SCHOONHOVEN; LOON; DICKE, 2005).

Além disso, é importante lembrar que a defesa do vegetal não ocorre única e exclusivamente de forma constitutiva, mas também pode ser induzida em resposta a possíveis estresses como a herbivoria entre outros (KARBAN; BALDWIN, 2007). Alguns estudos apresentam explicações pertinentes acerca de como ocorre essa indução da defesa, evidenciando os voláteis induzidos. Estes compostos são produzidos em resposta a um ataque de patógeno ou herbivoria e servem como sinalizadores para plantas vizinhas, fazendo com que estas estejam preparadas para a condição adversa a que serão submetidas (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013).

Com base nisso, podemos considerar no presente trabalho que as plantas controle podem ter sofrido influência das plantas tratadas com quitosana, uma vez que estas já apresentaram alta atividade enzimática às 24 horas após a pulverização mantendo-se até as 72 horas. O aumento da atividade no controle ao longo do tempo ocorreu gradativamente o que sustenta esta consideração.

Outro trabalho envolvendo *Mentha pulegium*, espécie medicinal do mesmo gênero, mostrou em seus resultados que a SOD age como primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo na espécie, provocado pelo alagamento. Os autores afirmam ainda haver uma ação conjunta das enzimas SOD e CAT fornecendo uma proteção parcial ao vegetal até o sexto dia de estresse (CANDAN; TARHAN, 2012).

Também verificamos que a APX apresentou atividade no controle superior aos demais tratamentos logo às 24 horas, após imposição dos tratamentos, diminuindo sua atividade às 48 horas elevando-se novamente às 72 horas. Esta enzima possui uma grande afinidade pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sendo capaz de agir sobre esta molécula mesmo em baixas

concentrações, consistindo em um meio eficiente de eliminação destas substâncias sob condições de estresse (SHARMA et al., 2012).

3.2 Influência da quitosana no metabolismo de antioxidantes

No experimento II, a atividade das enzimas SOD e APX sofreu influência da aplicação exógena de quitosana. No tempo zero as plantas não apresentaram diferença significativa entre elas em relação à atividade da SOD e APX, mostrando que as mesmas estavam sob condições ambientais semelhantes antes da aplicação dos tratamentos. Após 12 horas de aplicação, plantas tratadas com solução aquosa de ácido acético 0,25% (T1) apresentaram maior atividade da SOD em relação aos outros tratamentos. As duas doses de quitosana 0,06% e 0,125%, condicionaram atividade significativa em relação ao controle. Vinte e quatro horas após a aplicação dos tratamentos observou-se elevada atividade da SOD nas plantas controle, diferindo consideravelmente da atividade expressa em plantas elicitadas. Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos às 48 horas após aplicação.

Ao longo do tempo, verificou-se que as plantas controle apresentaram variações na atividade da SOD, atingindo máximo de atividade em 24 horas de tratamento. O Solvente (Solução aquosa de Ac. Acético 0,25 %) não apresentou variação na atividade dessa enzima, mantendo-se constante, durante o período de elicitação, no entanto, o tratamento 2 (quitosana 0,06%), apresentou atividade elevada em 24 horas e redução aos 7 dias. O tratamento 3 (quitosana 0,125%) conferiu maior atividade da enzima, na planta, aos 7 dias após a aplicação. (Figura 2-A)

Em relação à atividade da enzima APX em cada tempo de coleta, observou-se que às 12 horas e 24 horas após aplicação de quitosana não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém, aos sete dias as plantas

controle e aquelas tratadas com solução aquosa de ácido acético 0,25%, apresentaram maior atividade da APX em relação aos demais tratamentos. No decorrer do tempo, após a pulverização, plantas controle não apresentaram variação na atividade desta enzima bem como o tratamento com solvente. O tratamento 2 (quitosana 0,06%) apresentou atividade estável até as 24 horas, havendo entretanto, redução da atividade aos sete dias. A concentração de 0,125% de quitosana conferiu aumento da atividade da APX pelo vegetal, decorridas 24 horas, após sua aplicação, diminuindo sua atividade aos sete dias. (Figura 2-B).

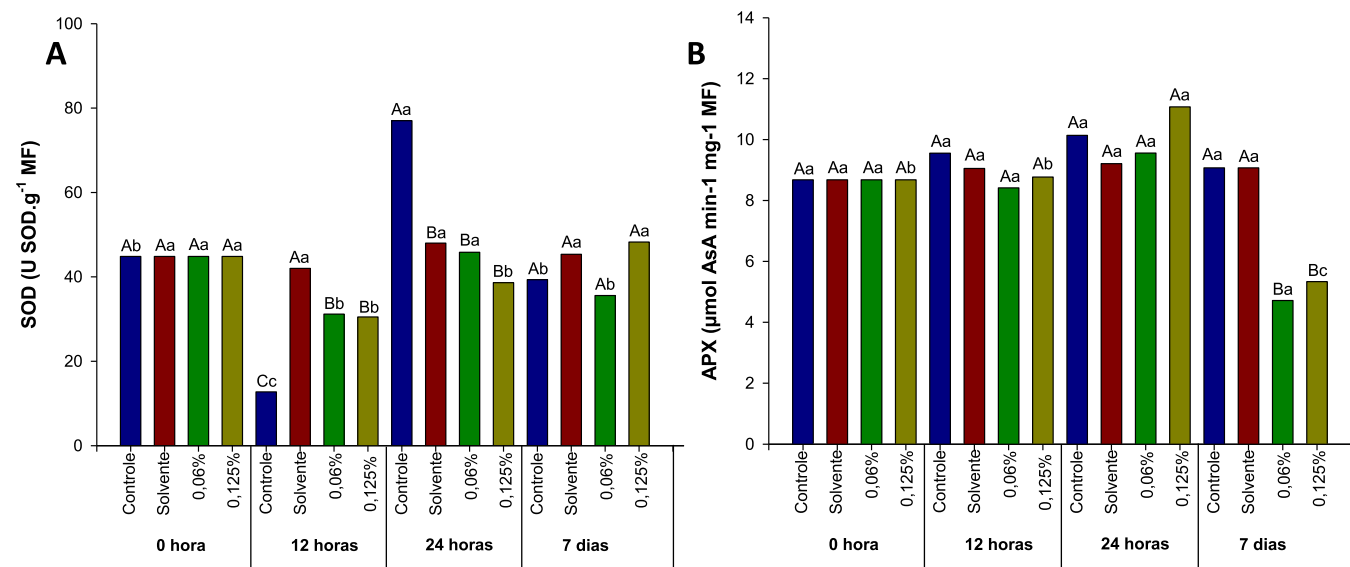


Figura 2 Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e APX (B) de folhas de plantas de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as minúsculas comparam dentro dos tratamentos nos diferentes períodos de coleta, com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Não foi observada a atividade da catalase (CAT) nas plantas de *Mentha arvensis* independente do tratamento, bem como da época de coleta. Os protocolos usuais foram adaptados e testados conforme (MANIKANDAN; SAHI; VENKATACHALAM, 2015) e mesmo assim, as leituras realizadas não apresentaram dados pertinentes que confirmassem a presença de atividade enzimática. É importante evidenciar que a CAT está presente apenas em peroxissomos e algumas isoformas na mitocôndria, e que essa enzima compete pelo mesmo substrato (H_2O_2) que a APX, porém possui menor afinidade pelo H_2O_2 que a APX, isso faz com que a CAT seja expressa apenas em altas concentrações do seu substrato (FRAIRE-VELÁZQUEZ; BALDERAS-HERNÁNDEZ, 2013). Assim, possivelmente o H_2O_2 formado pelo estresse oxidativo não foi suficiente para ativar a atividade dessa enzima em plantas de *M. arvensis* e que provavelmente a APX é a principal enzima envolvida na eliminação de H_2O_2 nessas plantas.

Conforme discutido no primeiro experimento, a quitosana age sobre a planta simulando um ataque de inseto e induz a formação de EROs como o H_2O_2 , que atuam como mensageiro estimulando o sistema de defesa durante o ataque. Com isso, o sistema de defesa vegetal é influenciado em função do estresse a que está sendo submetido. Em virtude disso, ocorre o que se chama de explosão oxidativa, ou seja, a planta responde bioquimicamente ao estresse causado ou à interação que lhe foi imposta (PASCHOLATI; LEITE, 1994; SHARMA et al., 2012; STANGARLIN et al., 2011).

O aumento considerável e linear da atividade da APX, ocasionado pelos tratamentos na presente pesquisa, corroboram com outros trabalhos que também evidenciaram a influência da quitosana sobre o aumento de sua atividade (LEI et al., 2011). Importante lembrar que os tratamentos 2 e 3 apresentaram redução na atividade da APX, aos sete dias pós-aplicação, levando-nos a sugerir que as

plantas tratadas com estas concentrações aos 7 dias a produção de radicais livres foi menor neste tempo.

O decréscimo da atividade da SOD em 12 horas em todos os tratamentos indica que os níveis de seu substrato haviam sido controlados, sendo o mesmo observado para APX. Após vinte e quatro horas e sete dias, apesar de não significativo, houve incrementos novamente na atividade da SOD. Entretanto, a atividade da APX sofreu incrementos apenas em 24 horas, com decréscimo em sete dias, isso provavelmente porque após sete dias os níveis de H_2O_2 já haviam sido controlados. Desse modo, pode-se afirmar que o sistema antioxidante enzimático se mostrou eficiente no controle das EROs em *M. arvensis*.

Além disso, outras pesquisas procuram explicar o estresse observado em plantas que não foram acondicionadas ao agente estressante, mas que estavam no mesmo ambiente que aquelas atingidas. Estes trabalhos justificam a ocorrência deste fato evidenciando que nas interações analisadas até o momento é possível confirmar a existência de comunicação entre plantas da mesma espécie (interação planta-planta) conforme discurrido nos resultados do experimento inicial.

Assim como no outro experimento, as plantas controle deste também foram influenciadas pelos tratamentos com quitosana, sugerindo que pode ter ocorrido a produção de voláteis induzidos pelas plantas submetidas à aplicação de quitosana, estes compostos voláteis são responsáveis por “alertar” plantas não atacadas que, por sua vez, preparam-se bioquimicamente antes da ocorrência do ataque (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013).

Uma informação que sustenta isto é a produção de terpenos por *Mentha arvensis* e confirmados no presente pelo estudo químico de seu óleo essencial (Capítulo 3). Estes compostos constituem uma variedade de substâncias de origem vegetal e apresentam importância ecológica uma vez que são potenciais defensivos contra insetos. Alguns terpenos como α -pineno, β -pineno, limoneno e

Mirceno, apresentam ação inseticida já comprovada e estão presentes na constituição química do óleo essencial de *M. arvensis* (HARBORNE, 1993).

O fenômeno do “estado de alerta” para futuros ataques pode ser desencadeado pela aplicação exógena de compostos químicos (TURLINGS; TON, 2006). Com isso sugere-se que a aplicação de quitosana como eliciador pode promover a produção de compostos sinalizadores em *M. arvensis*, levando ao aumento da produção de EROs e consequente aumento da atividade da APX.

3.3 Peroxidação lipídica

Doze horas após a imposição, os tratamentos quitosana 0,125% e controle apresentaram maior peroxidação lipídica. Decorridas 24 horas de aplicação, as plantas controle continuaram apresentando maior peroxidação bem como aquelas tratadas com quitosana 0,06% e 0,125%. Plantas tratadas com a solução de ácido acético 0,25% mantiveram seus índices de peroxidação inalterados às 12 horas e 24 horas, apresentando um pequeno aumento aos 7 dias aproximando - se dos valores de peroxidação das plantas controle e do tratamento 2 (quitosana 0,06). Aos sete dias a peroxidação foi maior em plantas pulverizadas com quitosana 0,125% (Gráfico 1).

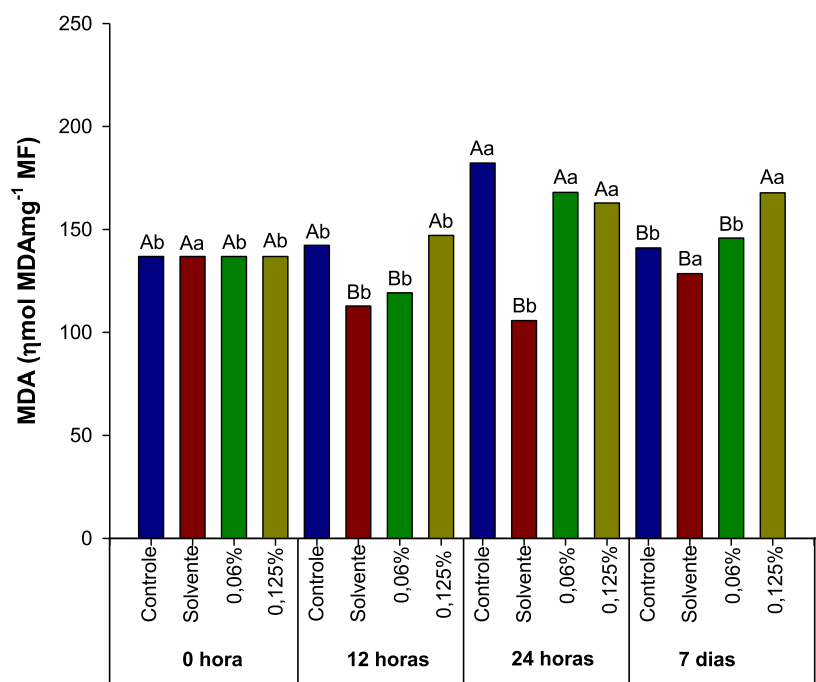


Gráfico 1 Quantificação de Malondialdeído (MDA peroxidação lipídica) nas folhas de plantas de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as minúsculas comparam dentro dos tratamentos nos diferentes períodos de coleta, com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

As espécies reativas de oxigênio EROs são moléculas tóxicas oriundas de funções metabólicas normais nos peroxissomos ou induzidas por estímulos ambientais aos quais as plantas estão constantemente sendo submetidas (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; PASCHOLATI; LEITE, 1994; STANGARLIN et al., 2011). Como as membranas são os principais alvos das EROS, o nível elevado destes radicais pode ocasionar a peroxidação de lipídeos, extravasamento do material celular e morte celular (BREUSEGEM et al., 2001;

KARABAL; YÜCEL; ÖKTEM, 2003). A peroxidação lipídica é quantificada pelo Malonaldeído (MDA), um marcador empregado como indicador de danos à membrana celular vegetal.

Em espécies como tomate (*Solanaceae*), substâncias como a sistemina, ácido oligogalacturônico (OGA), quitosana e metil jasmonato, promovem o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas. Isso mostra que a aplicação de substâncias exógenas provocam estresses no vegetal levando-o a produzir elevados níveis de EROs. A observação destes comportamentos tem levado ao desenvolvimento de propostas de modelo para melhor elucidação destes fenômenos (SOARES; MACHADO, 2007).

O ácido jasmônico (JA), por exemplo, produzido por meio da rota octadecanoide, pode ser responsável pela ativação de genes sinalizadores nos feixes vasculares, que são expressos 0,5 h após a injúria (OROZCO-CARDENAS; RYAN, 1999), enquanto que o H_2O_2 produzido baseado nos derivados de oligogalacturonídeos (OGA) é um segundo comando que ativa genes defensivos expressos 4h após a injúria.

Com base nisso, os dados apresentados mostram que a quitosana na maior concentração 0,125%, fez com que as plantas apresentassem maior conteúdo de MDA configurando maior peroxidação lipídica. Assim como na atividade das enzimas antioxidantes, podemos observar que houve interações entre as plantas tratadas e não tratadas (controle) refletindo nos resultados.

3.3.1 Ação da quitosana sobre o metabolismo de carboidratos

Após realização das análises, os dados apresentaram variações nos teores de amido e Açúcares como consequência da aplicação dos tratamentos.

3.3.1.1 Amido

A produção de amido nas plantas também foi avaliada na parte aérea e parte subterrânea e os dados mostram que a quantidade do mesmo variou entre os tratamentos dentro de cada tempo e ao longo do período experimental.

Produção na parte aérea (PA): Às vinte e quatro horas a produção foi maior nas plantas tratadas com 0,125% de quitosana, aos sete dias a produção foi maior em plantas pulverizadas com quitosana 0,06% em relação aos outros tratamentos. Ao longo de todo período experimental, observaram-se alterações significativas na produção de amido em cada tratamento. O controle apresentou aumento de amido aos sete dias, o solvente apresentou aumento às vinte e quatro horas, depois da aplicação, voltando a diminuir aos sete dias. O tratamento com quitosana 0,06% apresentou produção crescente de amido, atingindo sua maior produção aos sete dias, diferindo significativamente dos demais tratamentos neste período e as plantas tratadas com quitosana 0,125% atingiram uma maior produção às vinte e quatro horas decrescendo aos sete dias de coleta (Figura 3A).

Produção de amido na parte subterrânea (PS): No tempo de vinte e quatro horas, o solvente proporcionou aumento significativo do amido na parte subterrânea, em relação aos demais tratamentos, seguido do tratamento com quitosana 0,06%. Quitosana 0,125% bem como o controle apresentaram os menores valores neste período de coleta. Aos sete dias os tratamentos com a solução de ácido acético glacial 0,25% bem como as duas concentrações de quitosana apresentaram os maiores valores de amido, diferindo significativamente das plantas controle. Ao longo do tempo o controle não apresentou variação significativa, o solvente não variou ao longo da coleta, somente quando comparados com o tempo 0 o que também ocorreu com plantas tratadas com quitosana 0,06%. A maior concentração de quitosana (0,125%)

proporcionou aumento significativo no valor de amido na parte subterrânea nas plantas de *M. arvensis* aos sete dias quando comparado com o período de 24 horas(Figura 3B).

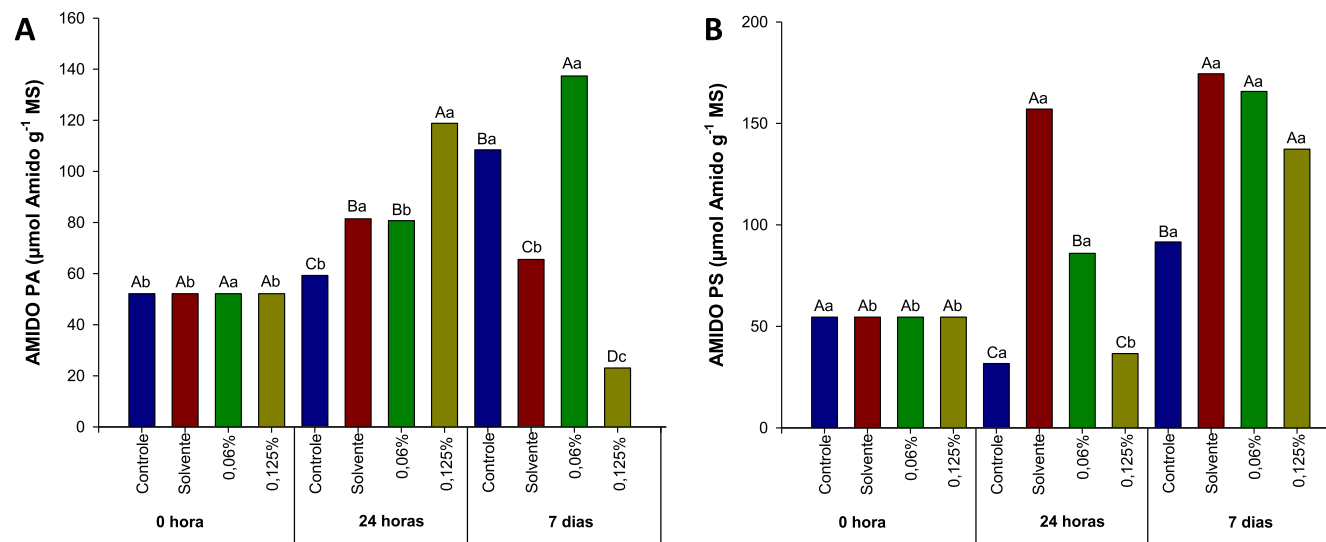


Figura 3 Quantificação de amido na parte aérea (PA) [A] e parte subterrânea (PS) [B] de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as minúsculas comparam dentro dos tratamentos nos diferentes períodos de coleta, com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O amido é considerado o principal carboidrato de armazenamento dos vegetais, podendo ser acumulado em folhas ou raízes, sendo sua quantidade nos tecidos condicionada por fatores ambientais e genéticos. Diante disso, pode-se considerar que o estresse ocasionado por substâncias eliciadoras podem interferir diretamente na síntese e armazenamento de amido no vegetal (SALISBURY; ROSS, 2012). Dessa forma, os resultados sugerem que o estímulo provocado pela aplicação da quitosana em planta de *Mentha arvensis* promoveu um ganho considerável às 24 horas na dose de 0,125% para a parte aérea.

A parte subterrânea de *Mentha arvensis* é composta por raízes e estolões. Os estolões apresentam grande importância para a cultura, influenciando na produção de biomassa seca da parte aérea, após a rebrota (CHAVES, 2001). Diante disso, pode-se considerar que a elicitação com quitosana contribui para o armazenamento de amido na parte subterrânea aos sete dias após aplicação.

3.3.1.2 Açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR)

Na parte aérea (PA) a quantidade de açúcar solúvel total variou entre os tratamentos no período de 24 horas após elicitação das plantas, mostrando que plantas tratadas com o solvente e com quitosana 0,125% apresentaram maiores teores de (AST) em relação aos outros tratamentos. Ao longo da exposição aos tratamentos, verificou-se que: plantas do grupo controle apresentaram aumento de AST ao longo do período de experimento mostrando maior quantidade aos sete dias. O solvente manteve os valores de AST pelas plantas, durante os períodos coletados, quitosana 0,06% promoveu aumento considerável de AST nas plantas, ao longo do período experimental, apresentando maior quantidade

aos sete dias, já plantas tratadas com quitosana 0,125% mantiveram seus níveis de AST após a imposição dos tratamentos até os sete dias. (Figura 4 A)

A parte subterrânea (PS) das plantas apresentou maior quantidade de AST às 24 horas após aplicação do solvente, diferindo dos demais tratamentos neste tempo. Aos sete dias, no entanto, os tratamentos com quitosana (0,06% e 0,125%) promoveram aumento significativo de AST nas plantas quando comparados com os outros no mesmo tempo. Ao longo do período experimental, todos os tratamentos promoveram aumento do AST nas plantas aos sete dias. Porém, observou-se que o solvente manteve as quantidades de AST constantes ao longo do período (Figura 4 B).

Na quantificação de açúcares redutores (AR) não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos nos tempos de coleta.

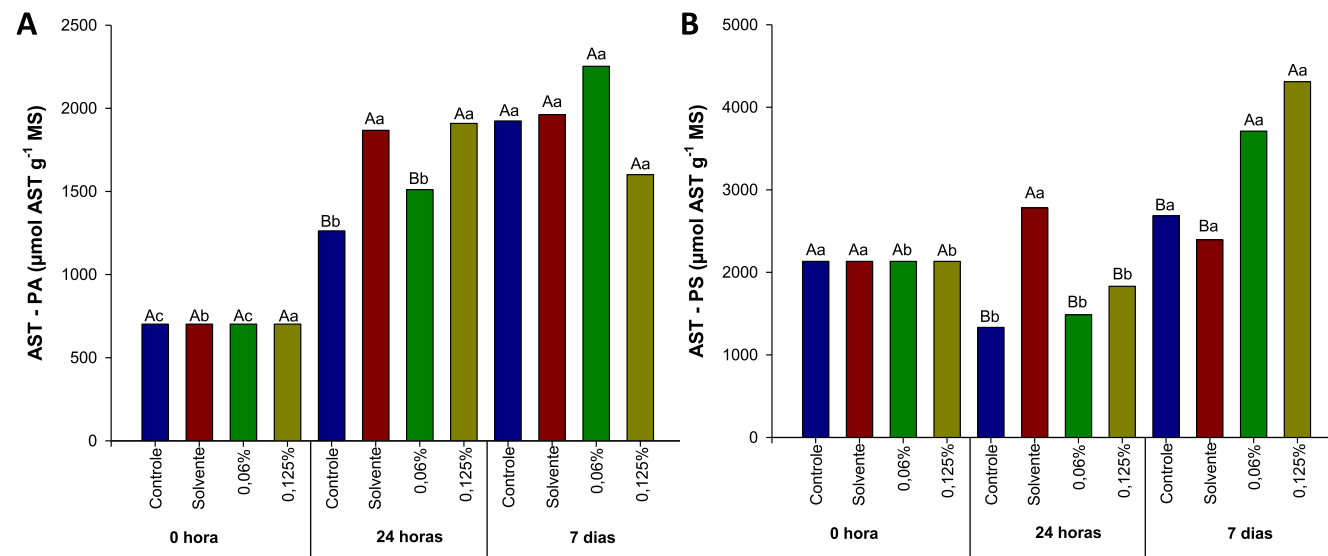


Figura 4 Açúcares solúveis totais (AST) na parte aérea [A] e parte subterrânea (PS) [B] em plantas de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II

Nota: As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as minúsculas comparam dentro dos tratamentos nos diferentes períodos de coleta, com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Como observado nos resultados do metabolismo de antioxidantes, as plantas submetidas a estresses abióticos podem ser vítimas da explosão oxidativa, levando muitas vezes a perdas celulares irreparáveis. Consiste em um desafio ambiental para os vegetais, o equilíbrio entre a produção e degradação das espécies reativas de oxigênio ou EROs (MILLER et al., 2010).

Os carboidratos são produzidos pela fotossíntese e são responsáveis por fornecer energia e biomassa para as plantas. Além disso, estão envolvidos com o controle transcricional e pós - traducionais agindo como moléculas sinalizadoras (MULLER et al., 2011).

Além de desempenharem diversas funções no metabolismo celular, os açúcar estiveram suas funções antioxidantes elucidados nos últimos anos (ENDE; EL-ESAWI, 2014; KEUNEN et al., 2013). Açúcares solúveis totais (AST) como a sacarose, rafinose e estaquiose são os principais carboidratos com função antioxidante nos vegetais (KEUNEN et al., 2013).

Observou-se aumento no teor de AST de *Mentha arvensis* ao longo do tempo após a elicitación com quitosana. Além disso, as plantas apresentaram alta atividade enzimática da SOD e APX ao longo do período pós-estímulo. Isso permite propor que, em virtude do estresse oxidativo decorrente da aplicação dos tratamentos, a defesa bioquímica contra EROs foi estimulada a fim de se neutralizar a explosão oxidativa desencadeada pelas aplicações.

4 CONCLUSÃO

O metabolismo antioxidante de *M. arvensis* foi ativado pela eliciação com quitosana sugerindo que o biopolímero promove produção de EROs ao ser aplicado juntamente com a solução de ácido acético glacial.

A concentração da solução aquosa de ácido acético glacial a 1% exerce muita influencia sobre o estresse causado sobre o vegetal acarretando em lesões físicas. Em pequenas concentrações, no entanto, promove estímulos sobre as plantas juntamente com a quitosana.

Os valores de açúcares solúveis totais variaram em decorrência da eliciação, fato que pode estar associado à utilização destes carboidratos para neutralizar as EROs decorrentes do estímulo provocado.

Os teores de amido variaram entre a parte aérea e subterrânea, fato que corrobora o aumento observado em outras espécies submetidas a outras formas de estresses abióticos.

Os dados apontam possível interação entre as plantas tratadas e não tratadas com as doses de quitosana, durante o período experimental, fato este associado à produção de voláteis induzidos que estão presentes no óleo essencial de *Mentha arvensis* e foram identificados no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. M. **Efeito da quitosana sobre a antracnose e características físicas e químicas de frutos de cultivares de bananeiras**. 2011. 84 p. Mestrado (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2011.
- ASSIS, T. C. de; ANDRADE, D. E. G. T. de. Fitonematoses em Zingiberales ornamentais no Estado de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 4, p. 185-198, 2014.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BREUSEGEM, F. van et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Shannon, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CANDAN, N.; TARHAN, L. Tolerance or sensitivity responses of *Mentha pulegium* to osmotic and waterlogging stress in terms of antioxidant defense systems and membrane lipid peroxidation. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 75, p. 83-88, Jan. 2012.
- CAPDEVILLE, G. de et al. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 8, p. 900-908, 2002.
- CAVALCANTE, L. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Viçosa, MG: FEALQ, 2005. 60 p.

CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte.** 2001. 144 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

COSTA, F. P. et al. Ação da catalase na tolerância de plantas de *Eichhornia crassipes* a Cr^{3+} . In: CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA: O CAMINHO PARA A INOVAÇÃO, 6., 2014, Campos dos Goitacases. **Anais...** Campos dos Goitacases: UENF, 2014. 1 CD-ROM.

COUTINHO, H. et al. Avaliação da atividade anti-Trypanosoma e anti-Leishmania de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 11, n. 2, p. 147-153, 2012.

COUTINHO, H. D. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, Basel, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 8, n. 10, p. 813-824, 2007.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 477-512.

ENDE, W. van den; EL-ESAWI, S. K. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: a dual function in abiotic and biotic stress responses? **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 108, p. 4-13, Dec. 2014.

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

FELIPINI, R. B.; DI PIERO, R. M. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1591-1597, dez. 2009.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises estatísticas 4.3**. Lavras: UFLA, 1999. Software.

FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; BALDERAS-HERNÁNDEZ, V. E. **Abiotic stress in plants and metabolic responses**. Croacia: INTECH, 2013. 320 p.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I, occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

HARBORNE, J. Advances in chemical ecology. **Natural Product Reports**, London, v. 10, n. 4, p. 327-348, 1993.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 9776**: ISO/TC 54 essential oils business plan. Geneva, 2004. 12 p.

KARABAL, E.; YÜCEL, M.; ÖKTEM, H. A. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 6, p. 925-933, 2003.

KARBAN, R.; BALDWIN, I. T. **Induced responses to herbivory**. Chicago: University of Chicago, 2007. 115 p.

KEUNEN, E. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 1242-1255, 2013.

LEI, C. et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, London, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2011.

LORENZI, H.; MATTOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 492 p.

MANIKANDAN, R.; SAHI, S.; VENKATACHALAM, P. Impact assessment of mercury accumulation and biochemical and molecular response of *Mentha arvensis*: a potential hyperaccumulator plant. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 2015, p. 1-10, 2015.

MARTINS, A. P. et al. Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. **Revista Fitoterapia.net**, Barcelona, v. 11, n. 2, p. 131-146, 2011.

MILLER, G. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MULLER, B. et al. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 6, p. 1715-1729, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, n. 11, p. 6553-6557, 1999.

PASCHOLATI, S.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-51, 1994.

PATIL, K.; MALL, A. Hepatoprotective activity of *Mentha arvensis* Linn. leaves against CCL4 induced liver damage in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Canberra, v. 2, n. 1, p. S223-S226, 2012. Supplement.
Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S222218081260156X>>.
Acesso em: 10 nov. 2014.

PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.

RAM, D.; RAM, M.; SINGH, R. Optimization of water and nitrogen application to menthol mint (*Mentha arvensis* L.) through sugarcane trash mulch in a sandy loam soil of semi-arid subtropical climate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 7, p. 886-893, May 2006.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia das plantas**. São Paulo: Cengage Learning, 2012. 774 p.

SCHOONHOVEN, L. M.; LOON, J. J. van; DICKE, M. **Insect-plant biology**. Oxford: Oxford University, 2005. 280 p.

SCOTT, A.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SOARES, A. M. dos S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 10-18, 2007.

SOUZA, C. V.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2012. 768 p.

STANGARLIN, J. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 10, n. 1, p. 18-46, dez. 2011.

TURLINGS, T. C.; TON, J. Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odours to enhance the control of agricultural pests. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 421-427, 2006.

CAPÍTULO 3 Influência de quitosana sobre o crescimento, teor, rendimento e perfil do óleo essencial de *Mentha arvensis* L.

RESUMO

Os elicitores constituem moléculas que possuem capacidade de induzir respostas nos vegetais, seja na produção de fitoalexinas ou de substâncias do metabolismo secundário. *Mentha arvensis* L. é uma planta medicinal da família Lamiaceae de grande importância para a produção mundial de óleo essencial. Seu óleo é rico em mentol, composto muito utilizado pela indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica. Não há relatos do emprego de quitosana como substância elicitora em plantas de *Mentha arvensis* L. Objetivou-se no presente trabalho avaliar o desenvolvimento e possíveis alterações no metabolismo secundário como a produção e qualidade de óleo essencial na espécie *Mentha arvensis* L., utilizando quitosana como elicitador em diferentes concentrações. Foram realizados dois experimentos em épocas distintas sob condições de viveiro com sombreamento de 50%. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com três repetições e cinco tratamentos (Controle, solução de ácido acético glacial 1% e quitosana nas concentrações 0,25%; 0,5% e 0,75%) no experimento I, e quatro tratamentos no experimento II (controle, solução de ácido acético glacial 0,25% e quitosana 0,06% e 0,125%). A coleta para determinação de massa seca ocorreu aos 7 dias no primeiro experimento e tempo zero, às 12 horas, 24 horas e 7 dias no segundo experimento após aplicação dos tratamentos. Para determinar teor, rendimento e constituição química de óleo essencial, as plantas foram coletadas aos sete dias em ambos experimentos. A concentração elevada do solvente associada com altas concentrações de quitosana promoveu danos físicos às plantas refletindo em menor rendimento de óleo essencial no primeiro experimento. A concentração ajustada do solvente e doses menores de quitosana alteraram o teor e rendimento do óleo essencial em *M. arvensis* no segundo experimento. O perfil químico do óleo essencial apresentou variações nos teores de terpenoides nos dois experimentos.

Palavras-chave: Óleo essencial. Elicidores. Terpenoides. Metabolismo secundário.

ABSTRACT

Elicitors are molecules that have the capacity to induce responses in plants, wither in the production of phytoalexins or of secondary metabolism substances. *Mentha arvensis* L. is a medicinal plant of the Lamiaceae family and is of great importance to worldwide production of essential oil. Its oil is rich in menthol, compound widely used in the cosmetic, food and pharmaceutical industries. There are no reports of the use of chitosan as elicitor for *Mentha arvensis* L. plants. In the present work, the objective was to evaluate the development and possible changes in secondary metabolism such as the production and quality of *Mentha arvensis* L. essential oil, using chitosan as elicitor at different concentrations. Two experiments were conducted at different times under nursery conditions with 50% shading. The experimental design was completely randomized (CRD) with three replicates and five treatments in experiment I (control, 1% glacial acetic acid solution and chitosan in the concentrations of 0.25%, 0.5% and 0.75%) and four treatments in experiment II (control, 0.25% glacial acetic acid solution and 0.06% and 0.125% chitosan). The collection to determine the dry mass occurred at 7 days in the first experiment and at times zero and at 12 and 24 hours and 7 days after treatment application in the second experiment. To determine content, yield and chemical constitution of the essential oil, the plants were collected at seven days in both experiments. The high concentration of the solvent associated with high concentrations of chitosan caused physical damage to plants leading to lower essential oil yield in the first experiment. The adjusted concentration of the solvent and lower doses of chitosan altered the content and yield of *M. arvensis* essential oil in the second experiment. The chemical profile of the essential oil showed variations in terpenoid levels in both experiments.

Keywords: Essential oil. Elicitors. Terpenoids. Secondary metabolism.

5 INTRODUÇÃO

Mentha arvensis L. é uma espécie medicinal integrante do gênero *Mentha ssp.*, família Lamiaceae a qual é popularmente designada como Hortelã japonesa, vique, menta inglesa dentre outros. Seu emprego na medicina caseira se dá pelo fato de possuir propriedades digestiva, descongestionante nasal e antigripal (LORENZI; MATTOS, 2008).

Os estudos envolvendo a utilização de extratos provenientes das folhas têm evidenciado seu potencial antiparasitário, antimicrobiano e hepatoprotetor (COUTINHO et al., 2012; JOHNSON et al., 2011; PATIL; MALL, 2012).

Seu cultivo para obtenção de óleo essencial demandado pela indústria ocorre principalmente em áreas subtropicais em países como China, Índia, França e Estados Unidos com destaque para a produção Indiana.

Apresenta importância econômica pelo valor comercial atribuído ao seu óleo essencial rico em mentol, o qual pode ser comercializado em sua forma cristalizada para confecção de produtos farmacêuticos, cosmeceuticos e alimentícios. Além desse composto, seu óleo desmentolado e outros monoterpenos fracionados a partir do mesmo, são produtos almejados pela indústria (RAM; RAM; SINGH, 2006; SRIVASTAVA et al., 2002).

A extração de óleo essencial deve seguir as recomendações de monografias, farmacopeias e de normas ISO para garantir sua qualidade. Para se extrair o óleo essencial de *Mentha arvensis* L., por exemplo, recomenda-se utilizar a parte aérea florida fresca (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION- ISO, 2004; MARTINS et al., 2011). O óleo pode ser extraído por meio do arrastamento a vapor de água (MEDICINES; COMMISSION, 2009) e a destilação por vapor de água (ISO, 2004).

Tem se tornado comum nos estudos agronômicos, envolvendo a utilização de substâncias com potencial, para interferir em respostas nos vegetais

como a produção de fitoalexinas e metabólitos secundários. Estas substâncias são chamadas de eliciadoras ou elicitoras, pois, desencadeiam respostas no vegetal muitas vezes simulando o ataque de patógenos, agindo diretamente na resistência sistêmica adquirida (RSA) (CAMPOS et al., 2009; MAZARO, 2007).

O efeito de eliciadores depende diretamente de fatores como a concentração utilizada, o tempo de estímulo ou elicitação, estágio de desenvolvimento da espécie em estudo, bem como suas características anatômico/fisiológicas. As moléculas eliciadoras podem ser bióticas ou abióticas dependendo de sua origem (ANTONIAZZI; DESCHAMPS, 2006; DÖRNENBURG; KNORR, 1996).

A quitosana é classificada como elicitor abiótico responsável por produzir substâncias de defesa em plantas (ASSIS; ANDRADE, 2014). É produzida a partir da desacetilação da quitina presente na carapaça de crustáceos, resultando em um pó de coloração clara insolúvel em água, mas que se dissolve em soluções ácidas (AGUIAR, 2011; AZEVEDO et al., 2007). Sua demanda pela indústria tem crescido nos últimos tempos tornando-a um biopolímero de importância industrial.

De posse destas informações, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a ação eliciadora de quitosana sobre o crescimento de plantas de *Mentha arvensis* L, bem como sua ação sobre a produção e qualidade do óleo essencial.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Obtenção das mudas

Mudas de *M. arvensis* foram preparadas a partir de estacas apicais de matrizes obtidas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA. Utilizaram-se bandejas de poliestireno expandido de 128 células contendo substrato comercial Plantimax® e cada estaca mantida com dois pares de folhas. As mudas foram mantidas em casa de vegetação com nebulização controlada até atingirem em média sete centímetros de comprimento e quatro pares de folhas expandidas.

Após esta fase, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de três litros contendo substrato constituído por uma mistura de terra, areia e esterco de codorna na proporção 2:1:1 acrescida de adubo comercial NPK 10:10:10 e mantidas sob sombreamento de 50% por 76 dias até a imposição dos tratamentos com o eliciador, momento este em que as plantas atingiam pleno florescimento.

6.2 Condução do Experimento I

A quitosana utilizada possui 85% de desacetilação e apresenta fórmula molecular $(C_8H_{13}NO_5)_n$. Para sua dissolução utilizou-se uma solução aquosa de ácido acético glacial 1% e seu pH foi ajustado entre 6 e 6,5 com hidróxido de sódio (NaOH) 10M (AGUIAR, 2011).

O experimento I consistiu na imposição dos seguintes tratamentos: O primeiro foi o controle onde as plantas não foram pulverizadas com quitosana. O segundo tratamento constou da aplicação de solução aquosa de ácido acético glacial 1% com pH entre 6 e 6,5, já o terceiro tratamento foi constituído da aplicação de quitosana 0,25%. No quarto tratamento foi realizada a pulverização

de quitosana 0,5% e no quinto tratamento as plantas foram pulverizadas com quitosana 0,75%.

Após a aplicação das substâncias, as plantas foram mantidas em viveiro e protegidas com uma estrutura de metal com cobertura plástica, evitando, assim, a ação de chuvas sobre os tratamentos.

As características analisadas e as épocas de avaliações para diagnosticar a resposta de *M. arvensis* frente à aplicação de quitosana foram: Índice de crescimento fisiológico e o teor, rendimento e caracterização química do óleo essencial às quais foram realizadas aos sete dias após aplicação de quitosana.

6.2.1 Obtenção das variáveis

Foram analisadas três plantas por tratamento. Para avaliar o índice de crescimento fisiológico, as plantas foram seccionadas separando-se a parte aérea do sistema radicular. As raízes foram lavadas para remover o substrato e, em seguida, as diferentes partes das plantas foram acondicionada em sacos de papel Kraft e secas em estufa de circulação forçada de ar a $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, até atingirem massa constante. Determinou-se, com uma balança de precisão, a massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca da parte subterrânea (MSPS).

Para extração do óleo essencial, a parte aérea foi separada da parte subterrânea. Utilizou-se apenas a parte aérea fresca composta de caule, folhas e inflorescências conforme recomendação da farmacopeia europeia e da ISO. O material foi fragmentado em partes menores e submetido à hidrodestilação.

6.2.1.1 Índice de Crescimento fisiológico

De posse dos dados de massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca da parte subterrânea (MSPS), calculou-se então a massa seca total (MST) e a razão entre a massa seca da parte aérea e a massa seca da parte subterrânea (RPAS) conforme a Equação 1 - Cálculo da RPAS:

$$RPAS = \frac{MSPA}{MSPS} \quad (1)$$

6.2.1.2 Extração de óleo essencial

Para determinar a massa e os teores percentuais de óleos essenciais nas plantas, foi utilizada toda a parte aérea contendo caule, folhas e inflorescências nos diferentes tratamentos decorridos sete dias de experimento. Após ser fragmentado, o material foi submetido à hidrodestilação durante 1 hora e 30 minutos, utilizando 1 litro de água destilada em balão de destilação de 2 litros (OLIVEIRA et al., 2012).

Os vapores produzidos foram conduzidos por meio do aparelho de *Clevenger* modificado, onde ocorre a condensação dos vapores, sendo o hidrolato (mistura água/óleo essencial), recolhido em um coletor do aparelho ao final do processo. Posteriormente foi realizada a partição líquido-líquido em funil de separação, realizando-se três lavagens com três porções de 20 mL de Cloreto de Metileno (Diclorometano). As frações orgânicas foram reunidas e, para retirar o excesso de umidade, foi adicionado sulfato de magnésio anidro.

Após o repouso de algumas horas, foi realizada uma filtração simples para retirar o sal e em seguida armazenou-se à temperatura ambiente sob capela de exaustão em frascos escuros de 5 mL parcialmente tampados, para

possibilitar a evaporação do restante do solvente (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2005).

Os teores percentuais de óleo essencial foram obtidos pela razão apresentada na Equação 2 - Obtenção do teor de óleo essencial. Já os rendimentos do óleo essencial, expressos em $g\ planta^{-1}$, foram obtidos pela razão expressa na Equação 3 - Obtenção do rendimento de óleo essencial (CHAGAS; PINTO; BERTOLUCCI, 2011).

$$\text{Teor de óleo (\%)} = \frac{\text{massa do óleo (g)} \times \text{biomassa fresca}}{\text{massa utilizada para extração (g)}} \quad (2)$$

$$\text{Rendimento (g planta}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Teor de óleo (\%)} \times \text{biomassa fresca}}{100} \quad (3)$$

6.2.1.3 Determinação da composição química do óleo essencial

A composição química do óleo foi determinada por uma amostra composta obtida pelo agrupamento de massas equivalentes do óleo essencial das repetições de cada tratamento. A análise química quantitativa foi realizada em um sistema de cromatografia gasosa acoplado a um detector de ionização em chama de hidrogênio Agilent® 7890A equipado com coluna capilar HP-5MS ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$) (Califórnia, EUA). Utilizou-se hélio como gás de arraste com fluxo de $1,0\text{ mL min}^{-1}$; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220°C e 240°C , respectivamente.

A temperatura inicial do forno foi de 60°C com uma rampa de temperatura de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 180°C , seguido por uma isoterma de 10 min e, posteriormente, de uma rampa de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 270°C . O óleo foi diluído em acetato de etila (1%, v/v) e $1,0\text{ }\mu\text{L}$ foi injetado automaticamente no modo split a uma razão de 1:50. As análises qualitativas do óleo foram realizadas por

cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se um equipamento Agilent® 5975C, operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan s⁻¹, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z.

As condições cromatográficas foram as mesmas empregadas nas análises quantitativas. Os componentes foram identificados por comparação de seus índices de retenção com dados de espectros de massas e índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; TELES et al., 2013) e por comparação dos espectros de massas com os da biblioteca NIST (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008).

6.2.2 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), consistindo três repetições e cinco tratamentos (controle, solvente, quitosana 0,25%, 0,5% e 0,75%). A parcela experimental foi composta por seis plantas, totalizando 90 plantas.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F ($p < 0,05$) e sendo significativas as médias entre os tratamentos, essas foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) ou Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados) (FERREIRA, 1999).

6.3 Condução do experimento II

O experimento II foi conduzido sob condições de viveiro no setor de Fisiologia Vegetal da UFLA e o preparo das mudas e do solo utilizados seguiu a mesma metodologia do experimento I.

6.3.1 Aplicação da quitosana

Para a dissolução da quitosana utilizou-se uma solução aquosa de ácido acético glacial 0,25% e seu pH foi ajustado entre 6 e 6,5 com hidróxido de sódio (NaOH) 10M (AGUIAR, 2011) modificado com base nos resultados do experimento I.

Quando as plantas estavam em pleno florescimento, (90 dias após o transplântio), estas foram submetidas à pulverização de quitosana. Esta época de aplicação (florescimento) se deve ao fato de a farmacopeia europeia recomendar a extração do óleo essencial das sumidades floridas da parte aérea de *Mentha arvensis* L. como processo imprescindível para garantir a qualidade do óleo bem como sua comercialização (ISO, 2004; MARTINS et al., 2011).

Em relação aos tratamentos aplicados, estes consistiram em: Tratamento controle: Aplicação de água destilada, tratamento um (T1): solução aquosa de ácido acético glacial 0,25%, tratamento dois (T2): Solução de quitosana 0,06% e tratamento três (T3): Solução de quitosana 0,125%, sendo pulverizado um volume de 60 mL em cada planta.

Após a aplicação das substâncias, as plantas foram mantidas sob as mesmas condições descritas no experimento I e as características analisadas bem como épocas de avaliação para diagnosticar a resposta de *M. arvensis* frente à aplicação de quitosana foram: Índice de crescimento fisiológico realizado nos períodos: tempo zero (T0), vinte e quatro horas (24h) e sete dias (7d), teor, rendimento e caracterização química do óleo essencial realizados aos sete dias após imposição dos tratamentos.

6.3.2 Obtenção das variáveis

As variáveis foram obtidas seguindo a mesma metodologia do experimento I (subitens: 6.2.1.1 Índice de Crescimento fisiológico, 6.2.1.2 Extração de óleo essencial e 6.2.1.3 Determinação da composição química do óleo essencial).

6.3.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados (DIC), sendo três repetições e quatro tratamentos (controle, solução de ácido acético glacial 0,25%, quitosana 0,06%, 0,125%). A parcela experimental foi composta por sete plantas, totalizando 84 plantas.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F ($p < 0,05$) e, sendo significativos, as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974), utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados) (FERREIRA, 1999).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Produção de Biomassa

No experimento I, plantas do grupo controle apresentaram maior biomassa seca da Parte aérea em relação às plantas submetidas com tratamento com solução aquosa de ácido acético glacial 1% e quitosana nas concentrações 0,25%; 0,5% e 0,75% (Figura 1 A) Em relação à parte subterrânea, as plantas tratadas com quitosana 0,25 e 0,75% apresentaram maior biomassa seca em detrimento dos demais. (Figura 1 B).

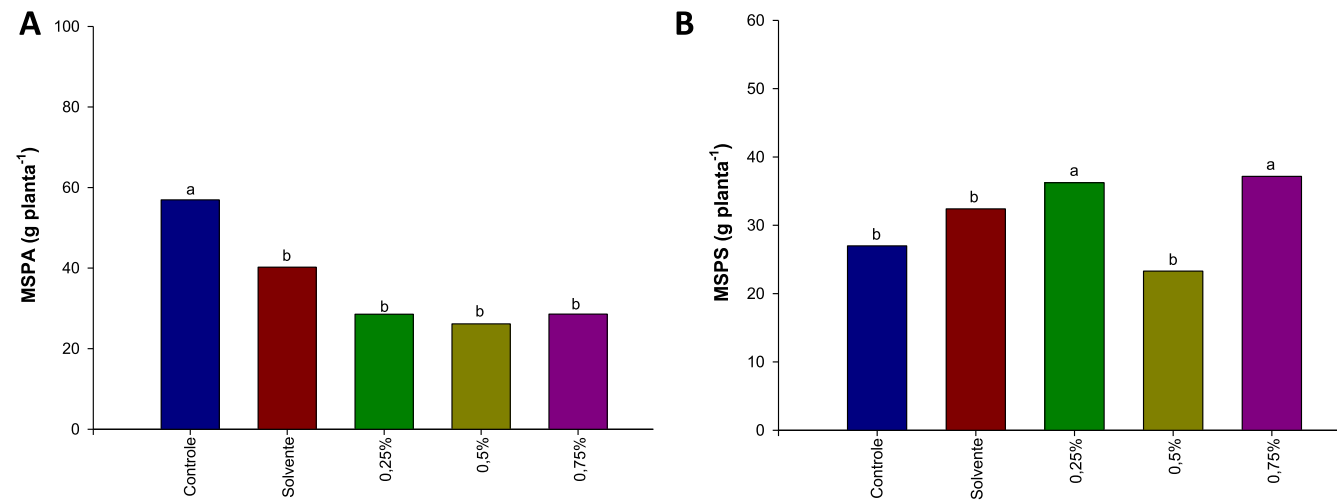


Figura 1 Valores de massa seca da parte aérea (PA) [A] e parte subterrânea (PS) [B] de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento I. Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

Verificou-se que as doses de quitosana utilizadas promoveram a redução da biomassa seca total das plantas (Figura 2 A). Além disso, a concentração do Solvente utilizado (solução de ácido acético 1 %) foi danosa para os vegetais reduzindo também a massa seca da parte aérea. Houve um aumento da parte subterrânea observada nas plantas tratadas com quitosana e solvente levando a uma diminuição da relação entre a massa seca da parte aérea e a massa parte subterrânea quando comparados com as plantas controle (Figura 2 B).

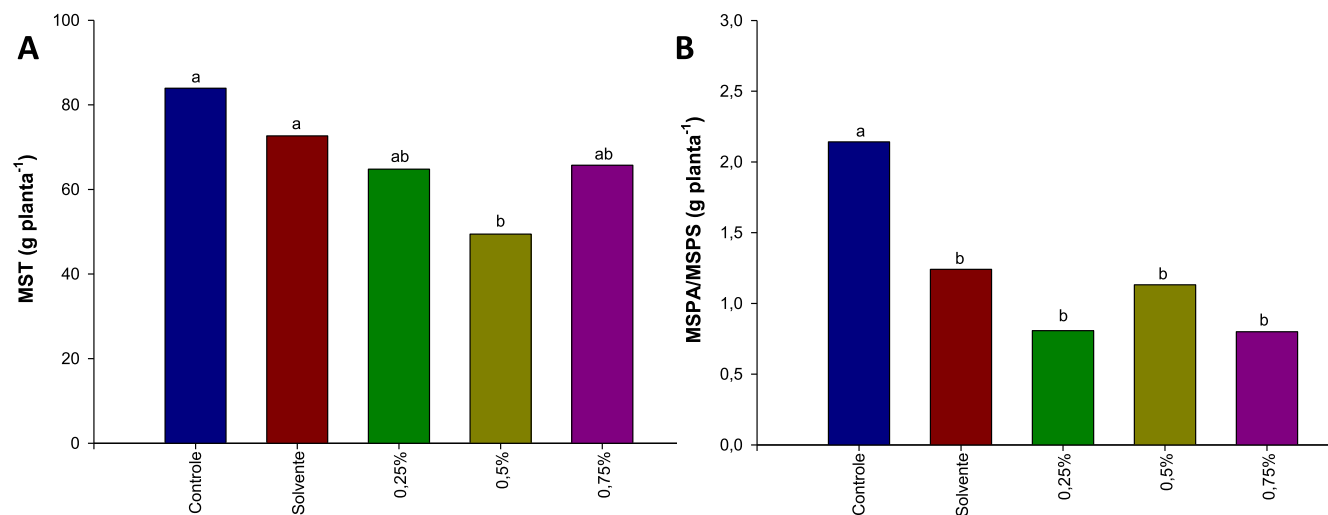


Figura 2 Valores de massa seca total [A] e relação parte aérea/subterrânea (RPS) de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento I. Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

As plantas submetidas à elicitação com quitosana e aquelas tratadas com solução de ácido acético glacial 1%, apresentaram danos físicos decorrentes da agressividade das concentrações testadas. Este fato contribuiu de modo substancial para a diminuição da biomassa vegetal fresca e produção de óleo essencial. Alterações no ambiente interferem diretamente na produção vegetal e consequente acúmulo de metabólitos secundários. O estudo destas mudanças e seu impacto sobre o metabolismo pode esclarecer o grau de influência exercida na regulação de biossíntese, contribuindo para o aumento de substâncias de interesse nas espécies aromáticas e medicinais (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003; MORAIS, 2009).

A produção de biomassa fresca interfere diretamente no rendimento de óleo essencial, sendo assim, o emprego de tratamentos culturais com complementação consiste em uma das alternativas para aumentar a produção de plantas medicinais (CHAVES, 2001; CORRÊA et al., 2010; KOSHIMA; MING; MARQUES, 2006; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2005). Em *Mentha arvensis*, a integridade das sumidades floridas da parte aérea é imprescindível para produção de óleo essencial (ISO, 2004). Além disso, é na folha desta espécie que ocorre a síntese de mentol, constituinte majoritário de interesse encontrado em seu óleo essencial (CROTEAU et al., 2005; SHARMA et al., 2003).

Ainda não foram verificados dados conclusivos acerca da influência da aplicação de elicitores e fungicidas no acúmulo de matéria seca total vegetal, principalmente aqueles que possuem propriedades medicinais (ANTONIAZZI; DESCHAMPS, 2006).

Dessa forma, percebemos que as doses de quitosana utilizadas, bem como a concentração do solvente empregado (solução aquosa de ácido acético glacial 1%), provocam redução de biomassa vegetal, justificando a utilização de outras concentrações a fim de reduzir os impactos causados.

A obtenção de matéria prima de qualidade em plantas medicinais ocorre em virtude da utilização de boas práticas de cultivo e manejo (MÁTHÉ; FRANZ, 1999). Assim, o emprego de tecnologias de baixo custo e de fácil aplicação se mostra promissor, tendo em vista a influência destes sobre a produção vegetal, principalmente aqueles de interesse medicinal.

Os resultados obtidos mostram que se faz necessária a utilização de outras concentrações da quitosana bem como do solvente utilizado para sua dissolução, para, dessa forma, evitar perdas de biomassa e obter melhor produção.

7.2 Teor e rendimento de óleo essencial

Os resultados de teor e rendimento evidenciaram que o controle apresentou maior valor de produção de óleo em relação àquelas plantas pulverizadas com quitosana nas concentrações testadas. As doses empregadas no presente não promoveram alterações significativas no rendimento e nem no teor de óleo essencial de *M. arvensis* (Tabela 1).

Tabela 1 teor e rendimento de óleo essencial de *M. arvensis* L. após elicitación com quitosana

Tratamento	Teor (%)	Rendimento (g planta ⁻¹)
Controle	0,563 a	1,323 b
Solvente	0,536 a	0,745 a
0,25% quit	0,491 a	0,776 a
0,5% quit	0,528 a	0,784 a
0,75% quit	0,497 a	0,832 a

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Fato que justifica estes resultados é a perda de biomassa fresca dos vegetais em virtude da agressividade das concentrações utilizadas no experimento. A manutenção dos órgãos produtores de óleo como as folhas das plantas de *M. arvensis* é de fundamental importância uma vez que é nestes locais onde ocorre a biossíntese e armazenamento dos compostos voláteis (SHANKER et al., 1999).

As plantas reagem aos estresses a que são submetidas com isso, tanto o metabolismo primário quanto o secundário sofrem alterações bioquímicas como tentativa de suprir as funções vitais das células evitando a morte celular. A atuação de enzimas antioxidantes e a produção de açúcar solúvel total são exemplos de proteção vegetal, pois atuam frente à explosão oxidativa desencadeada por fatores estressantes (MAZARO, 2007; STANGARLIN et al., 2011).

7.3 Composição química do óleo essencial

O perfil químico do óleo essencial extraído de plantas elicidadas com quitosana apresentou quatro compostos a mais em relação aos demais tratamentos (Sabineno 0,1%; B-pineno 0,2%; Mirceno 0,1% e 3-octanol). Pequenas alterações nos teores de mentol, constituinte majoritário, também podem ser observadas (Tabela 2).

Tabela 2 Composição química do óleo essencial da parte aérea de plantas de *Mentha arvensis* submetidas à pulverização de diferentes concentrações de quitosana de baixo peso molecular no experimento I

COMPOSIÇÃO DO ÓLEO	IR*	CONTROLE	SOLVENTE	0,25% quitosana	0,5% quitosana	0,75% quitosana
Sabineno	973	nd	nd	nd	nd	0,10 ± 0
B-pineno	975	nd	nd	nd	nd	0,28 ± 0,13
Mirceno	976	nd	nd	nd	nd	0,19 ± 0
3 octanol	992	0,08 ± 0	nd	nd	nd	0,21 ± 0
D-limoneno	996	0,49 ± 0,01	0,34 ± 0,06	0,33 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,39 ± 0
1,8-Cineol	1028 - 1029	0,26 ± 0,15	0,21 ± 0	0,15 ± 0,06	0,20 ± 0,12	0,39 ± 0,25
Linalool	1052 - 1060	0,78 ± 0,01	0,63 ± 0,04	0,59 ± 0,03	0,63 ± 0	0,62 ± 0,09
Isopulegol	1147	0,31 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,01
Mentona	1155	3,56 ± 0,67	3,11 ± 0,20	2,83 ± 0,10	3,08 ± 0,33	3,21 ± 0,12
Isomentona	1166	3,22 ± 0,03	2,87 ± 0,16	2,81 ± 0,14	3,06 ± 0,04	3,05 ± 0,31
Mentol	1179	88,27 ± 1,22	89,27 ± 0,53	90,00 ± 0,43	92,12 ± 2,88	89,66 ± 0,45
Isomentol	1186	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0	0,14 ± 0,01
α -terpineol	1193	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,15 ± 0,04
Pulegona	1238	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Piperitona	1257	0,78 ± 0,12	0,64 ± 0,06	0,57 ± 0,06	0,49 ± 0,13	0,39 ± 0,07
β -Cariofileno	1427	0,58 ± 0,11	0,91 ± 0,06	0,80 ± 0,13	0,65 ± 0,28	0,53 ± 0,29
D-Germacreno	1489	0,42 ± 0,11	0,49 ± 0,05	0,41 ± 0,08	0,33 ± 0,13	0,24 ± 0,12
Biclogermacreno	1504	0,19 ± 0,05	0,21 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,06	0,13 ± 0,03
Total identificado (%)		99,47	99,42	99,39	101,83	100,16

A aplicação exógena de substâncias em plantas tem sido prática na agricultura visando alcançar maior produtividade vegetal. Em *Mentha arvensis*, a aplicação de Ácido giberélico (GA₃) e Caliterpenona (CA) mostrou que este último influencia na produção de tricomas e, conseqüentemente, aumento na produção de óleo (BOSE et al., 2013). Isso evidenciou que a referida espécie pode responder à aplicação de substâncias exógenas alterando, neste caso, a sua estrutura anatômica resultando em maior produtividade de óleo essencial.

Em alguns casos, os eliciadores agem simulando o ataque de insetos no vegetal. Este, por sua vez, prepara seu metabolismo para se defender das injúrias causadas. A resposta de defesa da planta está diretamente ligada ao metabolismo secundário e os elicitores também podem exercer influência sobre eles (ALAMINO et al., 2013; ANTONIAZZI; DESCHAMPS, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2004). Verifica-se que as plantas ricas em metabólitos secundários como os terpenoides (óleos essenciais, triterpenos, saponinas e glicosídeos cardioativos) apresentam vantagens de sobrevivência, uma vez que estes compostos estão envolvidos em sua defesa (CORRÊA et al., 2008).

Os terpenoides constituem um grupo importante de voláteis induzidos, pois sua emissão em certos vegetais pode aumentar consideravelmente por meio da herbivoria. Estes compostos também podem ser considerados como semioquímicos, pois estão envolvidos na relação inseto-planta. A indução da síntese destas substâncias requer a ativação de vias metabólicas que ocorrem de maneira organizada (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013).

A quitosana interage com o vegetal simulando o ataque de insetos e desencadeia este tipo de defesa (PASCHOLATI; LEITE, 1994; STANGARLIN et al., 2011). Sendo assim, pode-se afirmar que a maior concentração de quitosana sobre plantas de *M. arvensis* exerceu influência sobre a síntese de alguns constituintes em seu óleo essencial.

7.4 Produção de Biomassa

No experimento II, a produção de Massa seca da parte aérea (MSPA) de *Mentha arvensis* em função da elicitação com quitosana não apresentou diferença significativa entre os tratamentos dentro de cada tempo, porém, no decorrer do período experimental, ocorreram algumas alterações. O tratamento com ácido acético glacial 0,25% proporcionou aumento da massa seca nas plantas às 24 horas, o mesmo ocorreu no tratamento com 0,125% de quitosana. Plantas do grupo controle apresentaram maior massa seca aos sete dias bem como plantas tratadas com quitosana 0,06%. A massa seca da parte aérea de plantas tratadas com quitosana 0,125% manteve-se aos sete dias após aplicação (Figura 3 A).

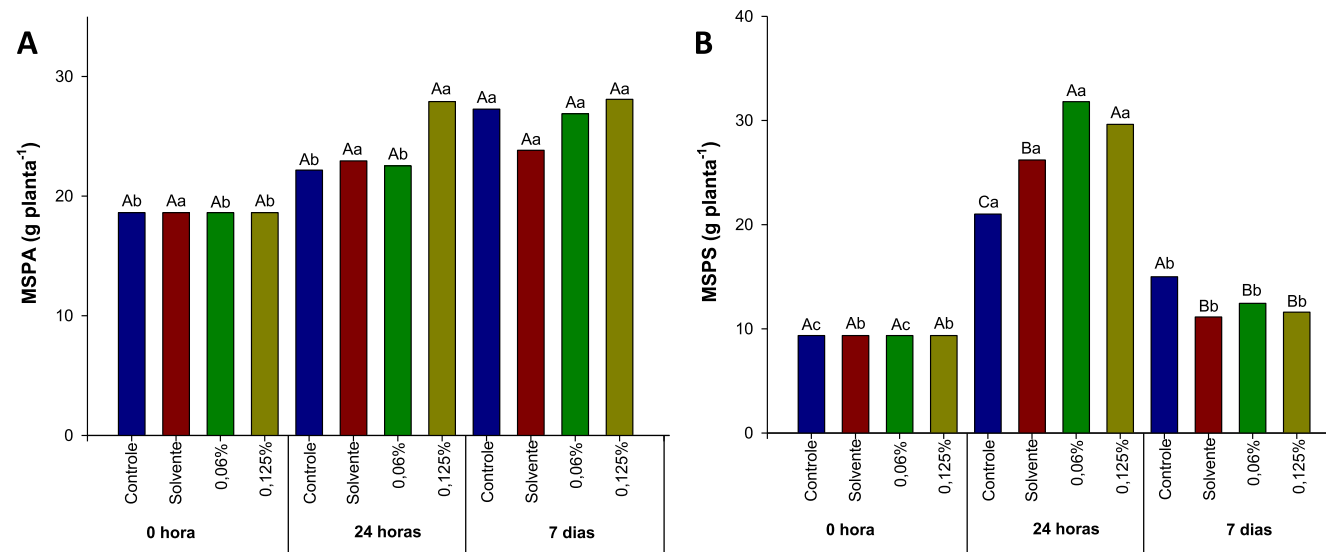


Figura 3 Massa seca da parte aérea (MSPA) [A] e parte subterrânea (MSPS) de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II. As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as minúsculas comparam dentro dos tratamentos nos diferentes períodos de coleta, com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

Observou-se maior produção de massa seca da parte subterrânea (MSPS) entre os tratamentos às vinte horas pós-aplicação. As plantas tratadas com quitosana nas duas concentrações 0,06 e 0,0125% apresentaram maior biomassa que as demais (Figura 3 B). Ao longo do tempo todos os tratamentos incluindo o controle apresentaram aumento de massa seca total, ocorrendo principalmente vinte e quatro horas após a imposição dos tratamentos. Aos sete dias houve um decréscimo da biomassa total (MST) dos vegetais tratados com solvente, 0,06% de quitosana e 0,125% de quitosana quando comparados no tempo de vinte e quatro horas. O controle manteve a biomassa seca total do tempo inicial avaliado (24 h) até o final (7d) (Figura 4 A).

A relação entre a massa seca da parte aérea e a massa seca da parte subterrânea (MSPA/MSPS) apresentou variações ao longo do tempo. Às vinte e quatro horas após a elicitação, as plantas apresentaram menor relação parte aérea/parte subterrânea quando comparadas com tempo zero e sete dias. Esta relação voltou a crescer aos sete dias, após aplicação dos tratamentos, incluindo o controle, o que de certa forma já era esperado em razão do tempo de cultivo, ou seja, as plantas continuaram o seu desenvolvimento normalmente (Figura 4 B).

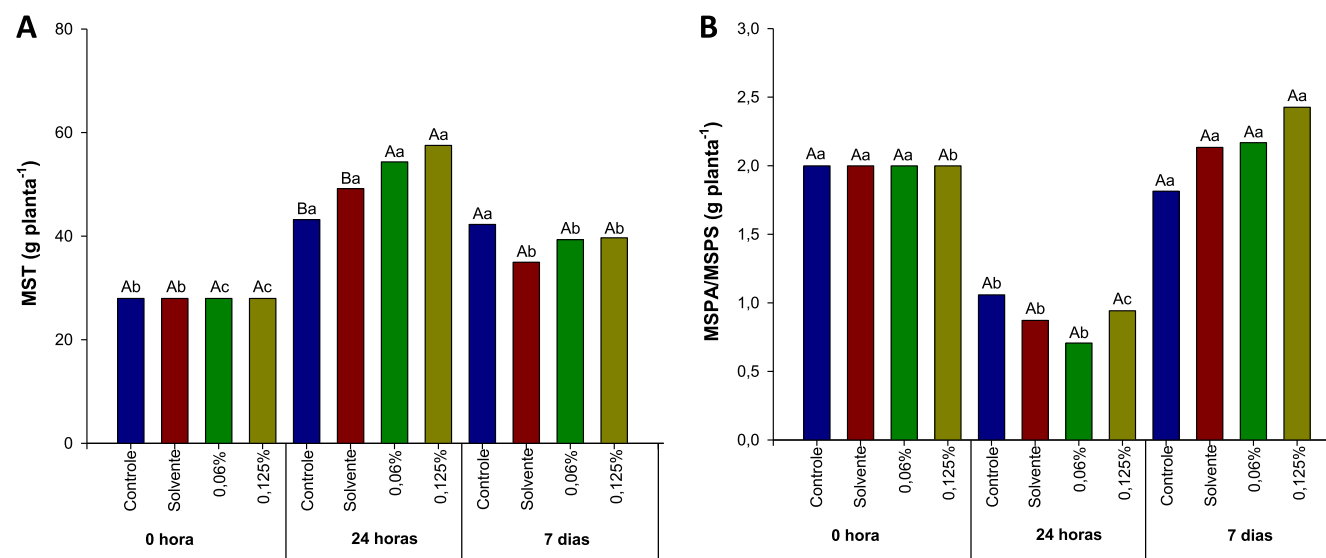


Figura 4 Massa seca total (MST) [A] e relação parte aérea/parte subterrânea (RPAS) [B] de *M. arvensis*, elicitadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II. As letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos, enquanto as minúsculas comparam dentro dos tratamentos nos diferentes períodos de coleta, com base no teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A produção de biomassa fresca é essencial para produção de óleo essencial. O emprego de tratamentos culturais com complementação consiste em uma das alternativas para aumentar a produção de plantas medicinais (CHAVES, 2001; CORRÊA et al., 2010; KOSHIMA; MING; MARQUES, 2006; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2005).

A síntese de terpenoides de interesse como o mentol, ocorre nas células secretoras dos tricomas secretores capitado e peltado em *Mentha arvensis* (CROTEAU et al., 2005; SHARMA et al., 2003). Sendo assim, o estímulo abiótico pode desencadear a sinalização de genes envolvidos em sua biossíntese. A presença de tricomas nas folhas, por exemplo, é um fator que contribui para a produção de óleo essencial em *Mentha arvensis* (SOUZA, 2010).

Os dados encontrados no presente estudo mostram que, ao contrário do ocorrido no primeiro experimento, o solvente não ocasionou a redução da massa seca das plantas de *M. arvensis* mostrando-se viável para a solubilização de quitosana. Tais resultados sugerem que o ácido acético glacial 0,25% pode ser considerado um agente promotor para o aumento da produção e teor de óleo em *Mentha arvensis* L.

7.5 Teor e rendimento de óleo essencial

Os dados de teor e rendimento do óleo essencial de plantas de *M. arvensis* evidenciaram maior teor e rendimento de óleo nas plantas tratadas com a solução aquosa de ácido acético glacial 0,25%, quando comparadas com o controle e aquelas tratadas com quitosana nas duas concentrações (0,06% e 0,125%) (Figura 5 A e B).

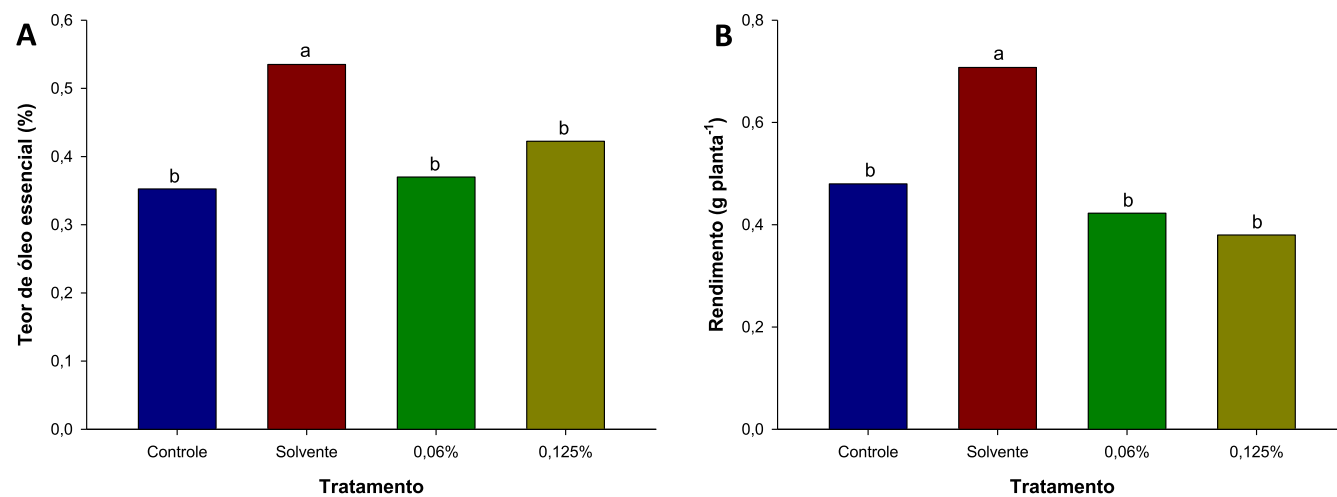


Figura 5 Teor (A) e rendimento (B) de óleo essencial de *M. arvensis*, elicítadas com quitosana, solvente e controle (água destilada) Experimento II. Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

O cultivo de plantas medicinais vem crescendo na atualidade em função da busca por fontes naturais de medicamentos, cosméticos e alimentícios. A produção de metabolitos especiais nestas espécies, muitas vezes, está condicionada aos tratos culturais como a adubação orgânica (CHAGAS; PINTO; BERTOLUCCI, 2011; LAMEIRA, 2008; SALES et al., 2009).

Foi verificado no cultivo hidropônico de *M. arvensis*, que diferentes doses de potássio podem influenciar na produção de matéria fresca das folhas bem como no teor de seu óleo essencial. O rendimento máximo de biomassa foliar e os maiores teores de constituintes químicos majoritários foi alcançado com a utilização de potássio na concentração 412 mg L⁻¹ (GARLET et al., 2007).

Além dos tratos culturais, outros fatores podem influenciar na produção de terpenos em plantas como: Luminosidade, disponibilidade hídrica, temperatura, altitude e a microbiota do solo. Os compostos terpênicos desempenham um papel de proteção frente a condições adversas principalmente contra o ataque de insetos (MORAIS, 2009).

Outras pesquisas têm procurado o aumento dos compostos secundários por meio de substâncias eliciadoras que, ao simular o ataque de insetos na planta, promove a ativação de rotas envolvidas na biossíntese de compostos de interesse farmacêutico (CHAKRABORTY; CHATTOPADHYAY, 2008; KRZYŻANOWSKA et al., 2012; VÁZQUEZ-FLOTA et al., 2009). A defesa contra ataque de insetos está diretamente ligada com a produção de óleo essencial nas plantas visto que estas substâncias apresentam atividade inseticida comprovada (HARBORNE, 1993).

A aplicação exógena de Caliterpenona promoveu aumento de tricomas em *M. arvensis* resultando no aumento da produção de seu óleo essencial (BOSE et al., 2013). A quitosana também pode ser considerada eliciadora por simular ataque de insetos no vegetal e por estar relacionada com a produção de resistência sistêmica adquirida (MATTOS-JUNIOR; QUAGGIO; BOARETO,

2010). No entanto, a utilização de quitosana como substância eliciadora do metabolismo de *Mentha arvensis* ainda não foi relatada.

No presente trabalho observamos que o solvente utilizado para dissolução da quitosana apresentou maior resultado de teor e rendimento do óleo essencial de *Mentha arvensis*. Ao contrário do experimento I, a solução de ácido acético glacial 0,25% não apresentou danos à parte aérea das plantas tratadas. Importante mencionar que em associação com quitosana o solvente proporcionou aumento na biomassa seca da parte aérea após 24 horas de aplicação. Isso mostra que a combinação das duas substâncias pode ter potencializado o estresse sobre o vegetal, alterando sua atividade metabólica.

7.6 Composição química do óleo essencial

Os dados cromatográficos, referentes ao óleo essencial de plantas pulverizadas com quitosana no experimento II, evidenciam que dois compostos que integram o perfil químico do óleo (Isomentona e Isomentol), apresentaram as maiores áreas, principalmente no tratamento no qual se empregou a concentração de quitosana 0,06 %. Observa-se que o teor de Mentol, constituinte majoritário, apresentou uma redução na aplicação de quitosana 0,06%, voltando a apresentar teor equivalente ao controle em plantas pulverizadas com 0,125% de quitosana. Além disso, não foi possível detectar piperitona no óleo essencial de plantas não tratadas com quitosana (controle) e tratadas com a maior dose do trabalho 0,125% (Tabela 3).

Tabela 3 Composição química do óleo essencial da parte aérea de plantas de *Mentha arvensis* submetidas à pulverização de quitosana de baixo peso molecular. Experimento II

COMPOSIÇÃO DO ÓLEO	IR*	CONTROLE	SOLVENTE	0,06% quitosana	0,125% quitosana
α Pineno	933	0,36 $\pm$ 0,09	0,33 $\pm$ 0,11	0,37 $\pm$ 0,11	0,39 $\pm$ 0,07
Sabineno	973	0,13 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,04
β Pineno	975	0,11 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,15	0,14 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,03
3 - octanol	992	0,18 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,15	0,26 $\pm$ 0,10	0,29 $\pm$ 0,11
D - limoneno	996	0,32 $\pm$ 0,13	0,32 $\pm$ 0,15	0,33 $\pm$ 0,12	0,30 $\pm$ 0,07
1,8 Cineol	1027 - 1028	0,47 $\pm$ 0,05	0,48 $\pm$ 0,09	0,50 $\pm$ 0,06	0,52 $\pm$ 0,07
Linalool	1095 - 1100	0,54 $\pm$ 0,08	0,56 $\pm$ 0,32	0,48 $\pm$ 0,13	0,53 $\pm$ 0,24
Isopulegol	1146	0,53 $\pm$ 0,18	1,13 $\pm$ 0,95	0,56 $\pm$ 0,11	0,70 $\pm$ 0,12
Mentona	1154 - 1155	0,55 $\pm$ 0,40	15,72 $\pm$ 33,24	0,84 $\pm$ 1,02	1,27 $\pm$ 1,38
Isomentona	1165 - 1166	1,72 $\pm$ 0,96	15,80 $\pm$ 33,39	16,24 $\pm$ 33,46	30,99 $\pm$ 42,07
Mentol	1176 - 1179	59,80 $\pm$ 33,19	30,21 $\pm$ 42,34	17,17 $\pm$ 32,62	59,80 $\pm$ 42,19
Isomentol	1184 - 1186	14,96 $\pm$ 42,18	30,12 $\pm$ 42,05	60,17 $\pm$ 42,41	2,19 $\pm$ 1,38
α Terpineol	1191 - 1193	0,18 $\pm$ 32,97	0,33 $\pm$ 0,21	0,26 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,03
Pulegona	1238	0,28 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,27	0,30 $\pm$ 0,26	0,33 $\pm$ 0,27
Piperitona	1256 - 1257	nd	0,45 $\pm$ 0,23	0,40 $\pm$ 0,29	nd
β Bourboneno	1388 -1389	0,47 $\pm$ 0,26	0,29 $\pm$ 0,23	0,56 $\pm$ 0,18	0,63 $\pm$ 0,09
β Cariofileno	1424 - 1427	0,52 $\pm$ 0,32	0,83 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,24	0,44 $\pm$ 0,23
D - Germacreno	1486 - 1489	0,34 $\pm$ 0,20	0,43 $\pm$ 0,18	0,53 $\pm$ 0,30	0,38 $\pm$ 0,25
Biciclogermacreno	1502	0,26 $\pm$ 0,21	0,23 $\pm$ 0,16	0,29 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,07
Total identificado (%)		81,72	98,14	99,93	99,46

*Índice de retenção relativo à série de n-alcanos (C8-C20) em coluna HP-5MS. nd: não detectado

A produção de alguns terpenos foi verificada sob a influência da quitosana também em outros trabalhos. Produção dos monoterpenos mentol, mentona e pulegona (LOCKWOOD et al., 2007) e triterpenoides (LEI et al., 2011).

O metabolismo secundário de plantas medicinais pode ser influenciado por fatores bióticos (disponibilidade hídrica, temperatura, incidência de radiação etc.) e abióticos como no caso dos eliciadores (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Como se verifica, os eliciadores podem desencadear a produção de metabólitos secundários pelo fato de simular um ataque de patógeno no vegetal.

Outras pesquisas têm demonstrado que a resposta aos eliciadores envolve, na maioria das vezes, a síntese de compostos secundários, ocasionada pela indução da resistência, desencadeando alterações no particionamento de carbono o que afeta diretamente o desenvolvimento vegetal (ANTONIAZZI; DESCHAMPS, 2006).

Como mencionado nos resultados do experimento I, a utilização da solução aquosa de ácido acético glacial 1% para dissolução da quitosana bem como as concentrações utilizadas (0,25; 0,5 e 0,75%), contribuíram para perda de biomassa nos vegetais o que acarretou em rendimentos menores de óleo essencial quando comparados com as plantas controle. Além disso, observou-se que as plantas controle foram influenciadas pelo estresse causado nas plantas tratadas. Supomos que isto se deu por interação entre as plantas por meio da emissão de voláteis induzidos.

Alguns estudos, envolvendo este tipo de interação, são sustentados pela ecologia química, que envolve as relações ambientais adversas presenciadas pelos vegetais e sua resposta de defesa frente a elas. Como se observa, as plantas são prisioneiras em seu habitat e não podem fugir em decorrência de condições adversas a sua volta. No entanto, podem produzir substâncias de defesa ou de

sinalização na tentativa de diminuir os efeitos nocivos dos ataques a que estão submetidas com frequência (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013).

Temos que considerar que as substâncias estimuladoras, envolvidas nas respostas dos vegetais, apresentam mecanismo de ação ainda sem muita elucidação. Além disso, fatores como concentração do estimulador, estágio de desenvolvimento da espécie no momento da aplicação, o período de contato e ação podem interferir diretamente na síntese de substâncias pela espécie estimulada (LOURENÇO, 2003).

A quitosana exerce um efeito sobre o metabolismo secundário, pois, age simulando o ataque de insetos sobre a planta, desse modo, observou-se que mais uma vez esta apresentou influência sobre o metabolismo de *M. arvensis*, acarretando em alterações na composição de seu óleo essencial.

8 CONCLUSÃO

A biomassa das plantas de *M. arvensis* sofreu influência pela aplicação da quitosana principalmente quando dissolvida em solução aquosa de ácido acético glacial 1%. Concentrações elevadas de quitosana promovem perdas significativas de biomassa fresca resultando em menor teor e rendimento de óleo essencial.

A solução aquosa de ácido acético glacial 0,25% promove maior teor e rendimento de óleo essencial.

Menores concentrações de quitosana promovem o aumento de biomassa seca total na parte subterrânea às 24 horas após pulverização na parte aérea.

O perfil químico do óleo essencial sofreu variação nos teores de compostos terpênicos à medida que se aumentou o estresse sobre a planta. Apesar de danificar fisicamente a parte aérea e resultar em perda de biomassa, as concentrações acima de 0,5% de quitosana, em contrapartida, aumentam os teores de mentol em *Mentha arvensis* L.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

São poucas as tecnologias desenvolvidas na atualidade para emprego no cultivo e manejo de plantas medicinais. O aumento da produção de metabólitos secundários nessas espécies normalmente ocorre em virtude de complementação orgânica nos tratos culturais bem como por alterações nos fatores abióticos como luz, temperatura, umidade e altitude.

Na atualidade, o emprego de substâncias eliciadoras, para promover a produção de compostos secundários, tem se tornado objeto de estudo por vários pesquisadores. Além disso, estas substâncias podem promover a ativação da resistência sistêmica adquirida do vegetal, fornecendo informações que são utilizadas para promover a indução de defesa em culturas de importância econômica.

Neste trabalho, pode-se verificar que a quitosana, em associação com a solução aquosa de ácido acético glacial, promove resposta oxidativa e bioquímica em *Mentha arvensis*. A aplicação de apenas a solução de ácido acético glacial 0,25% promove aumento no teor e rendimento de óleo essencial na espécie, porém vale considerar que, em associação com a quitosana, além de promover diferentes respostas bioquímicas ao longo dos tempos de coleta, também modificam a constituição química do óleo essencial de *Mentha arvensis*, sobretudo o teor de Mentol, seu constituinte majoritário.

REFERÊNCIAS

- ADAMS , R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Illinois: Allured, 2007. 804 p.
- AGUIAR, R. M. **Efeito da quitosana sobre a antracnose e características físicas e químicas de frutos de cultivares de bananeiras**. 2011. 84 p. Mestrado (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2011.
- ALAMINO, D. A. et al. Indução de resistência à podridão-amarga em maçãs pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 3, p. 249-254, mar. 2013.
- ANTONIAZZI, N.; DESCHAMPS, C. Análise de crescimento de duas cultivares de cevada após tratamentos com elicitores e fungicidas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1065-1071, jul./ago. 2006.
- ASSIS, T. C. de; ANDRADE, D. E. G. T. de. Fitonematoses em Zingiberales ornamentais no Estado de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 4, p. 185-198, 2014.
- AZEVEDO, V. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BOSE, S. K. et al. Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 66, p. 150-8, May 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514759>>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- CAMPOS, Â. D. et al. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 15-21, jan. 2009.

CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 327-334, 2011.

CHAKRABORTY, A.; CHATTOPADHYAY, S. Stimulation of menthol production in *Mentha piperita* cell culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 44, n. 6, p. 518-524, 2008.

CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte**. 2001. 144 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

CORRÊA, P. G. et al. Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 60, n. 3, p. 54-57, 2008.

CORRÊA, R. et al. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.

COUTINHO, H. et al. Avaliação da atividade anti-Trypanosoma e anti-Leishmania de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 11, n. 2, p. 147-153, 2012.

CROTEAU, R. B. et al. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 92, n. 12, p. 562-577, 2005.

DÖRNENBURG, H.; KNORR, D. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 15, n. 2, p. 141-168, 1996.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises estatísticas 4.3**. Lavras: UFLA, 1999. Software.

GARLET, T. et al. Produção de folhas, teor e qualidade do óleo essencial de hortelã-japonesa (*Mentha arvensis* L. forma piperascens Holmes) cultivada em hidroponia. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 72-79, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HARBORNE, J. Advances in chemical ecology. **Natural Product Reports**, London, v. 10, n. 4, p. 327-348, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 9776**: ISO/TC 54 essential oils business plan. Geneva, 2004. 12 p.

JOHNSON, M. et al. Antibacterial activity of leaves and inter-nodal callus extracts of *Mentha arvensis* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Canberra, v. 4, n. 3, p. 196-200, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764511600680>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

KOSHIMA, F.; MING, L.; MARQUES, M. Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e de citral em capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, com cobertura morta nas estações do ano. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 112-116, 2006.

KRZYŻANOWSKA, J. et al. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha* × *piperita* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 108, n. 1, p. 73-81, 2012.

LAMEIRA, O. **Plantas medicinais**: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008. 264 p.

LEI, C. et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, London, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2011.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LOCKWOOD, G. B. et al. Production of d-limonene in chitosan elicited *Citrus japonica* suspension cultures. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, n. 2, p. 113-116, 2007.

LORENZI, H.; MATTOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 492 p.

LOURENÇO, M. V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 63-65, jan./dez. 2003.

MARTINS, A. P. et al. Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. **Revista Fitoterapia.net**, Barcelona, v. 11, n. 2, p. 131-146, 2011.

MÁTHÉ, Á.; FRANZ, C. Good agricultural practice and the quality of phytomedicines. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, Birmingham, v. 6, n. 3, p. 101-113, 1999.

MATTOS-JUNIOR, D.; QUAGGIO, J. A.; BOARETO, R. M. Uso de elicitores para defesa em plantas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 65-74, 2010.

MAZARO, S. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007. 105 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MEDICINES, E. D. F. T. Q. O.; COMMISSION, E. P. **European pharmacopoeia**. Lisboa: Council of Europe, 2009.

MORAIS, L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **NIST/EPA/NIH mass spectral library**. Version 2.0. Gaithersburg, 2008. Software.

OLIVEIRA, A. R. M. F. et al. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 155-159, jan./mar. 2012.

OLIVEIRA-JÚNIOR, A. C. et al. Teor e rendimento de óleo essencial no peso fresco de arnica, em função de calagem e adubação. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 735-739, jul./set. 2005.

PASCHOLATI, S.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-51, 1994.

PATIL, K.; MALL, A. Hepatoprotective activity of *Mentha arvensis* Linn. leaves against CCL4 induced liver damage in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Canberra, v. 2, n. 1, p. S223-S226, 2012. Supplement. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S222218081260156X>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.

RAM, D.; RAM, M.; SINGH, R. Optimization of water and nitrogen application to menthol mint (*Mentha arvensis* L.) through sugarcane trash mulch in a sandy

loam soil of semi-arid subtropical climate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 7, n. 7, p. 886-893, May 2006.

SALES, J. F. et al. Acúmulo de massa, teor foliar de nutrientes e rendimento de óleo essencial de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides* epl.) cultivado sob adubação orgânica. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 1, p. 60-68, 2009.

SCOTT, A.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.

SHANKER, S. et al. Essential oil gland number and ultrastructure during *Mentha arvensis* leaf ontogeny. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 42, n. 3, p. 379-387, 1999.

SHARMA, S.; SANGWAN, N.; SANGWAN, R. S. Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. **Current Science**, Bangalore, v. 84, n. 4, p. 544-550, 2003.

SOUZA, M. A. A. **Expressão gênica relacionada à produção de óleo essencial e avaliação do metabolismo de *Mentha arvensis* L. sob diferentes condições de cultivo**. 2010. 123 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

SRIVASTAVA, R. et al. Characteristics of menthol mint *Mentha arvensis* cultivated on industrial scale in the Indo-Gangetic plains. **Industrial Crops and Products**, London, v. 15, n. 3, p. 189-198, 2002.

STANGARLIN, J. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 10, n. 1, p. 18-46, dez. 2011.

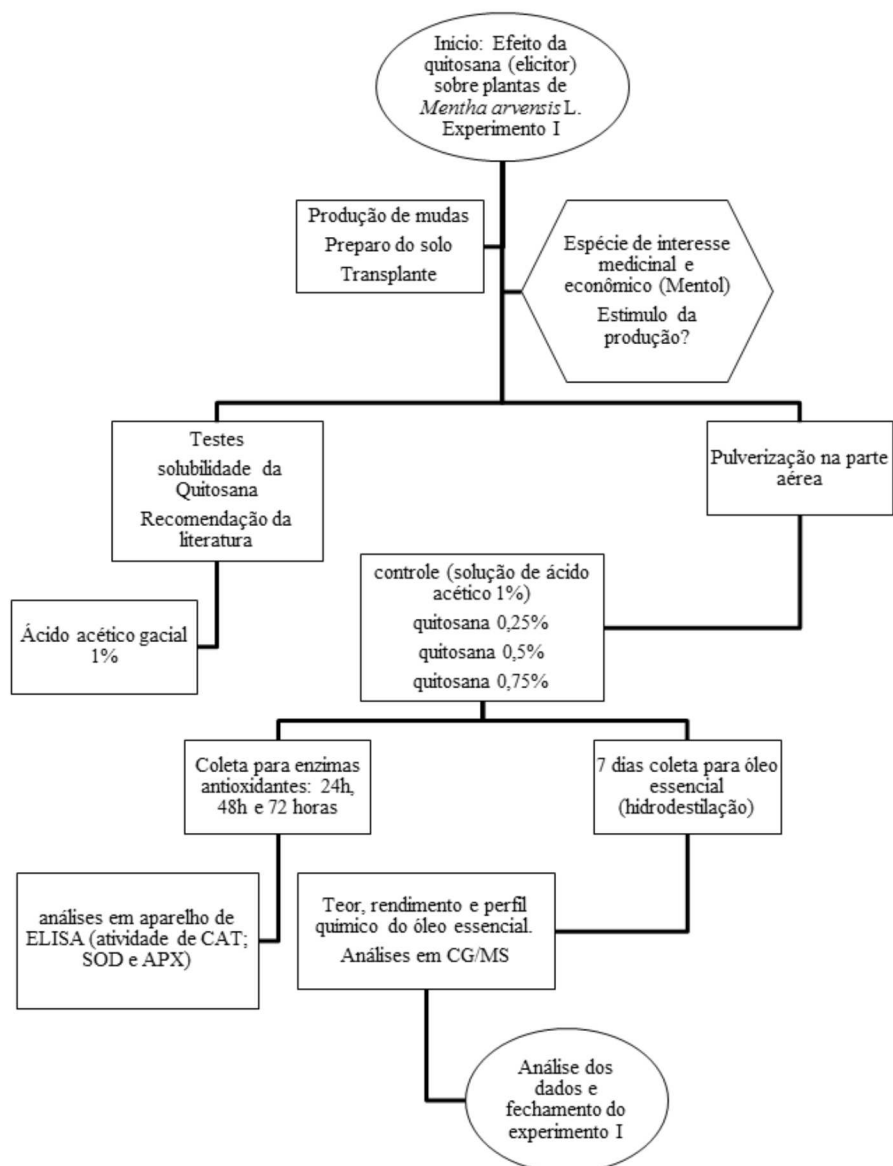
TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia do estresse. In: _____. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 738-772.

TELES, S. et al. Effect of geographical origin on the essential oil content and composition of fresh and dried *Mentha*×*villosa* Hudson leaves. **Industrial Crops and Products**, London, v. 46, p. 1-7, Apr. 2013.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A – Fluxograma Experimento I



APÊNDICE B - Fluxograma Experimento II

