

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
QUÍMICA AGRÁRIA

TESE

**Expressão Gênica Relacionada à Produção de Óleo
Essencial e Avaliação do metabolismo de *Mentha
arvensis* L. Sob Diferentes Condições de Cultivo**

Marco Andre Alves de Souza

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
QUÍMICA AGRÁRIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADA À PRODUÇÃO DE ÓLEO
ESSENCIAL E AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE *Mentha
arvensis* L. SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

MARCO ANDRE ALVES DE SOUZA

Sob a Orientação da Professora
Sonia Regina de Souza

e Co-orientação dos Professores
Rosane Nora Castro
Manlio Silvestre Fernandes

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Química**, no Programa de Pós-
Graduação em Química, Área de
Concentração em Química Agrária.

Seropédica, RJ.
Janeiro de 2010

630.24

S729e

T

Souza, Marco André Alves de, 1975-.

Expressão gênica relacionada à produção de óleo essencial e avaliação do metabolismo de *Mentha arvensis* L. sob diferentes condições de cultivo/ Marco André Alves de Souza - 2010.

123 f. : il.

Orientador: Sonia Regina de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 89-106.


1. Química agrícola - Teses. 2. essências e óleos essenciais - Teses. Plantas medicinais - Metabolismo - Teses. I. Souza, Sonia Regina de. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MARCO ANDRE ALVES DE SOUZA

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor em Química, com área de concentração em Química Agrária.

TESE APROVADA EM 18/01/2010



Prof.^a. Dra. Sonia Regina de Souza (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(Presidente-Orientadora)




Prof. Dr. Ednaldo da Silva Araújo (Embrapa Agrobiologia)



Prof. Dr. Joecildo Francisco Rocha (IB-UFRRJ)



Prof. Dr. Luiz Mors Cabral (UFF)



Prof. Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy
(Embrapa Agroindústria de Alimentos)

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra ao meu filho Lucas Oliveira de Souza e as mulheres de minha vida, minha mãe Dilza Alves de Souza, minha esposa Rejane Smênia O. S. Borges e minha filha Lívia Oliveira de Souza.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus que criou as circunstâncias perfeitas para ser quem sou e chegar onde estou.

A minha mãe, Dilza A. Souza, pelo rigor na educação, incentivo ao estudo e pelo apoio e carinho que tem tido por mim até os dias de hoje.

Ao meu irmão e amigo José Augusto A. Souza Filho, que sempre me apoiou nos momentos difíceis, acreditou em mim e me incentivou a buscar os meus sonhos.

À minha esposa, Rejane Smênia O.S. Borges, companheira fiel e amiga que me deu dois filhos maravilhosos, foi meu apoio nos momentos conturbado e sem a qual minha jornada seria inexecutável.

Aos meus amados filhos Lucas O. Souza e Lívia O. Souza, que ao nascerem despejaram sobre mim o estímulo da vida e o propósito para crescer e vencer.

À Professora Sonia R. Souza, minha orientadora e amiga, que nos últimos doze anos tem tido imensa paciência na condução de minha vida profissional.

À Professora Rosane N. Castro que nos últimos anos têm sido uma amiga insubstituível, me auxiliando incansavelmente nas análises cromatográficas dos óleos essenciais e na correção dos nossos trabalhos em colaboração.

Ao professor Manlio S. Fernandes pela atenção e incentivo dado nos últimos anos e, também, por ceder o laboratório de Nutrição de Plantas para os meus trabalhos de pesquisa.

Ao pós-graduando Carlos A. Bucher e os estagiários do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, pela ajuda durante as análises no laboratório de nutrição.

Ao meu amigo de pós-graduação Leandro Azevedo, atualmente professor na UFRRJ, que contribuiu muito me orientado nos trabalhos com biologia molecular.

Ao professor Jocildo F. Rocha pela importante colaboração nos estudos histoquímicos e anatômicos.

Ao mestrando e amigo Osmário Araújo pelos trabalhos que conduzimos em parceria.

A minha amiga Marian Stark pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao colega de pós-graduação Flávio cordeiro, atualmente professor na UFRRJ e os estagiários do Laboratório de Bioquímica de Plantas: Renan P. Braga, Felipe Padilha, Bruna R. Pereira, Maria do Carmo e Marcela J. Lemos pelo auxílio na condução dos experimentos e em diversas atividades laboratoriais.

Ao PPGQ e sua coordenação.

A CAPES, CNPq e FAPERJ pelo suporte financeiro e as bolsas que permitiram o desenvolvimento dos trabalhos.

E tantos outros que de alguma forma contribuíram para elaboração deste trabalho.

BIOGRAFIA

Marco Andre Alves de Souza nascido em 10 de setembro de 1975, em Botafogo, na cidade de São Sebastião do Rio de Janeiro. cursou o ensino médio e fundamental na cidade do Rio de Janeiro na Associação Brasileira de Ensino Universitário, formando-se no ano de 1993. No ano de 1996, ingressou no curso de graduação em Agronomia da UFRRJ. Em 1998, durante a graduação, realizou um curso onde teve contato com sua futura orientadora, Sonia Regina de Souza. Em 1999 ingressou no seleto grupo de Bolsistas CNPq/PIBIC, permanecendo por quatro anos consecutivos até sua formação em fevereiro de 2004, quando recebeu o título de Engenheiro Agrônomo. Durante este período, desenvolveu trabalhos no Laboratório de Bioquímica de Plantas - ICE, participou de eventos e publicou trabalhos que possibilitaram seu ingresso, em 2004, no mestrado do Curso de Pós-Graduação em agronomia – Ciências do Solo da UFRRJ. Em fevereiro de 2006 recebeu o título de mestre em ciências e foi aprovado no Programa de Pós-Graduação em Química da UFRRJ como bolsista CNPq. Em 2008 foi aprovado em concurso público para professor substituto em bioquímica, desenvolvendo esta função por dois anos consecutivos. Durante todo o período de pós-graduação estudou plantas aromáticas do gênero *Menta* quanto aos aspectos nutricionais, bioquímicos e biomoleculares.

RESUMO

SOUZA, Marco Andre Alves de. **Expressão Gênica relacionada à Produção de Óleo Essencial e Avaliação do Metabolismo de *Mentha arvensis* Sob Diferentes Condições de Cultivo**. 2010. 106f. Tese (Doutorado em Química, Química Agrícola). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O cultivo de espécies aromáticas para a obtenção de óleos essenciais tem grande importância econômica, principalmente, pela crescente demanda nas indústrias de alimentos, de cosméticos e a farmacêutica. O Brasil é o maior produtor de óleo essencial, entretanto, é o que menos arrecada em valores monetários, pois, sua produção é basicamente de óleo essencial de laranja, com baixo valor agregado. O óleo essencial de *Mentha arvensis* L. é rico em mentol (70-80%), uma dos produtos naturais com maior demanda no dia-a-dia do homem moderno. Atualmente, o Brasil tornou-se um grande importador de mentol o que tem contribuído negativamente para a balança comercial brasileira. Deste modo, para o desenvolvimento deste trabalho escolheu-se a planta *M. arvensis*. O objetivo do estudo foi avaliar se variações nas intensidades luminosas e diferentes concentrações de fósforo promovem alterações na produção de biomassa e em aspectos nutricionais, com reflexos na biossíntese de óleos essenciais. Também foi avaliada a influência da idade da folha sobre a qualidade do óleo essencial. Com esta finalidade, a planta de *M. arvensis* foi cultivada sob o efeito de diferentes condições, o que permitiu a análise dos teores das frações solúveis, dos pigmentos fotossintéticos, das atividades das enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio e o estudo histoquímico e anatômico dos tricomas secretores, estrutura morfológica onde é produzido o óleo essencial. Também foram realizadas análises da expressão dos genes relacionados com a rota de síntese do mentol. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em Clevenger modificado e as análises químicas das substâncias realizadas por CG/EM. A utilização do índice de Kovats auxiliou na identificação das principais substâncias no óleo essencial. Os resultados permitiram concluir que a qualidade do óleo essencial é determinada pelas condições fisiológicas e a idade das folhas e que a produção é dependente da eficiência de síntese e a densidade de tricomas secretores nas folhas. Além disso, foi constatado que as diferentes concentrações de fósforo afetaram alguns aspectos do metabolismo vegetal, os quais refletiram na produção de biomassa, nas frações solúveis, com conseqüências na produção e qualidade dos óleos essenciais. Também, mostraram que variações nos níveis de luminosidade afetaram a expressão de seis entre os oito genes envolvidos com a rota de síntese do mentol, em plantas de *M. arvensis* e que as alterações na expressão dos genes provavelmente estão associados a um fator de transcrição, o qual deve estar atuando sobre toda a rota metabólica.

Palavras-chave: *Mentha arvensis*, óleos essencial, sistema hidropônico, tricomas secretores, expressão gênica.

ABSTRACT

SOUZA, Marco Andre Alves. Gene expression related to Production of Essential Oil and Evaluation of *Mentha arvensis* Metabolism Under Different Conditions of Cultivation. 2010. 106f. Thesis (Ph.D. in Chemistry, Agricultural Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

The cultivation of aromatic specimens for obtaining essential oils have great economic importance, mainly by increasing demand in the food, cosmetic and pharmaceutical industry. Brazil is the largest producer of essential oil, however, is what earns less in money value, because, its production is mainly of orange essential oil, with low added value. The essential oil of *M. arvensis* is rich in menthol (70-80%), a natural products with higher demand in daily life of modern man. Currently, Brazil has become a major importer of menthol which has contributed negatively to the brazilian trade balance. Thus, for the development of this work was chosen to be a specimens of economic interest and social demand, the *Mentha arvensis*. The purpose of study was to evaluate whether changes in light intensities and different levels of phosphorus promote changes in biomass production and nutrition, with consequences for the biosynthesis of essential oils. We also analyzed the influence of leaf age on the quality of essential oil. To this end, the plant of *M. arvensis* was grown under the effect of different conditions, which allowed the analysis of the levels of soluble fractions, of photosynthetic pigments, the activities of enzymes related to nitrogen assimilation and the anatomical and histochemical study of trichomes, morphological structure where it is produce the essential oil. The study also included analysis of the expression of genes related to the route of menthol synthesis. The essential oil was obtained by extraction with hydrodistillation in modified Clevenger and the chemical analysis of substances obtained by GC-MS. The Kovats index was used to collaborate in identification of the main substances in essential oil. The results showed that the essential oil quality is determined by physiological conditions and leaf age and that the production is dependent on the synthesis efficiency and density of trichomes on the leaves. In addition, it was found that different concentrations of phosphorus affected some aspects of plant metabolism, which reflected the production of biomass in the soluble fraction, with consequences on production and quality of essential oils. Also showed that variations in light levels affected the expression of six of the eight genes involved in the route of synthesis of menthol, in plants of *M. arvensis* and that changes in gene expression are probably associated with a transcription factor, which could be acting on the whole pathway. All of this information showed that environmental conditions and / or nutritional affected some aspects of plant metabolism, which reflected the production of biomass, of trichomes and on the expression of genes related to the route of menthol, which reflect on the quality and the production of essential oils.

Keywords: *Mentha arvensis*, essential oils, hydroponic system, secretors trichomes, gene expression.

LISTA DE SÍMBOLOS

3PGA	3-fosfoglicerato (3-phosphoglycerate)
ATP	Adenosina trifosfato
c+x	Carotenos + xantofilas
CG/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa
Cl _a , Cl _b	Clorofilas a e b
CoA	Coenzima A
DMAP	Dimetilalil pirofosfato (Dimethylallyl pyrophosphate)
DNA	Ácido desoxiribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
DOXP	Desoxi-D-xilulose 5-fosfato (Deoxy-D-xylulose 5-phosphate)
E4P	Eritrose 4-fosfato (Erythrose 4-phosphate)
FPP	Farnesil pirofosfato (farnesyl pyrophosphate)
FSII	Fotossistema II
GA3P	Gliceraldeído 3-fosfato (Glyceraldehyde 3-phosphate)
GDH	Glutamato desidrogenase
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato (geranylgeranyl pyrophosphate)
Gli	Glicose
GOGAT	Glutamato sintase
GPP	Geranil pirofosfato (geranyl pyrophosphate)
GS	Glutamina sintetase
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IPP	Isopentenil pirofosfato (Isopentenyl pyrophosphate)
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
N	Nitrogênio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (nicotinamide adenine dinucleotide)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NPK	Adubo contendo Nitrogênio, Fósforo e Potássio.
NR	Nitrato redutase
OPPP	Via oxidativa das pentose-fosfato (oxidative pentose-phosphate pathway)
P	Fósforo (Phosphorus)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
PEP	Fosfoenolpiruvato (phosphoenolpyruvate)
Pir	Piruvato
PMSF	Metosulfato de fenazina (phenazine methosulfate)
PVP	Polivinilpirrolidona
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RNA	Ácido ribonucléico (Ribonucleic acid)
Sac	Sacarose
TNG	Tricoma não glandular
TSC	Tricoma <i>secretor</i> capitado
TSP	Tricoma <i>secretor</i> peltado
UV	Radiação ultra violeta
XAD-4	Resina polimérica hidrofóbica
α -KG	alfa-cetotoglutarato (alpha-ketoglutarate)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de algumas substâncias naturais e semi-sintéticas utilizadas como medicamento	5
Figura 2. Rotas ou vias metabólicas	7
Figura 3. Biossíntese de metabólitos primários e sua relação com os eventos que ocorrem com a planta	8
Figura 4. Esquema hipotético de utilidades ecológicas, fisiológicas e adaptativas dos compostos secundários para o estabelecimento da planta no ambiente	9
Figura 5. Principais rotas metabólicas para a biossíntese de metabólitos especiais, formados principalmente por dois precursores: o ácido chiquímico e o acetato	10
Figura 6. Principais substâncias encontradas nos óleos essenciais de plantas do gênero <i>Mentha</i>	12
Figura 7. Via chiquimato/aragonato	14
Figura 8. Diferentes reações químicas para a síntese de fenilpropanoides a partir de (E)-cinamato ou 4-cumarato	15
Figura 9. Via DOXP	16
Figura 10. Ambas as vias, plastidial (DOXP) e citossólica (mevalônica)	17
Figura 11. Via metabólica para síntese de monoterpenos	18
Figura 12. Tricoma secretor peltado.	19
Figura 13. Compartimentos envolvidos na biossíntese de monoterpenos em plantas de <i>Mentha arvensis</i>	21
Figura 14. Transporte de fotoassimilados a partir das células do parênquima clorofilado (fonte) até as células secretoras (dreno).	23
Figura 15. <i>Mentha arvensis</i> conhecida popularmente como: hortelã japonesa, menta japonesa e vique..	27
Figura 16. Montagem do sistema para hidrodestilação do óleo essencial	29
Figura 17. Posicionamento do sistema hidropônico, dos tratamentos e dos pontos de medição da luminosidade do experimento montado na câmara de crescimento vegetal	32
Figura 18. Descrição do método de coleta dos níveis de luminosidade e os valores obtidos aos 36 dias de cultivo.	33
Figura 19. Esquema de separação de amostras para a extração de óleo essencial das folhas da parte superior e inferior das plantas de <i>M. arvensis</i> .	34
Figura 20. Posicionamento dos tratamentos e os pontos de medição da luminosidade do experimento montado na casa de vegetação.	37
Figura 21. Cromatograma de íons totais (CG/FID) do óleo essencial extraído das folhas de <i>M. arvensis</i> utilizando o método hidrodestilação (A), utilizando o solvente diclorometano (B), eter de petróleo (C), eter etílico (D), etanol (E) e acetato de etila (F).	43
Figura 22. Espectro de massa do mentol extraído das folhas de <i>M. arvensis</i> por hidrodestilação.	47

Figura 23. Proposta de fragmentografia do mentol extraído das folhas de <i>M. arvensis</i> por hidrodestilação.	48
Figura 24. Concentração dos pigmentos fotossintéticos em plantas de <i>M. arvensis</i> , em função do tempo, e do posicionamento da folha na planta.	49
Figura 25. Concentração e taxa entre os pigmentos fotossintéticos em plantas de <i>M. arvensis</i> , em função do posicionamento da folha na planta (3°, 4° e 5° nó)	50
Figura 26. Atividade da Nitrato Redutase em folhas do 3°, 4° e 5° nó de plantas de <i>M. arvensis</i>	51
Figura 27. Variação média do pH na solução nutritiva para o cultivo de <i>Mentha arvensis</i> em função dos teores de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM de P) e do tempo	52
Figura 28. Níveis de clorofila a, b e carotenóides nas folhas da parte aérea da <i>M. arvensis</i> cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM).	53
Figura 29. Razão entre clorofila a e b e entre clorofila total (a+b) e carotenóides (x+c) nas folhas da parte e aérea de <i>Mentha arvensis</i> cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM)	54
Figura 30. Biomassa de raiz, caule e folha da <i>Mentha arvensis</i> cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM)	54
Figura 31. Correlação entre massa fresca das raízes de <i>Mentha arvensis</i> cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM).	55
Figura 32. Razão entre parte aérea/raiz e massa por unidade de área em plantas de <i>Mentha arvensis</i> cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM).	55
Figura 33. A) Detalhes das plantas de <i>Mentha arvensis</i> cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM)	56
Figura 34. Teores de A) açúcares solúveis, B) N-nitrato e C) N-amino em folhas, caules e raízes de <i>Mentha arvensis</i> cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM)	57
Figura 35. Correlação linear entre os teores de Açúcares Solúveis e os de N-Amino nas folhas de <i>Mentha arvensis</i> cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM).	58
Figura 36. Atividade da NR em folhas, caules e raízes de <i>Mentha arvensis</i> cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM) .	59
Figura 37. Avaliação do perfil cromatográfico (CG) dos óleos essenciais por meio da análise de componentes principais (PCA, 5%)	60
Figura 38. Imagens obtidas de uma suspensão contendo $1,1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ de cabeças do tricoma secretor (CS) extraída das folhas de <i>M. arvensis</i> utilizando a metodologia proposta por GERSHENZON <i>et al.</i> , (1992)	62
Figura 39. Teor (%) de óleo essencial extraído das folhas superiores (3°, 4° e 5° nó) e inferiores (6°, 7° e 8° nó) das plantas de <i>Mentha arvensis</i> cultivadas em canteiros por 45 dias	63
Figura 40. Avaliação do perfil cromatográfico (CG) dos óleos essenciais por meio da análise de componentes principais (PCA, 5%).	64

- Figura 41.** A) Radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) obtida nos pontos de medição diariamente as 9, 12 e 15 horas. B) Percentual de redução da luminosidade na casa de vegetação proporcionado pelo sombrite em cada tratamento proposto.. 65
- Figura 42.** Os valores diários das temperaturas máxima e mínima ($^{\circ}\text{C}$), medidos dentro da casa de vegetação e do fluxo de ftons fotossintético ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1} \times 10^2$), medido fora da casa de vegetação. 66
- Figura 43.** Variação média do pH na solução nutritiva no cultivo de *Mentha arvensis* submetida a quatro intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%) 66
- Figura 44.** Teores de clorofilas a, b e total nas folhas da parte aérea de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%).. 67
- Figura 45.** Razão entre clorofila a e b e entre clorofila total (a+b) e carotenóides (x+c) nas folhas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%) 68
- Figura 46.** Biomassa de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). 68
- Figura 47.** Detalhes das plantas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). 69
- Figura 49.** Razão parte aérea/ raiz e massa seca de folha por unidade de área em plantas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). 69
- Figura 50.** A) Teor (mg.gms^{-1}) e B) conteúdo (mg.pote^{-1}) de N-Total nas partes da plantas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%) 70
- Figura 51.** Teor (mg.gms^{-1}) de fosforo nas partes da plantas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%) 71
- Figura 52.** Teores de A) açúcares solúveis, B) N-Nitrato e C) N-aminos nas folhas, caules e raízes de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%) 72
- Figura 53.** Correlação linear entre os teores de Açúcares Solúveis e os de A) N-Nitrato, B) N-total e C) atividade da NR nas folhas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). 73
- Figura 54.** A) Atividade da nitrato redutase (NR), B) glutamina sintetase (GS) e C) glutamato desidrogenase – aminação (GDH) nas folhas, caules e raízes de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%) 74
- Figura 55.** Tricomas secretores peltado (A e B) e capitado (C e D) presente nas folhas de *Mentha arvensis*, cultivar IAC 701. 75
- Figura 56.** Densidade de tricomas secretores peltado e capitado nas face A) adaxial e B) abaxial das folhas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). 77

- Figura 57.** Densidade de tricomas secretores peltado e capitado nas faces adaxial (A e B) abaxial (C e D) em função das regiões proximal, mediana e distal das folhas de *M. arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%) 78
- Figura 58.** Teor do óleo essencial obtido por arraste com vapor d'água e densidade de tricomas secretores peltado e capitado nas folhas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). 79
- Figura 59.** Avaliação do perfil cromatográfico (CG) dos óleos essenciais por meio da análise de componentes principais (PCA, 5%) 81
- Figura 60.** Expressão relativa dos genes que codificam para as enzimas (-)-limoneno sintase (LS), limoneno-3-hidroxilase (L3H), (-)-trans-isopiperitenol desidrogenase (IPD), (-)-isopiperitenona redutase (IPR), (+)-pulegona redutase (PR) e (-)-mentona redutase (MR) em plantas de *Mentha arvensis* (IAC-701) 82
- Figura 61.** Associação entre o aumento na expressão dos genes que codificam para as enzimas envolvidas com a via de biossíntese do mentol em plantas de *Mentha arvensis* 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração dos nutrientes na solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) e nos tratamentos com diferentes doses de P.	32
Tabela 2. Concentração dos nutrientes na solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) e na solução adaptada para 2 mM de N-NO ₃ ⁻ e 2mM de N-NH ₄ ⁺ .	36
Tabela 3. Relação dos genes e dos primers utilizados nas análises de expressão gênica em plantas de <i>M. arvensis</i> .	41
Tabela 4. Composição química do óleo essencial de <i>M. arvensis</i> obtido por hidrodestilação.	46
Tabela 5. Percentual médio das substâncias presentes no óleo essencial de <i>Mentha arvensis</i> cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM).	59
Tabela 6. Percentual médio das substâncias presentes nas folhas superiores (3°, 4° e 5° nó) e inferiores (6°, 7° e 8° nó) das plantas de <i>Mentha arvensis</i> , cultivadas em canteiros por 45 dias.	64
Tabela 7. Histoquímica dos tricomas peltados e capitados. (-) reação negativa, (+) reação positiva e (++) reação mais intensa.	76
Tabela 8. Percentual médio das substâncias presentes nas folhas de <i>Mentha arvensis</i> cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%).	80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Plantas Medicinais: Aspectos Culturais, Sociais e Econômicos.	4
2.2 Metabolismo Vegetal	7
2.2.1 Metabolismo primário	8
2.2.2 Metabolismo especial	9
2.3 Óleos Essenciais	11
2.3.1 Biogênese de óleos essenciais	13
2.3.2 Estrutura secretora	19
2.3.3 Aspectos ecológicos	21
2.4 Integração Entre o Metabolismo de Carboidratos e o de Óleos Essenciais	22
2.5 Fatores que Afetam a Produção e Qualidade de Óleos Essenciais	24
2.6 Produção de Plantas Aromáticas em Sistema Hidropônico	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Experimento 1: Avaliação do Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial de <i>Mentha arvensis</i> L. Obtido por Arraste com Vapor de Água e Solventes Orgânicos	27
3.1.1 Material vegetal	27
3.1.2 Produção de mudas	28
3.1.3 Confeção dos canteiros de plantas medicinais	28
3.1.4. Condução do Experimento	28
3.1.5 Extração do óleo essencial com solventes orgânicos	28
3.1.6 Extração do óleo essencial por hidrodestilação	29
3.1.7 Análise química do óleo essencial	29
3.2 Experimento 2: Determinação da Folha Modelo Visando Análises do Metabolismo nas Plantas de <i>Mentha arvensis</i> L.	30
3.2.1 Material vegetal, produção de mudas e canteiros	30
3.2.2 Condução do experimento	30
3.2.3 Extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos	30
3.2.4 Atividade da nitrato redutase	31
3.3 Experimento 3: Efeito da Concentração de Fósforo Sobre a Produção e a Qualidade do Óleo Essencial de <i>Mentha arvensis</i> L. Cultivada por Hidroponia.	31
3.3.1 Material vegetal, produção de mudas	31
3.3.2 Sistema hidropônico.	31
3.3.3 Solução nutritiva	31
3.3.4 Condução do experimento	32
3.3.5 Extração e análise das frações solúveis.	33
3.3.6 Extração do óleo essencial com diclorometano	33
3.3.7 Análise química do óleo essencial	34
3.4 Experimento 4: Extração de Células Secretoras e Avaliação do Teor e do Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial das Folhas de <i>M. arvensis</i> L., com Diferentes Idades.	34
3.4.1 Material vegetal, produção de mudas e canteiros	34
3.4.2 Condução do experimento	34

3.4.3	Extração, isolamento e quantificação de células secretoras	35
3.4.3.1	Extração das células secretoras	35
3.4.3.2	Isolamento das células secretoras	35
3.4.3.3	Quantificação das células secretoras	35
3.5	Experimento 5: Efeito da Luminosidade Sobre a Produção e a Qualidade do Óleo Essencial de <i>M. arvensis</i> L. Cultivada por Hidroponia.	36
3.5.1	Material vegetal, produção de mudas e sistema hidropônico	36
3.5.2	Solução nutritiva	36
3.5.3	Controle da luminosidade	36
3.5.4	Condução do experimento	37
3.5.5	Digestão e análises em material seco	37
3.5.6	Extrato protéico	37
3.5.7	Atividade das enzimas glutamina sintetase, glutamato sintase e glutamato desidrogenase	38
3.5.8	Anatomia e histoquímica dos tricomas secretores em <i>Mentha arvensis</i>	38
3.5.8.1	Anatomia e contagem dos tricomas secretores	38
3.5.8.2	Histoquímica dos tricomas secretores	39
3.5.9.	Avaliação por PCR em tempo real da expressão dos genes que codificam para as enzimas da rota de síntese do mentol.	39
3.5.9.1	Extração do RNA total	39
3.5.9.2	Quantificação do RNA total extraído	40
3.5.9.3	Tratamento do RNA total com DNase	40
3.5.9.4	Síntese de cDNA fita simples (ss cDNA)	40
3.5.9.5	Construção dos iniciadores	40
3.5.9.6	Pré-amplificação dos genes de interesse	41
3.5.9.7	PCR em tempo real	41
3.5.9.8	Cálculo da expressão relativa dos genes	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Experimento 1: Avaliação do Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial de <i>Mentha arvensis</i> L. Obtido Por Arraste Com Vapor de Água e Solventes Orgânicos	43
4.1.1	Perfil cromatográfico dos óleos essenciais	43
4.1.2	Análise do mentol extraído do óleo essencial de <i>Mentha arvensis</i>	47
4.2	Experimento 2: Determinação da Folha Modelo Visando Análises do Metabolismo nas Plantas de <i>Mentha arvensis</i>	48
4.2.1	Pigmentos fotossintéticos nas folhas do 3º, 4º e 5º nó.	48
4.2.2	Atividade da nitrato redutase nas folhas do 3º, 4º e 5º nó.	51
4.3	Experimento 3: Efeito da Concentração de Fósforo Sobre a Produção e a Qualidade do Óleo Essencial de <i>M. arvensis</i> Cultivada por Hidroponia.	52
4.3.1	Condução do experimento	52
4.3.2	Pigmentos fotossintéticos	53
4.3.3	Biomassa	54
4.3.4	Frações solúveis e atividade da enzima nitrato redutase	57
4.3.5	Óleo essencial	59
4.4	Experimento 4: Extração de Células Secretoras e Avaliação do Teor e do Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial das Folhas de <i>M. arvensis</i> , Com Diferentes Idades.	60
4.4.1	Método de extração, isolamento e quantificação de células secretoras.	60
4.4.2	Avaliação do teor e qualidade do óleo essencial em folhas com diferentes idades.	62

4.5 Experimento 5: Efeito da Luminosidade Sobre a Produção e a Qualidade do Óleo Essencial de <i>M. arvensis</i> Cultivada por Hidroponia.	65
4.5.1 Intensidade luminosa, temperatura e pH.	65
4.5.2 Pigmentos fotossintéticos	67
4.5.3 Biomassa	68
4.5.4 Análise do material seco	70
4.5.5 Análise das frações solúveis	71
4.5.6 Atividade das enzimas nitrato redutases, glutamina sintetase e glutamato desidrogenase	73
4.5.7 Estudo anatômico e histoquímico	75
4.5.8 Densidade de tricomas	76
4.5.9 Óleo essencial	79
4.5.9 Avaliação da expressão gênica	81
5 CONCLUSÕES	86
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais, no transcorrer da história, foram fundamentais e assumiram importante valor para a humanidade, principalmente, na medicina e na culinária. Atualmente, os óleos essenciais estão presentes em nossas vidas com maior intensidade, pois seus componentes possuem grande demanda na indústria de cosméticos, alimentos, perfumaria e química fina (McGARVEY e CROTEAU, 1995; SANGWAN *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2003; KOTHARI, 2005; BIZZO *et al.*, 2009).

Entre os diversos tipos de óleos essenciais utilizados, os produzidos pelo gênero *Mentha* são os mais requisitados, principalmente, o de *Mentha arvensis* L. (menta japonesa, vique), que possui como principal componente o mentol (SHANKER *et al.*, 1999). Dificilmente, o homem moderno não faz uso do óleo essencial de *Mentha arvensis* ou de seus derivados, pois, diversos produtos artesanais e industriais utilizam-no na sua formulação (SHARMA *et al.*, 2003; CROTEAU *et al.*, 2005; GARLET *et al.*, 2007).

Em função da grande demanda, a produção de óleo essencial de *M. arvensis* é a segunda maior do mundo (18.000 Mg.ano⁻¹), perdendo apenas para o de laranja (50.000 Mg.ano⁻¹), no qual o óleo essencial é apenas um subproduto da indústria de suco (SANGANERIA, 2005).

O Brasil é o maior produtor de óleo essencial (42.000 Mg.ano⁻¹), seguido pelos EUA (21.500 Mg.ano⁻¹) e Índia (16.000 Mg.ano⁻¹), entretanto, é o que menos arrecada em valores monetários, pois, movimenta apenas U\$ 70 milhões por ano, sendo os EUA e a Índia os países que mais faturam com este mercado, com 240 e 195 milhões de dólares anuais, respectivamente (KOTHARI, 2005).

O contraste entre a produção e a arrecadação brasileira justifica-se no fato do Brasil produzir pouco óleo essencial com valor agregado, como por exemplo, o de *M. arvensis* (GARLET *et al.*, 2007; BIZZO *et al.*, 2009) Estes fatos têm forte influência na balança comercial brasileira, tornando o Brasil nos últimos quatro anos um grande importador de mentol, o que têm contribuído negativamente em cerca de 10 milhões de dólares por ano (KOTHARI, 2005).

Substituir os tradicionais centros produtores no período da segunda guerra mundial proporcionou ao Brasil aumentar a produção de óleo essencial de *M. arvensis*, tornando-o, na década de 70, o principal produtor mundial (BIZZO *et al.*, 2009). Entretanto, o uso extensivo das áreas produtoras, problemas fitossanitários, entre outros, conduziram os produtores rurais a substituírem as lavouras de *M. arvensis* por outras culturas de menor exigências nutricionais e tratos culturais (MAIA, 1998). Em função destes fatos, atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de óleo essencial de *M. arvensis*, perdendo para Índia e China (SRIVASTAVA *et al.*, 2002).

A composição química do óleo essencial é constituída em sua grande maioria por fenilpropanoides e terpenoides, dos quais os monoterpenos, geralmente, são os mais abundantes (SANGWAN *et al.*, 2001). Nas plantas de *M. arvensis* os monoterpenos representam aproximadamente 90% do óleo essencial, sendo que o percentual de mentol pode variar entre 70 e 95% (SHANKER *et al.*, 1999; SRIVASTAVA *et al.*, 2002).

A biossíntese do óleo essencial nas plantas de *M. arvensis* ocorre exclusivamente nas células secretoras dos tricomas secretores capitado e peltado, isto porque, somente nestas células os genes envolvidos com a síntese do mentol são expressos, tornando este um local único, onde todas as reações bioquímicas de interesse ocorrem (SHANKER *et al.*, 1999; SHARMA *et al.*, 2003; CROTEAU *et al.*, 2005).

Aumentar a concentração de tricomas secretores nas folhas de *M. arvensis* e ampliar a expressão dos genes envolvidos com a síntese dos óleos essenciais pode ser uma excelente estratégia para melhorar a produtividade desta planta, pois, o teor médio (%) encontrado nas suas folhas está entorno de 1,5% (massa seca), o que não é muito se comparado com outras

espécies do gênero (DESCHAMPS, *et al.*, 2006). Contudo não existem linhas de pesquisa no Brasil que priorizem a geração de conhecimento básico sobre os aspectos biomoleculares envolvidos com óleos essenciais. Geralmente, os trabalhos se limitam a avaliar a produção e a qualidade dos óleos essenciais obtidos, sem entretanto, estudar o metabolismo envolvido.

Recentes estudos proteômicos e genômicos possibilitaram compreender como os organismos respondem aos estímulos endógenos e exógenos, conduzindo as pesquisas para a melhoria dos caracteres gerais de interesse. Atualmente, as características indesejáveis (silenciadas) e as desejáveis (superexpressas) permitem a produção em grande escala e com menor custo de várias substâncias de origem vegetal ou animal (LIMA, 2001; VAZ *et al.*, 2007/08). O mesmo pensamento aplicado às plantas cultivadas possibilitou a geração de espécies melhoradas geneticamente (REACH, 2007/08).

SHARMA *et al.* (2003) relataram que apenas um gene pode estar envolvido com a diferenciação entre os diferentes tipos de tricomas. Deste modo, alterar a expressão deste gene tornaria possível aumentar a concentração de tricomas secretores nas folhas.

Depois de extensivos estudos CROTEAU *et al.* (2005) chegaram a conclusão de que certamente após a síntese do óleo essencial, muito pouco é perdido por volatilização ou oxidação, ao contrário, eles observaram que as alterações na produção e qualidade do óleo essencial de *M. piperita* eram controlados pela abundância das enzimas envolvidas com a síntese destas substâncias, as quais eram controladas ao nível transcricional.

No ano de 2001, o grupo de pesquisa liderado por Croteau desenvolveu plantas de *M. piperita* superexpressando o gene *dxr*, e obtiveram 40% de aumento na produção do óleo essencial. Dois anos após, diminuíram os percentuais de pulegona e mentofurano, produtos indesejáveis no óleo essencial de *M. piperita*, ao superexpressarem o RNA-antisense para o gene da mentofurano sintase. No ano seguinte, publicaram resultados, com a mesma planta, mostrando aumento nos teores de limoneno de 2% para 75%, após suprimirem a expressão do gene da limoneno-3-hidroxilase (MAHMOUD e CROTEAU, 2001, 2003 e MAHMOUD *et al.*, 2004).

O objetivo do estudo foi avaliar se variações nas intensidades luminosas e diferentes concentrações de fósforo promovem alterações na produção de biomassa e em aspectos nutricionais, com reflexos na biossíntese de óleos essenciais. Também foi avaliada a influência da idade da folha sobre a qualidade do óleo essencial. Com esta finalidade, a planta de *M. arvensis* foi cultivada sob o efeito de diferentes condições, o que permitiu a análise dos teores das frações solúveis, dos pigmentos fotossintéticos, das atividades das enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio, o estudo histoquímico e anatômico dos tricomas secretores e a análise CG/EM dos óleos essenciais. Também foram realizadas análises da expressão dos genes relacionados com a rota de síntese do mentol.

Portanto, dentro do contexto deste estudo, deve-se destacar como de grande importância a geração de conhecimentos que pode ser extrapoladas ou utilizadas como modelo ao estudo de outras plantas aromáticas, assim como o objetivo de se incrementar a produção e controlar a qualidade das substâncias produzidas pelas plantas aromáticas.

O estudo dos mecanismos envolvidos nesses processos é um campo da pesquisa que apresenta um interesse crescente. Principalmente, porque os governos têm estimulado a utilização de fitoterápicos na saúde pública (BRASIL, 2006). Além disso, os óleos essenciais possuem larga aplicação na produção de fitoterápicos. E a biotecnologia como ferramenta para o estudo em bioquímica, tem muito a oferecer para o aumento da eficiência na produção de óleo essencial, em plantas aromáticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais: Aspectos Culturais, Sociais e Econômicos.

As plantas, especialmente as medicinais, são os maiores aliados do homem na luta contra diferentes males (PATWARDHAN, 2005), desde uma simples dor de cabeça, ao mais complexo como o câncer. Esta relação entre o homem e as plantas se confunde com a própria história da humanidade, onde por necessidade, o homem encontrou nas plantas a resposta aos seus problemas de saúde (PHILLIPSON, 2001).

Apanhados históricos, encontrados em placas de barro babilônicas contendo ilustrações para tratamentos médicos com ervas, apontam plantas sendo utilizadas como fitoterápicos há 3.000 anos antes de Cristo. Outros achados históricos, na mesma época, registram importações de ervas entre diferentes cidades. Entre os anos de 3.000 e 2.000 antes de Cristo foram encontrados registros de que comunidades na China, Assíria, Egito e Índia utilizavam-se de misturas medicinais com ervas (tidas como mágicas) para o tratamento de enfermidades. Por volta de 1550 anos antes de Cristo foram encontrados escritos egípcios com receitas médicas e anotações sobre a utilização aromática e cosmética das ervas (ALMEIDA, 1993; PHILLIPSON, 2001; CUNHA, 2005).

Desde então, o homem vem buscando nas plantas uma resposta eficiente para diferentes problemas de saúde e, com ferramentas cada vez mais modernas e competentes, esta busca tem se ampliado e resultados positivos têm sido encontrados (MATOS, 1998).

Diversos trabalhos científicos vêm confirmando a eficiência da fitoterapia no combate à diferentes enfermidades e moléstias, bem como na recuperação da homeostase ou na supressão de sintomas, tais como: problemas associados ao trato digestivo (BLUMENTHAL, 1998; LAWRENCE, 1992), as vias respiratórias (BLUMENTHAL, 1998;), ao sistema nervoso central e periférico (PHILLIPSON, 1999), problemas associados ao sistema circulatório (HASLAM, 1996; KELLY & SMITH, 1996; DESTRO *et al.*, 2006), ao sistema endócrino (BALDWIN *et al.*, 1986), problemas de pele e mucosas (TYLER; 1994), também doenças causadas por fatores externos, como infecções por diferentes patógenos (AYRES & LOIKE, 1990; SCALBERT, 1991; OKUDA *et al.*, 1993). Além desse relatos, também, são utilizados para amenizar alguns sintomas decorrentes das enfermidades, tais como: dores pelo corpo ou em alguns órgãos, febre, fadiga, inflamação, entre outros (BARATA *et al.*, 1978; MACRAE & TOWERS, 1984).

A possibilidade de se encontrar um novo medicamento, um modelo estrutural para a síntese de novos compostos ou simplesmente a demanda pela utilização de um fitoterápico, tem justificado investimentos de milhões de dólares por todo o mundo em pesquisas com plantas medicinais (NEVES, 2001 e MARTINS, 2000).

Para o tratamento de algumas enfermidades utiliza-se exclusivamente produtos ou derivados extraídos de plantas, como por exemplo, as substâncias semi-sintéticas vinorelbina e vindesina e as não sintéticas vincristina e vimblastina (Figura 1), que são extraídas da vinca e utilizadas na quimioterapia para o tratamento de cânceres de pulmão, mama e sangue (ANELI, *et al.*, 2001; FACCHINI 2001; HASHIMOTO e YAMADA, 1994).

A insuficiência cardíaca congestiva (ICC) é outro grave problema que afeta grande parte da população no mundo e seu tratamento é resolvido, em 90% dos casos, com digoxina e digitoxina (Figura 1), que são heterosídeos cardioativos extraídos, principalmente, de algumas plantas do gênero *Digitalis* (DOHERTY e KANE, 1975).

As empresas farmacêuticas, na maioria dos casos, não esperam somente descobrir novos compostos de uso terapêutico. Elas procuram, também, modelos na natureza, que possam ser utilizados como ponto de partida para o desenho de novas drogas sintéticas (SANDIS *et al.*, 2000).

Algumas substâncias extraídas das plantas, que possuem alta eficiência no controle de algumas enfermidades, podem custar mil dólares o miligrama comercializado. O alto custo inerente ao princípio ativo pode estar relacionado ao fato de serem encontrados em pequeníssimas quantidades nas plantas, serem de difícil síntese ou ambos os casos. Por exemplo, o caso do paclitaxel (Taxol[®]) que foi considerado como o antitumoral mais promissor nos últimos 20 anos (Figura 1). Esta substância foi extraída das cascas do tronco de *Taxus brevifolia* (100 a 300 mg.kg⁻¹) que leva entre 60 e 100 anos para poder ser explorada comercialmente, sua síntese é muito difícil porque esta substância é uma molécula complexa com 11 centros quirais, tornando sua síntese inviável comercialmente (SCHENKEL *et al.*, 2001).

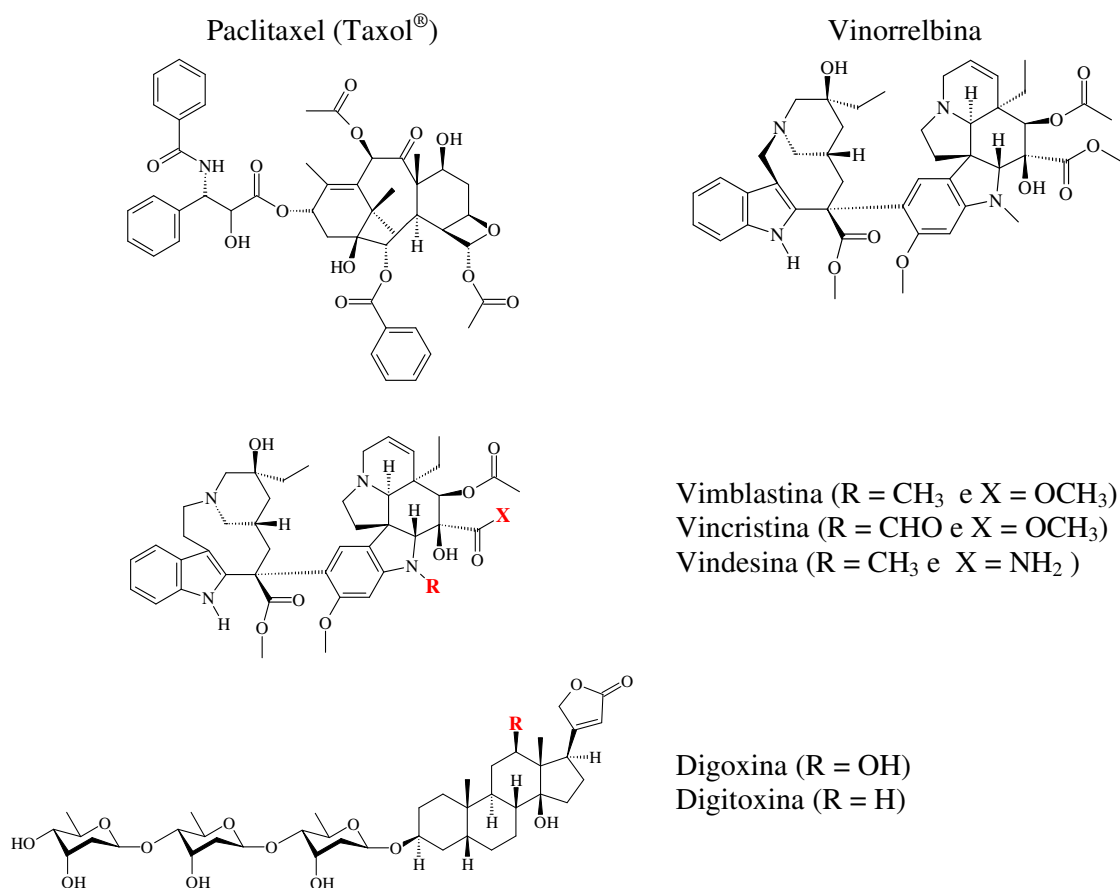


Figura 1. Estrutura química de algumas substâncias naturais e semi-sintéticas utilizadas como medicamento.

Quando a extração de um produto natural ou sua síntese não é viável do ponto de vista ecológico e econômico, outras alternativas devem ser pesquisadas. A biotecnologia tem se mostrado uma promissora ferramenta na solução desses problemas. Através de cultura de tecidos e organismos geneticamente modificados, diversas substâncias estão sendo produzidas, como alcalóides, ubiquinonas, inclusive o paclitaxel (HEZARI e CROTEAU, 1997; JHA *et al.*, 1998; SERAFINE e CASSEL, 2001).

Em vista do potencial farmacêutico que se encontra por traz das plantas, ou melhor, dentro delas, uma enorme porta de oportunidades se abre para a indústria química e farmacêutica; que por sua vez não tem medido esforços na busca de novas moléculas com atividade medicinal.

Em função deste maciço investimento, a maioria dos medicamentos que estão no mercado, origina-se de produtos naturais, em especial, de plantas. Entre as 20 drogas mais vendidas nos EUA em 1988, apenas sete não derivavam diretamente de produtos naturais. Ainda assim estes participaram em algum momento da história farmacológica dessa droga (FERREIRA, 2004).

A participação do Brasil no mercado internacional de plantas medicinais também é bastante expressiva. Segundo dados da Carteira de Comércio Exterior, o Brasil exportou no ano de 1984 um valor estimado de US\$ 20 milhões em produtos naturais obtidos de plantas (NEVES, 2001).

Em contrapartida um outro setor, não menos lucrativo, está ressurgindo com força total: o mercado de fitoterápicos. Adotando uma postura mais natural, este mercado comercializa os produtos de origem vegetal submetidos, a uma menor ação dos processos químicos e bioquímicos, o que geralmente ocorre no processo de obtenção de moléculas isoladas e purificadas. Os fitoterápicos são comercializados na forma de folhas verdes ou secas (trituras ou não), infusos, tinturas, ou também, como medicamento através de formas farmacêuticas (SONAGLIO *et al.*, 2001).

Do processo de pesquisa e desenvolvimento até a comercialização de um medicamento, os fitoterápicos podem proporcionar uma economia superior a 10 vezes o que se gasta para produzir um medicamento convencional (alopático), isto significa muito, quando se trata de saúde pública (FERREIRA, 1998; NEVES, 2001; SOUZA e MIRANDA, 2003).

Pensando nisto, a Organização das Nações Unidas (ONU) e a organização Mundial de Saúde (OMS) têm incentivado a pesquisa e a utilização de fitoterápicos nos postos de saúde e hospitais públicos por todo o mundo (BRASIL, 2006a). No Brasil esta experiência tem sido bem aproveitada e tem se tornado um modelo para outros países.

Como o Brasil se encontra entre os 10 maiores mercados farmacêuticos do mundo e possui a maior biodiversidade do planeta, faltavam alguns esforços a fim de assegurar regras legais para garantir produtos fitoterápicos eficientes, seguros e de qualidade. Então, a partir de 1996 o Ministério de Saúde reuniu um grupo de peritos para avaliar os requisitos legais necessários para se construir uma legislação moderna sobre o assunto (PETROVICK *et al.*, 1999).

Atualmente o governo brasileiro através do decreto 5813 de 22/06/2006 aprovou a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos, criando um Grupo de Trabalho para elaborar, no prazo de cento e vinte dias, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006b). Entretanto alguns estados e municípios do Brasil tomaram a iniciativa e criaram seus programas especiais de apoio a produção de plantas medicinais e a inclusão de fitoterápicos nos programas de saúde pública (MATOS, 1998; BRASIL, 1997; BRASIL, 2004; BRASIL, 2005).

Estes acontecimentos vêm impulsionando o aumento na demanda por medicamentos fitoterápicos, em contrapartida deve existir, também, incentivos públicos para promover estudos e pesquisas que permitam a geração de fitoterápicos eficientes, seguros e de qualidade.

Recentemente, o estudo das plantas medicinais e aromáticas está sendo abordado também sob o enfoque agrícola, servindo como alternativa para pequenos, médios e grandes produtores (MARTINS, 2000). Como resultado, pode-se esperar melhoria na qualidade dos produtos fitoterápicos.

Entretanto, há um problema, pois, a produção de metabólitos especiais é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação, sendo cada um desses processos governado por genes e, portanto, influenciado por três fatores principais: hereditariedade, estágio de desenvolvimento e ambiente (SANTOS, 2001; DREW e DEMAIN, 1977).

Alguns desses fatores podem ser controlados com certa facilidade, como a hereditariedade, através da produção de mudas clonais ou sementes com conhecida pureza genética. Outro fator que pode ser controlado sem problemas é o estágio de desenvolvimento, pois através de estudos pode-se determinar o momento ideal para se realizar a coleta da planta e assim obter melhor produção. Entretanto, o fator ambiente nem sempre pode ser controlado, principalmente em grandes áreas.

As vias metabólicas que produzem os compostos bioativos (metabolismo especial) são vias complexas e que, em geral, não apresentam uma atividade linear em todas as condições ambientais (LIMA *et al.*, 2003). Isto se deve ao fato de serem uma ferramenta de defesa as adversidades do ambiente onde estão sobrevivendo (VINING, 1990).

Portanto, para se elaborar um medicamento fitoterápico, deve-se obrigatoriamente estudar a planta e compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos na produção dos metabólitos especiais e suas relações com o ambiente, entender os fatores que controlam essa vias metabólicas, para que dessa forma, se possa atender as exigências legais, para a produção de um medicamento fitoterápico adequado.

2.2 Metabolismo Vegetal

É denominado metabolismo o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. A presença de enzimas específicas garante a direção dessas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os produtos intermediários, quando formados, são disputados por outros caminhos metabólicos, estabelecendo uma rede de informações químicas que continuamente estão ativando e inibindo a atividade ou expressão de genes que, por sua vez, codificam as enzimas responsáveis pela manutenção dessas vias (Figura 2).

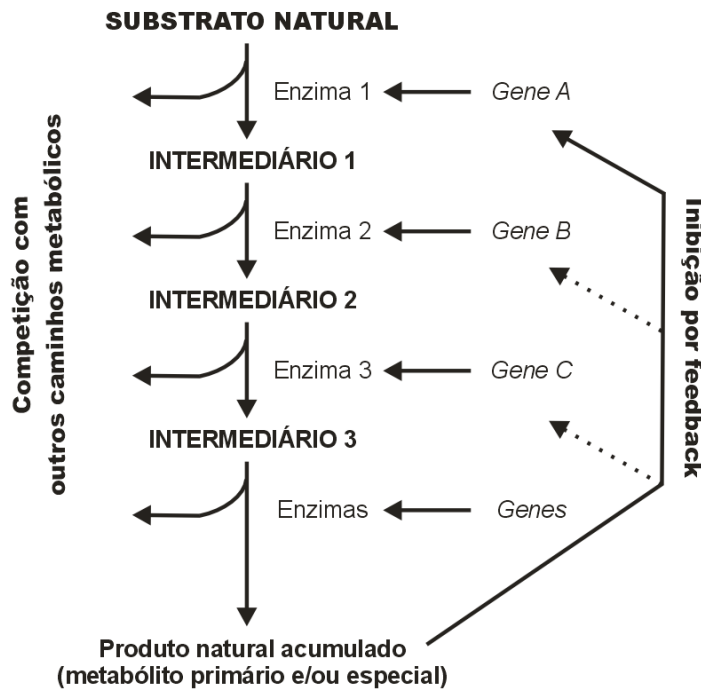


Figura 2. Rotas ou vias metabólicas. À esquerda, a possibilidade de competição pelo substrato intermediário. À direita, a possibilidade da regulação via Feedback ou pelo controle da expressão gênica (adaptado de MOYNA e MENÉNDEZ, 2001).

2.2.1 Metabolismo primário

As plantas possuem um metabolismo geral comum a todas as outras espécies e que por isso recebe o nome de “metabolismo primário”. Faz parte deste, a síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies vegetais, tais como: açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados. Contudo, para a síntese destes compostos, são necessários nutrientes, água e luz provenientes do meio.

Segundo SANTOS (2001) a teoria evolucionista explica porque o metabolismo básico é muito semelhante entre os vegetais. De acordo com essa teoria, todos os seres vivos derivam de um precursor comum, do qual conservam algumas características. É por isso que as suas principais macromoléculas são as mesmas.

Pode-se dizer que nas células existem quatro tipos de pequenas moléculas orgânicas (açúcares, ácidos graxos, aminoácidos e nucleotídeos), as quais darão origem as principais macromoléculas da célula (carboidratos, lipídeos, proteínas e os ácidos nucléicos), que por sua vez, participam da formação de estruturas complexas como: a parede celular, a membrana plasmática, as enzimas e o DNA, responsáveis por funções distintas nas células (SANTOS, 2001).

Além disso, são as rotas metabólicas primárias, como o ciclo de Calvin-Benson, a via glicolítica e o ciclo de Krebs, onde estão presentes os produtos intermediários: gliceraldeído 3-fosfato, fosfoenolpiruvato, α -cetoglutarato, aspartato e acetil-CoA, que são os precursores das principais vias do metabolismo especial (SHAH e ROGERS, 1964)

Nos seres vivos, os eventos biológicos, quase que na sua totalidade, acontecem para permitir que o objetivo principal da vida ocorra a perpetuação das espécies. Neste sentido, nas plantas, várias são as metas a serem alcançadas passando pela captação de energia luminosa até a fase reprodutiva.

Na Figura 3, pode-se observar que a biossíntese de metabólitos primários está relacionada a uma série de eventos que ocorrem sucessivamente ou ao mesmo tempo, desde a captação de energia luminosa, na membrana dos tilacóides (fotossíntese), até a replicação gênica, no núcleo da célula. Portanto, é através do metabolismo primário que dia após dia as plantas trabalham sua sobrevivência, de forma, a garantir estruturalmente a permanência de sua descendência no ambiente.

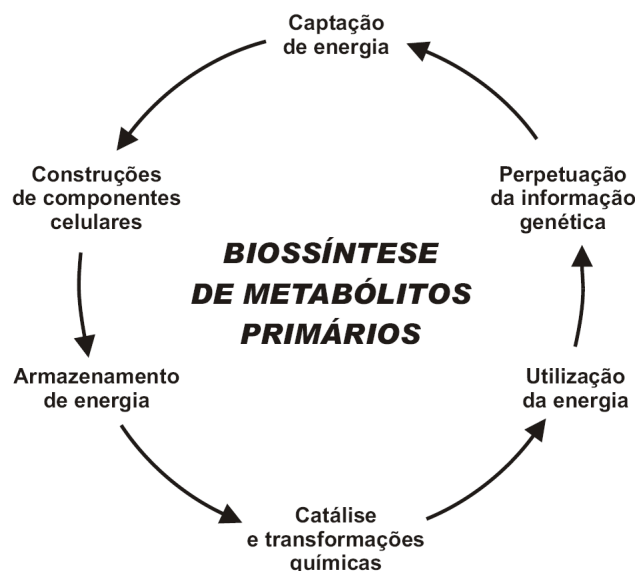


Figura 3. Biossíntese de metabólitos primários e sua relação com os eventos que ocorrem com a planta.

2.2.2 Metabolismo especial

Além das substâncias provenientes do metabolismo primário, diferentes compostos são produzidos em pequenas quantidades, através do metabolismo secundário ou especial (GOTTLIEB *et al.*, 1996). É através dos metabólitos especiais que a planta responde aos diferentes fatores ambientais, sejam eles físicos ou biológicos, permitindo comunicar-se e interagir com diferentes organismos, atraindo ou repelindo, sustentando ou destruindo (MARTINS *et al.*, 1995; MARASCHIN e VEPOORTE, 1999).

Na realidade, os metabólitos especiais são responsáveis pela interface ambiente-planta. Portanto, é através do metabolismo especial que a planta responde aos estímulos externos e internos, como por exemplo, uma maior produção de substâncias voláteis no período do florescimento, para atrair os insetos polinizadores, assim como a produção de substâncias amargas para inibir a herbivoria.

Diferentes substâncias químicas podem ser produzidas durante toda a vida do vegetal, em determinadas épocas e/ou em determinado instante. Elas podem ser uma resposta específica e de curta duração em resposta a um determinado evento, como por exemplo, na relação simbiótica com microorganismos, quando se produzem substâncias fenólicas. Ou podem ser não específicas, como na produção de flavonóides, que por sua vez, possui ação protetora a raios UV, antifúngica, antibacteriana e atrativa a polinizadores, tornando-se necessário durante toda a vida da planta (STOESSL, 1985 e 1986; SANTOS, 2001; MOYNA e MENÉNDEZ, 2001).

A principal teoria que sustenta a causa da enorme diversidade de compostos secundários nas plantas superiores é explicada pela interação com patógenos e herbívoros, o resultado da associação freqüentemente mutualística dessas plantas com herbívoros, e entre eles principalmente os insetos, foi a explosão da química de produtos naturais (GOTTLIEB, 1987). A Figura 4 apresenta um esquema hipotético relacionando a biossíntese de metabólitos especiais com a sustentação da planta no ambiente em que ela se encontra.

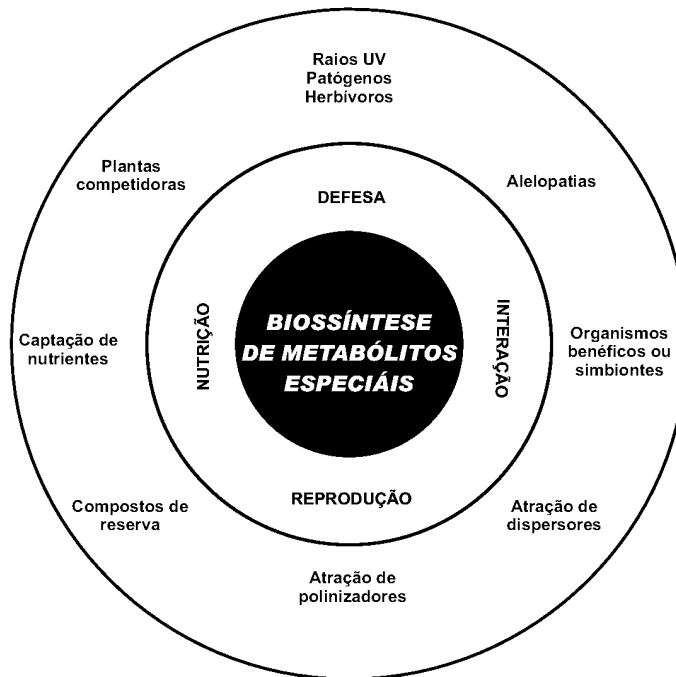


Figura 4. Esquema hipotético de utilidades ecológicas, fisiológicas e adaptativas dos compostos secundários para o estabelecimento da planta no ambiente. Associação dos compostos secundários a diferentes estratégias: nutricionais, reprodutivas, interativas e defensivas.

Segundo SANTOS (2001) a produção de metabólitos especiais é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação, sendo cada um desses processos governados por genes e, portanto, influenciados por três fatores principais: hereditariedade, estágio de desenvolvimento e ambiente.

A integração entre o metabolismo primário e o especial é apresentada de forma reduzida e didática na Figura 5, onde são mostradas as rotas metabólicas principais. Essas vias dão origem a diferentes grupos de substâncias, como: alcalóides, terpenóides, lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinóides, xantonas e lactonas (DI STASI, 1996).

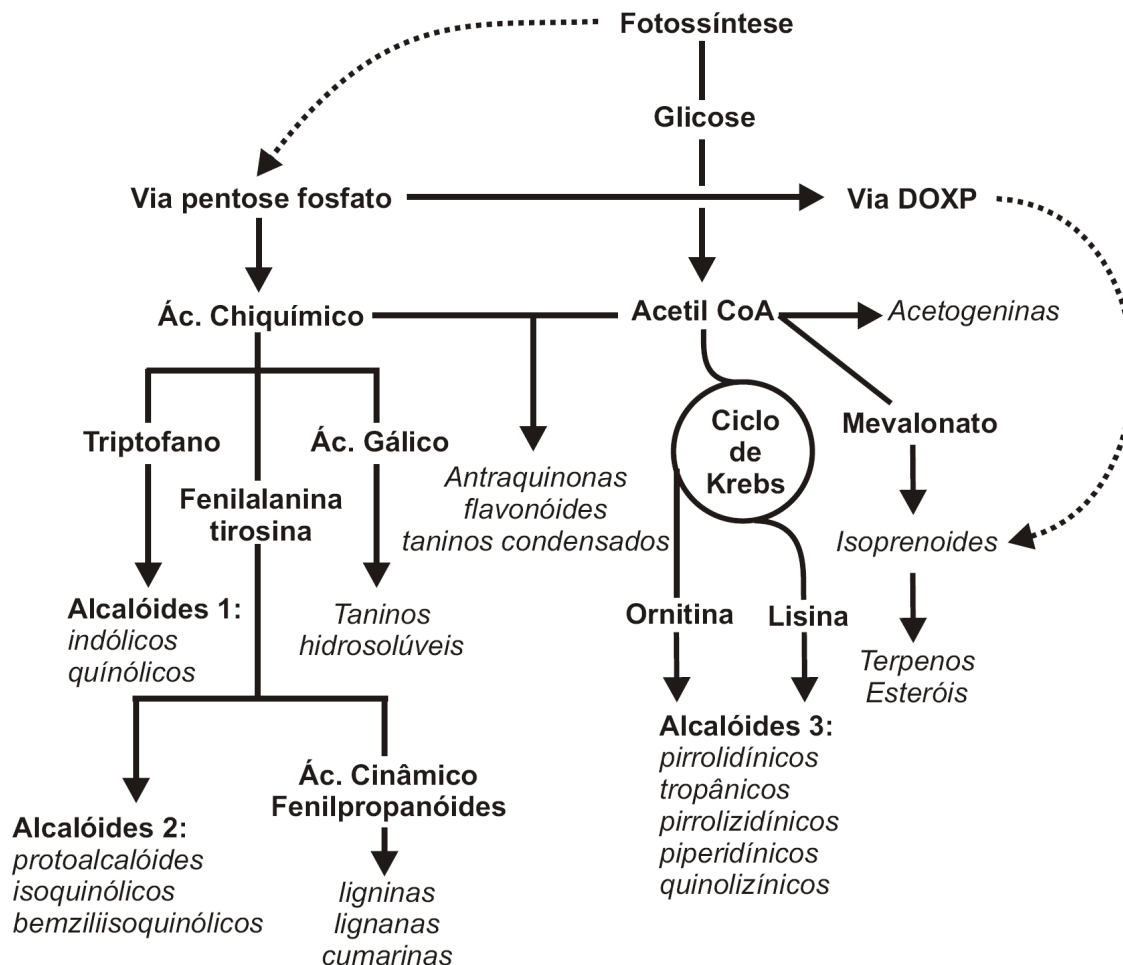


Figura 5. Principais rotas metabólicas para a biossíntese de metabólitos especiais, formados principalmente por dois precursores: o ácido chiquímico e o acetato. Via DOXP recentemente associada a biossíntese de terpenóides em plantas (adaptado de SANTOS, 2001; DI STASI, 1996; SANGWAN *et al.*, 2001; LICHTENTHALER, 1999).

As plantas são como indústrias químicas que a todo o momento, ou em dada circunstância, estão produzindo novas e complexas substâncias. Geralmente estas substâncias são ativas sobre outros organismos, e por esse motivo são exploradas por possuírem atividade medicinal (SANDIS *et al.*, 2000). Segundo PLETSCHE (1998), entre os incontáveis produtos naturais de plantas, os terpenóides constituem o maior grupo (± 33.000 substâncias), seguidos pelos alcalóides (± 16.000 substâncias).

Anualmente, quatro mil novos substâncias químicas de origem vegetal têm sido relatados (MARASCHIN e VEPOORTE,1999); mais de 300 fitoalexinas já foram caracterizadas entre diferentes classes de substâncias químicas como cumarina, diterpeno e flavonóide, entre outras, tendo sido identificadas em mais de vinte famílias de vegetais superiores (SMITH, 1996).

A bioatividade vegetal é um assunto polêmico no meio científico e motivo de controvérsias. Entretanto é imperativo que se faça um estudo unificado desse assunto como forma de se conhecer “os motivos ecológicos” para a existência de cada substância, identificando desde as rotas metabólicas até as estruturas morfológicas, exigindo, dessa forma, uma visão ampla, não apenas macro ou microscópica mas também químico-biológica (GOTTLIEB *et al.*, 1996; GOTTLIEB *et al.*, 2002).

O grande desafio atual está na elucidação das vias biossintéticas do metabolismo especial. Nesse sentido a identificação das enzimas envolvidas na formação dos metabólitos especiais, com o auxílio dos avanços obtidos na biologia molecular, significará a abertura das portas do futuro, tornando cada vez mais viável o isolamento dos genes específicos responsáveis por promover ou inibir as conversões de substâncias fitoterápicas de alta relevância (MATTOS, 1997).

Deste modo, plantas superexpressando genes responsáveis em aumentar a produtividade ou a qualidade de um ou mais metabólito de interesse possibilitará, inclusive, a diminuição do impacto causado pelo homem a natureza, visto que muitas substâncias obtidas por práticas extrativistas poderão ser substituídas por plantas ou outros organismo modificado geneticamente.

Portanto, aumentar a produção em larga escala de espécies vegetais medicinais pode ser uma excelente estratégia para minimizar o extrativismo predatório nas florestas, fato que tem sido responsável pela ameaça de extinção de algumas espécies produtoras de substâncias de amplo uso e comercialização como o jaborandi (*Policarpus microphilum* L), pau rosa (*Aniba roseadora* D.), canela (*Cinnamomun zeylanicum* B.), entre outras (FURLAN, 1996).

2.3 Óleos Essenciais

Existe uma confusão comum e corrente entre óleos essenciais e os óleos vegetais, porém, fora algumas características semelhantes, em geral, ambos pertencem a classes bastante distintas. Os óleos vegetais têm na sua composição basicamente lipídios (triacilglicerol) e ácidos graxos que são substâncias do metabolismo primário, fazendo parte por exemplo, das membranas biológicas e tendo importante papel na reserva de energia para o metabolismo celular (PAULUS *et al.*, 2004).

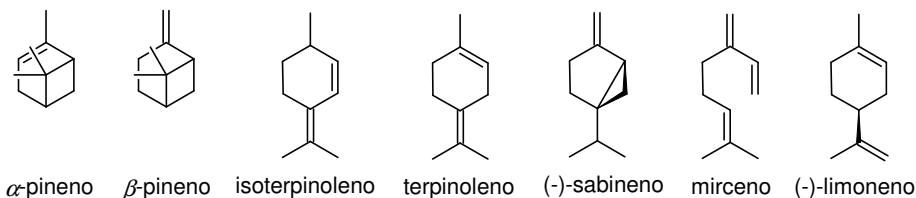
Por outro lado, os óleos essenciais, são misturas complexas contendo diferentes classes de substâncias, principalmente, terpenoides e fenilpropanoides, os quais possuem estruturas químicas diversificadas e fazem parte do metabolismo especial (SANGWAN *et al.*, 2001; SIMÕES e SPITZER, 2001; DUDAREVA *et al.*, 2004). Além disso, os óleos essenciais apresentam funções ecológicas que permitem as plantas interagirem com o ambiente (DUDAREVA *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2007; BOUDET, 2007).

Os óleos essenciais possuem baixa solubilidade em meio aquoso, menor densidade e maior viscosidade que a água, também, possuem boa solubilidade em solventes orgânicos apolares, são voláteis a temperatura ambiente, apresentam forte aroma e paladar picante (SIMÕES e SPITZER, 2001; GOTTLIEB *et al.*, 1996).

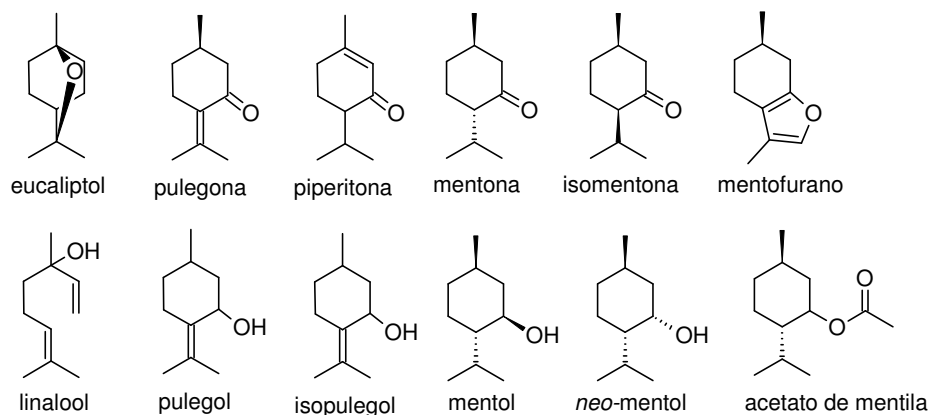
A obtenção ou extração dos óleos essenciais varia em função da finalidade e das características do material. Em geral, os métodos de extração são: prensagem, uso de solventes orgânicos, hidrodestilação e fluidos supercríticos (BIZZO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2004; MAZUTTI *et al.*, 2006).

A composição do óleo essencial pode variar de acordo com a metodologia de extração utilizada, que por sua vez, interfere no perfil químico quanto ao número, ao tipo de constituintes, bem como na sua concentração. Na Figura 6 estão apresentadas as principais substâncias presentes no óleo essencial de *Mentha arvensis* L.

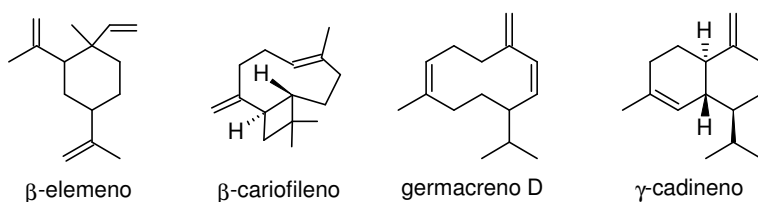
Monoterpenos simples



Monoterpenos oxigenado



Sesquiterpenos



Fenilpropanóides

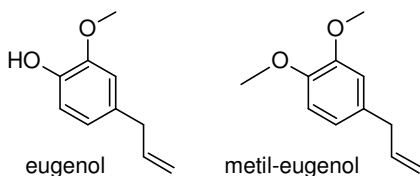


Figura 6. Principais substâncias encontradas nos óleos essenciais de plantas do gênero *Mentha*.

Em sua grande maioria, o mercado de óleos essenciais é abastecido por óleo extraído por hidrodestilação ou arraste com vapor d'água, exceto para extração do óleo essencial de laranja, o qual é realizado por expressão (prensagem) dos pericarpos (BIZZO *et al.*, 2009; SIMÕES e SPITZER, 2001; SANTOS *et al.*, 2004; SERAFINI e CASSEL, 2001). Estas técnicas são mais acessíveis, pois, necessitam de baixo investimento financeiro e técnico,

entretanto, expõem as substâncias extraídas a condições indesejadas, como alta temperatura e exposição ao ar. Entretanto, quando se deseja a extração de um produto de alta qualidade sem a presença de artefatos, ou a extração específica de substâncias com alto valor agregado, justifica-se a extração do óleo essencial por fluidos supercríticos (MAZUTTI et al., 2006; SERAFINI e CASSEL, 2001).

Logo em seguida ao processo de extração, os óleos essenciais apresentam coloração clara e translúcida que aos poucos pode variar do amarelo claro ao castanho, ou apresentar coloração azul, como é o caso do óleo essencial de camomila (*Chammomila officinalis*) e de mil-folhas (*Achillea millefolium*) que possui o azuleno, responsável pela cor característica (STANGARLIN et al., 1999; SIMÕES e SPITZER, 2001; SERAFINI e CASSEL, 2001).

A análise de rotina utilizada mais para verificar o perfil químico do óleo essencial é a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), o qual permite separar, identificar e quantificar cada componente presente na amostra (SERAFINI e CASSEL, 2001; FALKENBERG et al., 2001).

O cuidado com a qualidade do óleo essencial é de extrema importância, pois muitos deles podem conter produtos indesejáveis, como a pulegona e mentofurano que são tóxicas e diminuem o valor do óleo essencial de hortelã (BURBOTT e LOOMIS, 1967; CLARK e MENARY, 1980, WILDUNG e CROTEAU, 2005). Cabe ressaltar que muitos produtos obtidos do óleo essencial são matéria prima para confecção de remédios ou fitoterápicos, por isso, deve-se ter seriedade quanto a qualidade química do produto.

Os meios para se evitar a perda de qualidade do óleo essencial se iniciam desde os cuidados durante a colheita, bem como o armazenamento do material vegetal e do óleo essencial após a extração (BLANK et al., 2007). Durante o processo de extração reações de isomerização e oxidação podem ocorrer, diminuindo a qualidade do óleo essencial. Deste modo, deve-se evitar expor o óleo essencial a luz direta, temperaturas elevadas e contato com o ar (KAROUSOU et al., 1998; GUIMARÃES et al., 2008).

2.3.1 Biogênese de óleos essenciais

O aminoácido aromático fenilalanina, substância formada na via do chiquimato/aragonato, é intermediário de diferentes vias metabólicas, dentre elas, a de aminoácidos aromáticos, a síntese de proteínas e de fenilpropanoides (STRAK, 1997; TOBIN, 2005; FERRER, 2008).

A via chiquimato/aragonato ocorre nos plastídeos, principalmente no proplastídeo, produzindo a fenilalanina, a qual é transportada ao citossol e utilizada na síntese de proteínas, em reações de transaminação, ou enviados para a síntese de fenilpropanoides, no retículo endoplasmático (GUIMARÃES et al., 2008; DIXON e PAIVA, 1995; BIGGS et al., 1991; PICHERSKY et al., 2005).

Várias enzimas envolvidas com a biossíntese de fenilpropanoides, como a fenilalanina amônia-liase, a chalcona sintase, a glicosil transferase e a *trans*-cinamato-4-monooxigenase foram descritas como solúveis no citossol, contudo, existem evidências (constatadas por imunolocalização) mostrando a associação destas enzimas com estruturas de membrana do retículo endoplasmático (BOUDET, 2007; FERRER, 2008; DIXON e PAIVA, 1995; KUTCHAN, 2005; ACHNINE et al., 2004; WAGNER e HRAZDINA, 1984). Estes relatos permitem identificar esta organela como o principal local de produção de fenilpropanóides e, por intermédio do transporte de vesículas endereçadas, seria o vacúolo o local de estocagem.

A eritrose-4-fosfato (E4P, **1**) e o fosfoenolpiruvato (PEP, **2**) são os substratos iniciais utilizados na via chiquimato/aragonato e disponibilizados pela via oxidativa das pentoses fosfato plastidial, que é abastecida com carboidratos proveniente de células fotossinteticamente ativas (Figura 7) (SANGWAN et al., 2001).

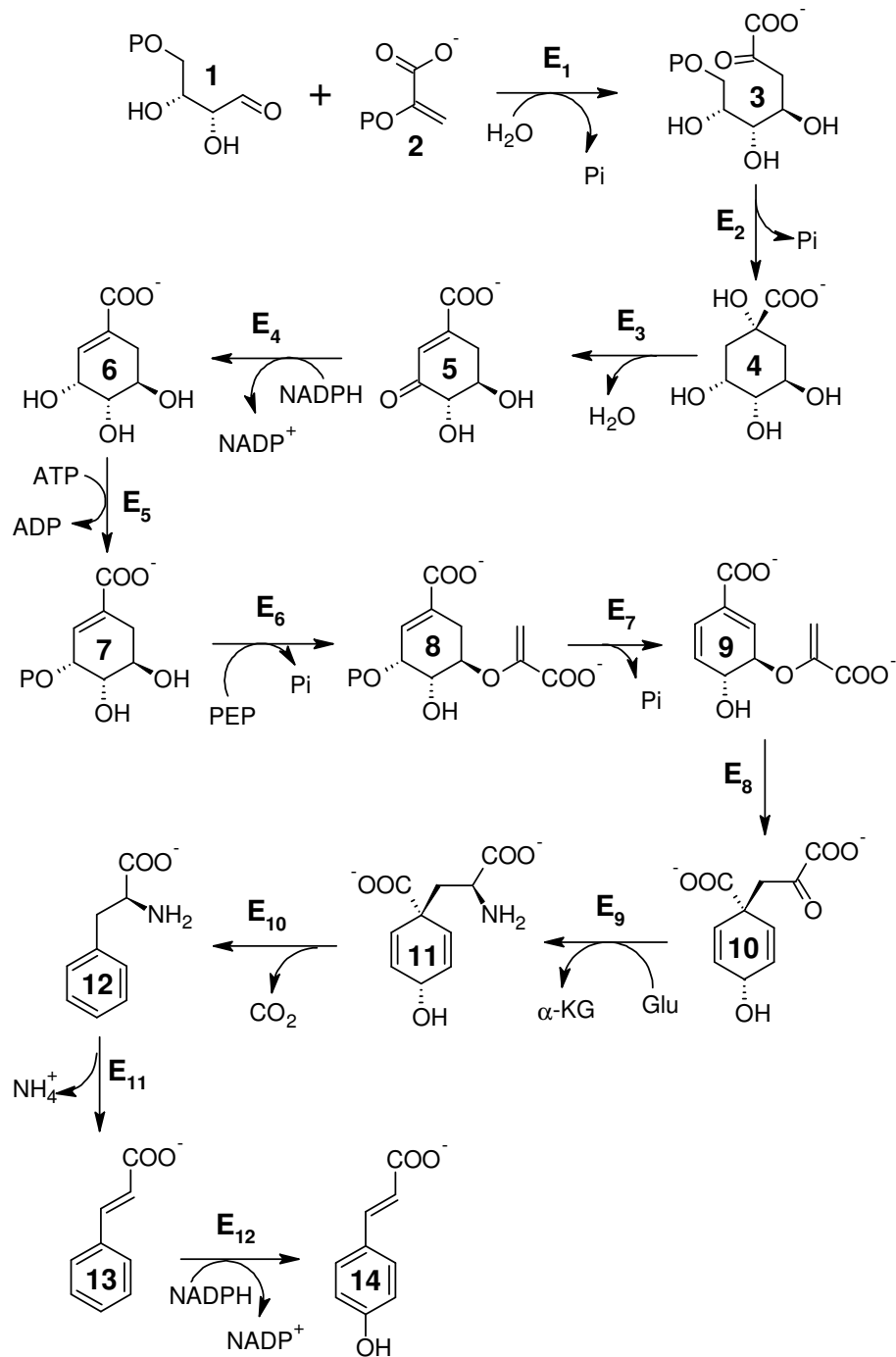


Figura 7. Via chiquimato/aragonato: eritrose-4-fosfato (1), fosfoenolpítuvato (PEP, 2), 2-Desidro-3-desoxi-D-arabino-heptanoato 7-fosfato (DAHP, 3), 3-desidroquinato (4), 3-desidrochiquimato (5), chiquimato (6), chiquimato-3-fosfato (7), 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato (EPSP, 8), corismato (9), prefenato (10), L-aragonato (11), L-fenilalanina (12), (*E*)-cinamato (13) e 4-cumarato (14). DAHP sintase (E₁), 3-desidroquinato sintase (E₂), 3-desidroquinato desidratase (E₃), chiquimato-3-desidrogenase (E₄), chiquimato quinase (E₅), EPSP sintase (E₆), corismato sintase (E₇), corismato mutase (E₈), prefenato aminotransferase (E₉), aragonato desidratase (E₁₀), fenilalanina amonialiase (E₁₁) e cinamato-4-hidroxilase (E₁₂). Adaptado de BOUDET (2007); STRAK (1997); KANEHISA *et al* (2008).

O primeiro produto da reação entre E4P (1) e PEP (2) é o 2-desidro-3-desoxi-D-arabino-heptanoato (3), que após sucessivas reações, incluindo reações de oxiredução dependentes de NADPH, produzirá o ácido chiquímico (6), o principal intermediário da via e que dá o nome a rota metabólica (SIMÕES e SPITZER, 2001). Em seguida, o chiquimato, sofre sucessivas reações, entre elas, reações de fosforilação envolvendo ATP (adenosina trifosfato), transaminação, descaboxilação, desaminação e oxiredução envolvendo NADPH, até a formação do produto final, o ácido *para*-cumárico (14) (BOUDET, 2007, STRAK, 1997; FERRER *et al.*, 2008; KUTCHAN, 2005). As diferentes classes de fenilpropanoides são formados a partir de cumarato e cinamato, através de reações de conjugação, alongamento, redução, oxidação e ciclização (Figura 8).

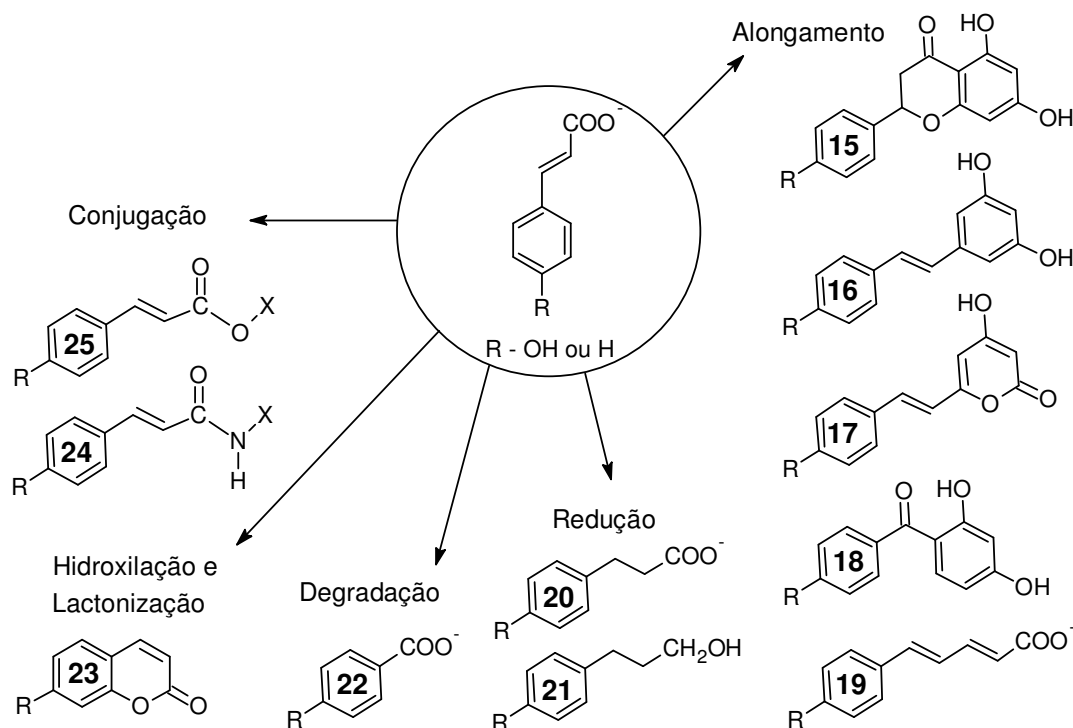


Figura 8. Diferentes reações químicas para a síntese de fenilpropanoides a partir de (E)-cinamato ou 4-cumarato (representado no centro). Alongamento da cadeia lateral: flavonóides (15), estilbenos (16), estililpironas (17), benzofenonas e/ou xantonas (18) e cinamatos com cadeia alongada (19). Através da redução da cadeia lateral: diidrocinamato (20) e derivados do álcool cinamoil (21). Pela degradação da cadeia lateral: derivados de benzoatos (22). Pela hidroxilação e lactonização: derivados de cumarinas (23). Por conjugação: derivados de cinamidas (24) e derivados de ésteres de cinamatos (25). Adaptado de SIMÕES e SPITZER (2001); BOUDET, 2007; STRAK (1997); FERRER *et al.* (2008).

Contudo, deve-se ressaltar que a classe das substâncias mais abundante nos óleos essenciais de *M. arvensis* são os terpenoides, destacando-se principalmente, monoterpenos e sesquiterpenos, sendo este último encontrado em menor quantidade (SANGWAN *et al.*, 2001; RAJESWARA RAO, 1999; SIMÕES e SPITZER, 2001; SERAFINI e CASSEL, 2001).

Até o início da década de 1990 acreditava-se que os terpenoides eram sintetizados exclusivamente a partir da via do mevalonato, uma via citossólica cujo substrato inicial é o acetil-CoA, um intermediário do metabolismo de carboidratos (SIMÕES e SPITZER, 2001; BRAMLEY, 1997; LICHTENTHALER, 1999). Entretanto, em 1993, Michael Rohmer e Frieder W. Lichtenthaler em cooperação com outros grupos de pesquisa investigaram a biossíntese de isoprenóides em plastídeos (SANGWAN *et al.*, 2001; LICHTENTHALER,

1999). Os autores observaram a existência de uma rota metabólica independente da mevalônica, chamada de via de Rohmer ou via 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (DOXP), ou mais atualmente chamada de rota gliceraldeído/piruvato (Figura 9).

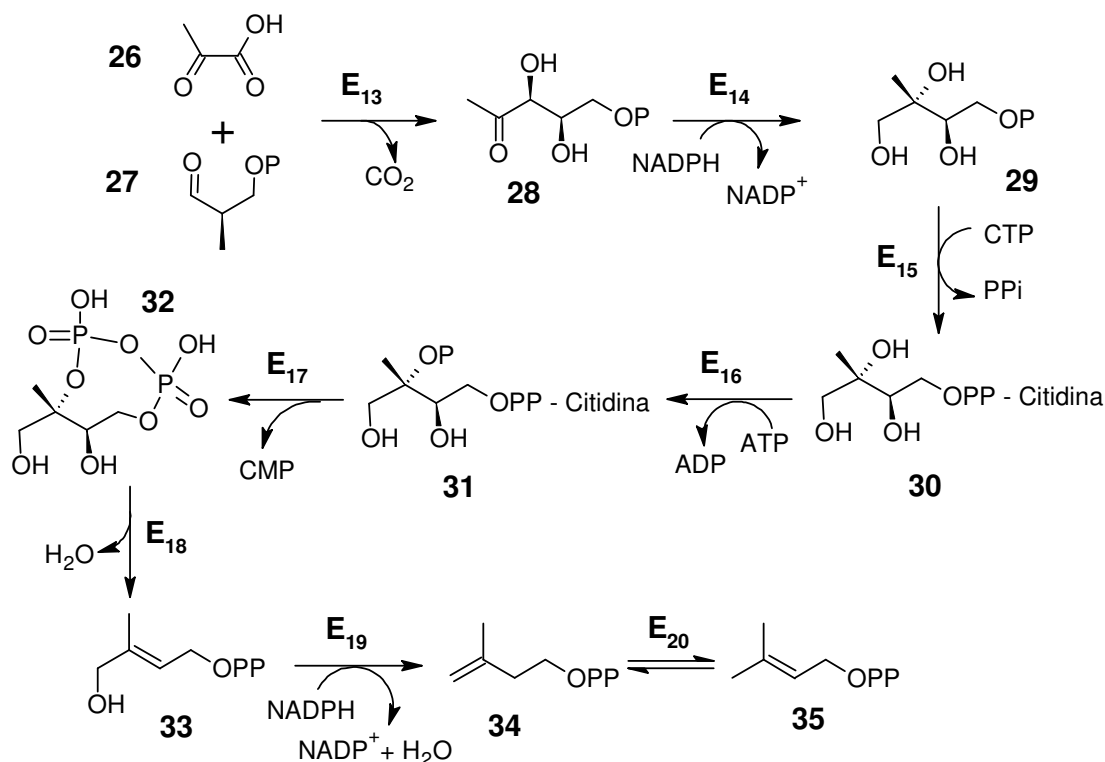


Figura 9. Via DOXP. Intermediários: piruvato (26), gliceraldeído-3-fosfato (27), 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (DOXP, 28), 2-C-metileritritol 4-fosfato (MEP, 29), 4-difosfocitidil-2-C-metileritritol (CDP-ME, 30), 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato (CDP-MEP, 31), 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclopirofosfato (MEcPP, 32), (E)-4-hidroxi-3-metil-2-butenil pirofosfato (HMB-PP, 33), isopentenilpirofosfato (IPP, 34) e dimetilalilpirofosfato (DMAP, 35). Enzimas: DOXP sintase (E13), DOXP reductoisomerase (E14), MEP citidililtransferase (E15), CDP-ME quinase (E16), MEcP sintase (E17), HMB-PP sintase (E18), HMB-PP reductase (E19), IPP isomerase (E20). Adaptado de CROTEAU *et al.* (2000); CROTEAU *et al.* (2005); KANEHISA *et al.* (2008)

Ambas as vias, plastidial (DOXP) e citossólica (mevalônica), conduzem a produção de isômeros do isopreno, isopentenilpirofosfato (IPP) e dimetilalilpirofosfato (DMAP), os quais contituem monômeros, unidade básica com cinco carbonos, que compõe as diferentes classes de terpenoides, como os hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), e assim por diante (Figura 10) (SANGWAN *et al.*, 2001; MAU e CROTEAU, 2006; GANG *et al.*, 2001).

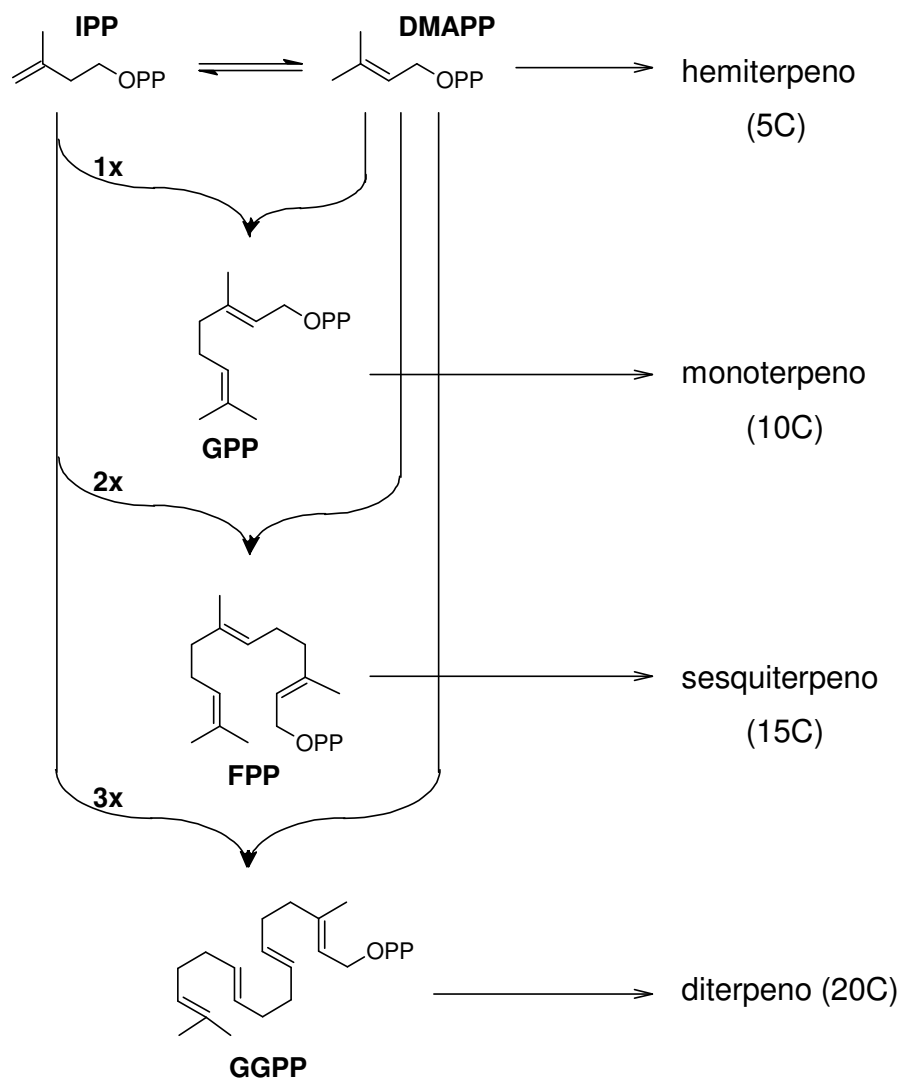


Figura 10. Ambas as vias, plastidial (DOXP) e citossólica (mevalônica), conduzem a produção de isômeros do isopreno, isopentenilpirofosfato (IPP) e dimetilalilpirofosfato (DMAP), os quais contituem monômeros, unidade básica com cinco carbonos, que compõe as diferentes classes de terpenoides, como os hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), e assim por diante. Adaptado de CROTEAU *et al.*, 2000.

Os substratos iniciais da via DOXP são o piruvato (26) e o gliceraldeído-3-fosfato (27). Assim como na via chiquimato/aragonato, a via DOXP ocorre nos plastídeos, depende de carboidratos importados de células fotossinteticamente ativas, as quais são metabolizadas na via oxidativa das pentoses-fosfato plastidial (SANGWAN *et al.*, 2001; SHANKER *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2007; TOBIN, 2005; LANGE *et al.*; 2001; Croteau *et al.*, 2000; MCCASKILL e CROTEAU, 2006; MAU e CROTEAU, 2006; GANG *et al.*, 2001).

Em algumas plantas, como em *M. arvensis*, a síntese de isoprenos a partir da via mevalônica (citossólica) é bloqueada nas células secretoras dos tricomas secretores, deste modo, a demanda de isoprenos no citossol é suprida pelo transporte de isopentenilpirofosfato proveniente dos plastídios (MCCASKILL e CROTEAU, 1995; LAULE *et al.*, 2003; EISENREICH *et al.*, 1997; LANGE, *et al.*, 2000).

Em seguida, o IPP é convertido em DMAPP, através da ação da enzima IPP isomerase, a qual está situada nos plastídios. Estes dois produtos da via DOXP são condensados em uma estrutura de dez carbonos formando o geranilpirofosfato (GPP, **36**), precursor dos monoterpenoides, entre eles, *alfa* e *beta*-pineno, sabineno, mirceno, linalool e limoneno, este último, o intermediário mais importante para a síntese do mentol (Figura 10) (CROTEAU *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2007). A condensação de uma molécula de IPP a uma de geranilpirofosfato (GPP) forma o farnesilpirofosfato (FPP) que é o intermediário para a síntese dos sesquiterpenos.

Ainda nos plastídios, a síntese do limoneno dá origem ao primeiro *para*-mentano, o qual é transportado para o retículo endoplasmático e convertido em *trans*-isopiperitenol, pela ação da enzima limoneno-3-hidroxilase (Figura 11). Em seguida, uma série de reações de oxidação dependentes de NAD(P)H ocorrem, passando pelas mitocôndrias e finalizando no citossol com a síntese do mentol (**43**) (CROTEAU *et al.*, 2005; WILDUNG e CROTEAU, 2005; KUTCHAN, 2005; MAU e CROTEAU, 2006; TURNER *et al.*, 1999; TURNER e CROTEAU, 2004).

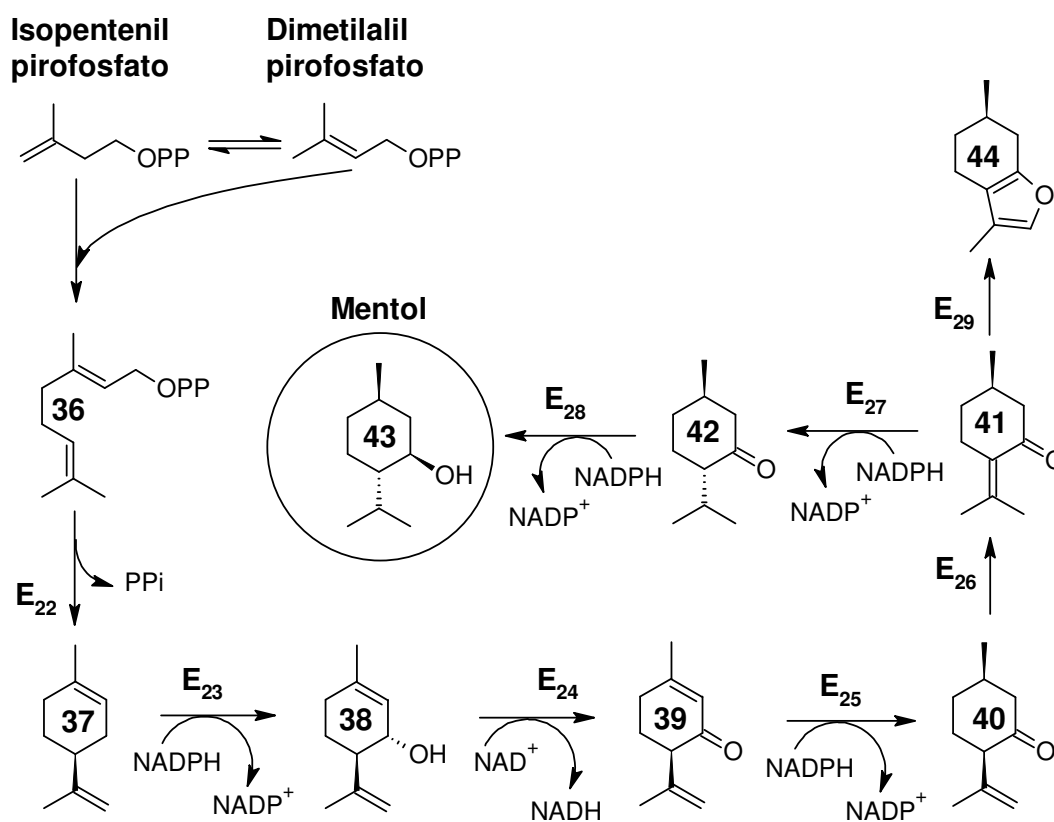


Figura 11. Via metabólica para síntese de monoterpenos. Geranil pirofosfato (**36**), (-)-limoneno (**37**), (-)-*trans*-isopiperitenol (**38**), (-)-isopiperitenona (**39**), (+)-*cis*-isopulegona (**40**), (+)-pulegona (**41**), (-)-mentona (**42**), (-)-mentol (**43**) e (+)-mentofurano (**44**). limoneno sintase (E₂₂), limoneno-3-hidroxilase (E₂₃), (-)-*trans*-isopiperitenol desidrogenase (E₂₄), (-)-isopiperitenona redutase (E₂₅), (+)-*cis*-isopulegona isomerase (E₂₆), (+)-pulegona redutase (E₂₇) e (-)-mentona redutase (E₂₈) e (+)-mentofurano sintase (E₂₉). Adaptado de CROTEAU *et al.* (2005).

Nos últimos 25 anos, o grupo de pesquisa liderado por Rodney B. Croteau estudou a síntese destes *para*-mentanos em plantas do gênero *Mentha* e confirmaram, através imunolocalização, que as enzimas relacionadas estão nos plastídios, retículo endoplasmático,

mitocôndrias e citossol (CROTEAU *et al.*, 2005; TURNER *et al.*, 1999; TURNER e CROTEAU, 2004).

2.3.2 Estrutura secretora

As plantas de *M. arvensis* secretam substâncias voláteis por meio de estruturas especializadas, chamadas de tricomas secretores ou glandulares, que são responsáveis pela estocagem e concomitante liberação desse conteúdo para o meio ambiente (SHARMA *et al.*, 2003; SHANKER *et al.*, 1999; GERSHENZON *et al.*, 1992; CUTER, 1986).

Nas plantas do gênero *Mentha* são encontrados dois tipos de tricomas secretores. O mais importante, quanto a produção é, chamado de tricoma secretor peltado (TSP) (Figura 12) e o outro de tricoma secretor capitado (TSC) (SHARMA *et al.*, 2003; GERSHENZON *et al.*, 1992; CUTER, 1986; DESCHAMPS *et al.*, 2006; MARTINS, 2002).

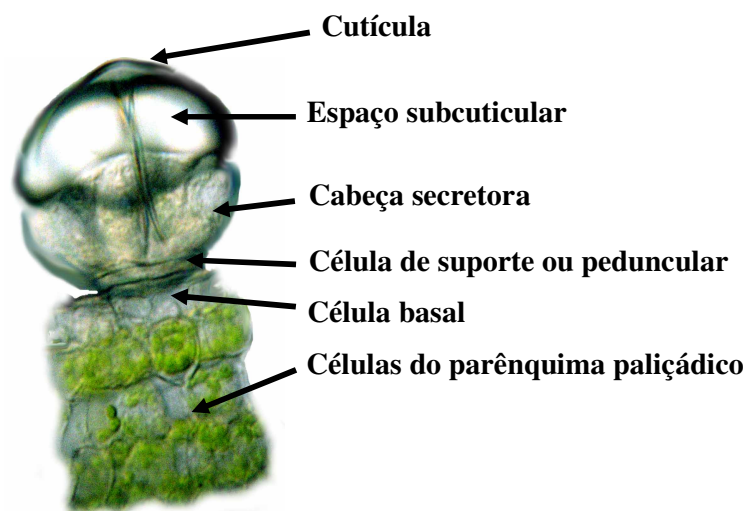


Figura 12. Tricoma secretor peltado. Localizado nos caules em estágio 1º, nas estruturas reprodutoras e principalmente na epiderme das folhas. O tricoma é constituída de uma célula basal, uma célula de suporte ou peduncular, com intensa deposição de lignina e/ou suberina nas laterais e a cabeça secretora ou disco secretor composto por oito células secretoras dispostas radialmente. Um espaço subcuticular é formado pela secreção de produtos voláteis, principalmente terpenos, o qual é contido por uma camada delgada de cutícula. Logo abaixo da epiderme se encontram as células do parênquima paliádico, fonte de fotoassimilado para as células do TSP (imagem obtida por microscopia de luz e editado no programa *Adobe Photoshop 6.0*)

Os TSC possuem menor capacidade de estocagem e secreção do que os TSP (SHARMA *et al.*, 2003; SHANKER *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 1999). Todavia, alguns autores, observaram que em plantas de *Mentha piperita* somente os TSP apresentavam secreção de monoterpenos (BRUN *et al.*, 1991).

Na espécie *M. piperita* são encontrados por volta de 8.000 TSP por folha (CROTEAU *et al.*, 2005), em plantas de *M. arvensis* a ocorrência de tricomas secretores totais (TSP + TSC) pode chegar a 10.000 por folha, sendo que esta concentração pode variar em função das condições de cultivo (SHANKER *et al.*, 1999).

A relação entre os TSP e o TSC também varia em função da espécie, nas plantas de *M. arvensis* a concentração de TSP é quatro vezes maior do que os TSC (SHANKER *et al.*, 1999), ao contrário, em *M. piperita* e *M. spicata* a concentração de TSC é superior (BRUN *et al.*, 1991, TURNER *et al.*, 2000b).

Os tricomas secretores encontram-se em ambas as faces da lamina foliar, são constituídos por uma célula basal, um pedúnculo unicelular, uma cabeça composta por uma célula secretora (TSC) ou oito células secretoras (TSP) revestidas por cutícula delgada. Além disso, as paredes laterais das células do pedúnculo são mais espessas e impregnadas por substâncias lipofílicas (Figura 12) (SHARMA *et al.*, 2003; SHANKER *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 1999; TURNER e CROTEAU, 2004; GERSHENZON *et al.*, 1992; BRUN *et al.*, 1991, TURNER *et al.*, 2000a; 2000b).

As células secretoras do TSP possuem diferentes características morfológicas, principalmente com relação as fases de desenvolvimento, apresentando uma complexa e rara associação entre organelas e estruturas celulares (SHARMA *et al.*, 2003; SHANKER *et al.*, 1999; TURNER e CROTEAU, 2004; TURNER *et al.*, 2000a).

Durante a fase que antecede secreção dos óleos essenciais, as células secretoras são muito similares as meristemáticas, pois, possuem proplastídeos, vacúolos pequenos e um núcleo extenso (SHARMA *et al.*, 2003; TURNER e CROTEAU, 2004; CUTER, 1986; TURNER *et al.*, 2000a), por outro lado, durante a fase de secreção, as células secretoras se encontram maduras, com alguns leucoplastos e um retículo endoplasmático liso bastante extenso (SHARMA *et al.*, 2003; TURNER e CROTEAU, 2004; TURNER *et al.*, 2000a).

A fase de secreção tem início na separação da cutícula que envolve a parede celular das células secretoras, até o enchimento total do espaço subcuticular com as substâncias voláteis (SHARMA *et al.*, 2003; TURNER e CROTEAU, 2004; TURNER *et al.*, 2000a; 2000b). O completo desenvolvimento do TSP é um processo muito rápido, aproximadamente 60 horas, sendo 30 horas para o período que antecede a secreção e 30 horas para o completo enchimento do espaço subcuticular (TURNER *et al.*, 2000a).

Na fase de maior produção e secreção dos óleos essenciais, ocorre uma sutil interação entre as membranas que formam o retículo endoplasmático liso, as membranas que envolvem os plastídeos e a membrana plasmática, sugerindo que estas estruturas estão envolvidas no processo de transporte e enchimento do compartimento subcuticular (CROTEAU *et al.*, 2005; KUTCHAN, 2005; TURNER *et al.*, 2000b).

É provável que para o transporte das substâncias químicas do óleo essencial entre os compartimentos subcelulares (plastídio, mitocôndria e retículo endoplasmático) e a eventual secreção, contra um gradiente de concentração no espaço de estocagem (espaço subcuticular), seja necessário a presença de proteínas especializadas (Figura 13) (TURNER *et al.*, 2000b; GANG *et al.*, 2001; DUDAREVA *et al.*, 2004).

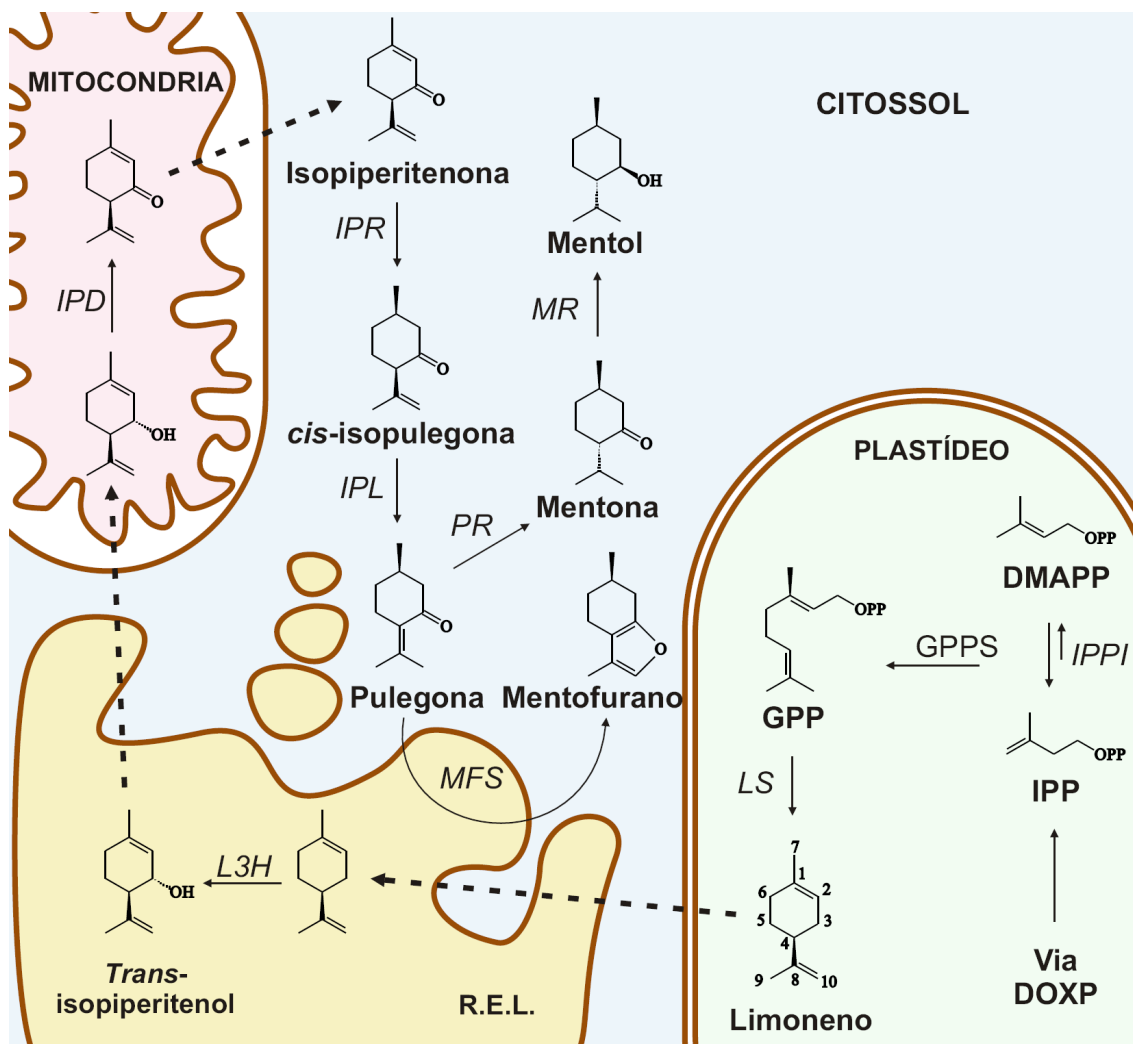


Figura 13. Compartimentos envolvidos na biossíntese de monoterpênicos em plantas de *Mentha arvensis* (R.E.L. – retículo endoplasmático liso). Geranylpirofosfato sintase (GPPS), limoneno sintase (LS), limoneno-3-hidroxilase/NADPH (L3OH), (-)-*trans*-isopiperitenol desidrogenase/NAD⁺ (IPD), (-)-isopiperitenona redutase/NADPH (IPR), (+)-*cis*-isopulegona isomerase (IPL), (+)-pulegona redutase/NADPH (PR), (-)-mentona redutase/NADPH (MR) e mentofurano sintase (MFS).

2.3.3 Aspectos ecológicos

Segundo PICHERSKY *et al.* (2006) os produtos voláteis assumem múltiplas funções para as plantas, mas, podem estar envolvidos, principalmente, com interações ecológicas espécie-específico.

As substâncias voláteis secretadas pelas plantas podem servir como atrativo aos polinizadores ou proteger as plantas intimidando os herbívoros e atraindo os inimigos dos herbívoros, considerando que o produto natural emitido das partes vegetativas, são produzidos e liberados após a herbivoria (PICHERSKY e GERSHENZON, 2002).

Um exemplo muito interessante da relação entre as plantas e os insetos foi mostrado por REINHARD *et al.* (2004) que demonstrou a habilidade das abelhas produtoras de mel em serem atraídas e guiadas por fragrâncias específicas secretadas por flores. Entretanto, nas mesmas essências florais podem existir substâncias antimicrobianas ou antiherbivoria,

produzidas especificamente para proteger os órgãos sexuais das plantas (DeMORAES *et al.*, 2001).

Com relação as propriedades ecológicas específica dos fenilpropanos e seus derivados, muitos trabalhos tem indicado que sua principal função como elemento tóxico é a defesa contra a herbivoria (GANG *et al.*, 2001; ADAMS e WEIDENBORNER, 1996; SANGWAN *et al.*, 1990).

Contudo, a ação dos terpenóides pode estar relacionado a outros eventos além da interação inseto-planta citada por GOTILIEB (1987). Trabalhos tem mostrado que a produção de isoprenos está relacionado com a proteção do sistema fotossintético aos efeitos danosos de espécies reativas de oxigênio (LORETO *et al.*, 2004; LORETO e VELIKOVA, 2001) e ao aumento da tolerância da fotossíntese a altas temperaturas (SHARKEY *et al.*, 2001).

Todavia, é fato que tanto a herbivoria, quanto a temperatura elevada promovem o aumento na atividade de espécies reativas de oxigênio sobre o metabolismo, tornando, provavelmente a biossíntese de terpenos um possível aliado na proteção aos processos oxidativos internos (DURDAREVA *et al.*, 2004).

SOUZA (2006) encontrou altos níveis de óxido de piperitenona em *M. piperita*, sugerindo ser um artefato por não ser comum nessas plantas, mas, podendo estar associado ao calor excessivo ao qual as plantas foram submetidas durante o cultivo em casa de vegetação (media de 37°C durante o dia).

2.4 Integração Entre o Metabolismo de Carboidratos e o de Óleos Essenciais

As plantas são organismos autotróficos que utilizam a fotossíntese como fonte de energia para a assimilação de carbono atmosférico e síntese de carboidratos (BOWYER e LEEGOOD, 1997; HELDT, 2005). Todas as vias anabólicas têm dependência direta dos açúcares sintetizados na fotossíntese, chamada de ciclo de Calvin-Benson ou via de redução das pentose-fosfato. As treze reações enzimáticas do ciclo de Calvin ocorrem no estroma dos cloroplastos, sendo esta a rota metabólica pela qual o carbono entra no metabolismo de carboidratos (TOBIN, 2005; NELSON e COX, 2000; BOWYER e LEEGOOD, 1997; HELDT, 2005). Durante o funcionamento do ciclo de Calvin, o carbono atmosférico convertido em trioses-fosfato pode ser transportado ao citossol e redirecionado às vias catabólicas (para a geração de energia e poder redutor) ou para as vias anabólicas, envolvidas com o transporte, armazenamento e produção de macromoléculas funcionais e estruturais (NELSON e COX, 2000).

Muitas rotas anabólicas sejam elas do metabolismo primário e especial, disputam intensamente os recursos da fotossíntese, como por exemplo, a via de assimilação de nitrogênio, a síntese de ácidos graxos, isoprenos e fenilpropanoides (TOBIN, 2005; HELDT, 2005).

Estas vias ocorrem nos plastídeos e dependem da disponibilidade de intermediários do ciclo de Calvin, além de energia metabólica (ATP) e poder redutor (NADPH) (SANGWAN *et al.*, 2001; GANG *et al.*, 2001; TOBIN, 2005). Entretanto, os tricomas secretores, sobretudo as células secretoras, não são fotossinteticamente ativas, possuindo, portanto, plastídios não clorofilados, chamados de leucoplastos (SHARMA *et al.*, 2003; SHANKER *et al.*, 1999; CROTEAU *et al.*, 2005; TURNER *et al.*, 1999; TURNER e CROTEAU, 2004; GERSHENZON *et al.*, 1992; BRUN *et al.*, 1991; TURNER *et al.*, 2000a; 2000b).

Este fato sugere que a demanda por carboidratos para a síntese de substâncias que compõem os óleos essenciais, sejam supridas através do transporte de sacarose, do parênquima paliçádico (tecido clorofilado) até os tricomas secretores, conforme ilustrado na Figura 14.

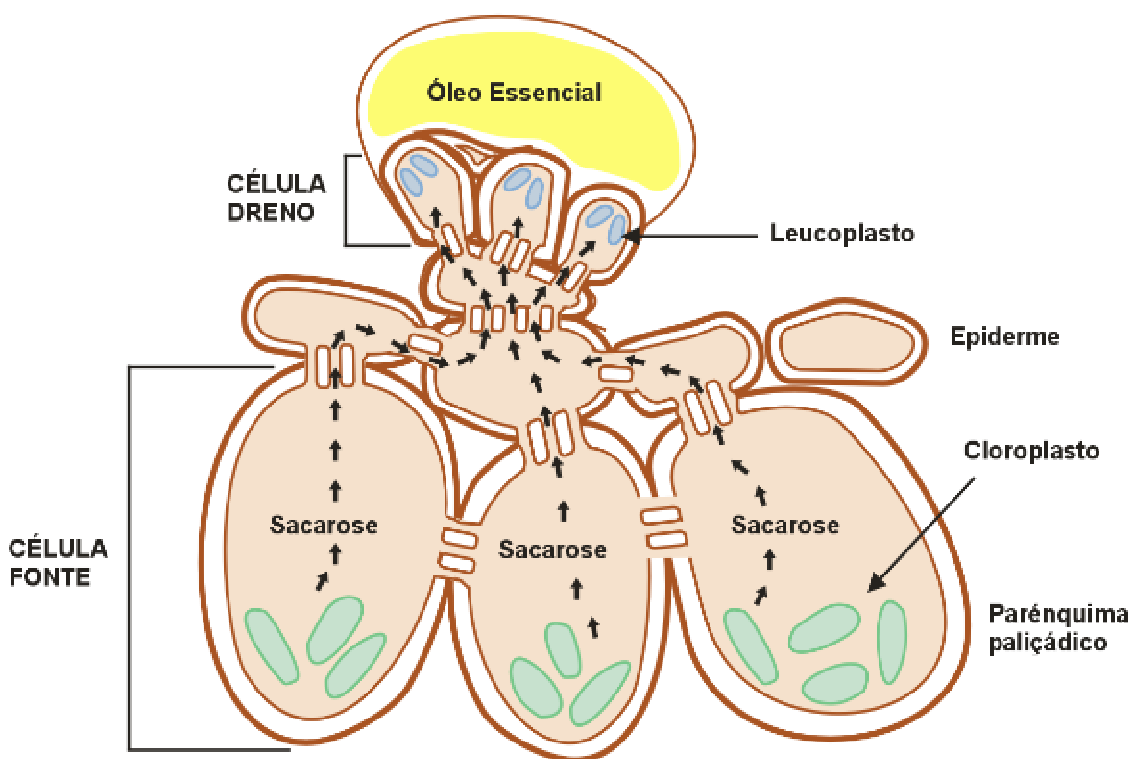


Figura 14. Transporte de fotoassimilados a partir das células do parênquima clorofilado (fonte) até as células secretoras (dreno).

O transporte de sacarose pode ocorrer através de proteínas de membrana, entretanto, evidências anatômicas sugerem que o transporte preferencial deve ocorrer por via simplásmica, através dos plasmodesmos, até as células secretoras, onde é convertida a glicose e exportada para os leucoplastos, viabilizando a biossíntese de produtos voláteis.

Na literatura são apresentadas evidências do transporte de sacarose até as células secretoras. Primeiro, foi observado a presença de um número grande de plasmodesmos interligando as células do parênquima (clorofilado), da base, do pedúnculo, até as células secretoras (SHARMA *et al.*, 2003; CUTER, 1986; TURNER *et al.*, 2000b). A presença de muitos plasmodesmos é um indicativo do intenso trânsito de nutrientes e fotoassimilados entre o parênquima e os tricomas secretores, muito semelhante ao que ocorre entre as células companheiras e o elemento crivado (THOMPSON, 1999; RUIZ-MEDRANO e XOCONOSTLE-CÁZARES, 2001; FERNANDES e SOUZA, 2004).

Uma segunda evidência foi apresentada ao se observar que as células secretoras de plantas de *Mentha piperita* L. isoladas em uma solução tampão (contendo substratos sacarose, coenzimas, ATP e NADH), continuavam a sintetizar as substâncias que compõem os óleos essenciais, sugerindo que a membrana plasmática das células secretoras realizam o transporte dos substratos, necessários a síntese destas substâncias (CROTEAU *et al.*, 2005; GERSHENZON *et al.*, 1992; GERSHENZON *et al.*, 2000). Além disso, os autores constataram que a sacarose marcada com ^{14}C tinha sido utilizada como substrato na síntese de isoprenos e monoterpenos, em células secretoras de *M. piperita* (GERSHENZON *et al.*, 1992; GERSHENZON *et al.*, 2000).

Estes trabalhos foram importantes para comprovar que a fonte de carbono para a síntese de produtos voláteis tem origem em tecidos fotossinteticamente ativos, que atuam

como a fonte de fotoassimilados (sacarose), disponibilizando os recursos excedentes para a síntese de óleos essenciais nas células secretoras dos tricomas.

Além destas evidências, existem proteínas de membrana que fazem o transporte de carboidratos para o interior dos plastídios (FISCHER e WEBER, 2002; WEBER, 2004), garantindo o suprimento de carbono e permitindo a síntese dos intermediários necessários a produção de isoprenos e fenilpropanoides.

Somando-se à necessidade de fotoassimilados, existe uma grande demanda de energia (ATP) e poder redutor (NAD(P)H) para a biossíntese destes metabólitos especiais (CROTEAU *et al.*, 2005). Como as células secretoras não fazem fotossíntese, a via oxidativa das pentoses fosfato seria uma das fontes de poder redutor para a manutenção dessas rotas anabólicas, também, ao custo de carboidratos importados de outros tecidos (TOBIN *et al.*, 2005).

A partição de fotoassimilados, entre os tecidos clorofilados e não clorofilados, é importante para a síntese de óleos essenciais, de tal forma que foi encontrado uma relação positiva entre as atividades das enzimas rubisco e glicolato-oxidase (ciclo de Calvin) com o aumento da produção de ésteres e álcoois monoterpênicos (mais reduzidos), porém, negativa quanto a produção de monoterpênicos cetônicos (mais oxidados) (SANGWAN *et al.*, 2001).

Pesquisadores utilizaram inibidores do fotossistema II (FSII) na fotossíntese, e perceberam a diminuição na produção de monoterpênicos no óleo essencial de plantas de hortelã, sugerindo que as últimas etapas para a síntese de monoterpênicos tenha sido bloqueada (MAFFEI e CODIGNOLA, 1990).

Deste modo, a disponibilidade de recursos provenientes do metabolismo primário, com destaque a fotossíntese, é um forte regulador da atividade das enzimas envolvidas com a biossíntese de óleo essencial (CLARK e MENARY, 1980).

2.5 Fatores que Afetam a Produção e Qualidade de Óleos Essenciais

Alguns trabalhos descreveram com detalhes como a produção de óleos essenciais pode ser afetada por diferentes fatores como a luminosidade, a temperatura, o fotoperíodo, seca, estresse salino, adubação, idade da planta, horário de colheita, entre outros (SANGWAN *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2003; GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Outros trabalhos demonstraram que a radiação UVB provoca efeitos sobre a densidade de tricomas secretores capitado e peltado, assim como na produção e qualidade do óleo essencial *Ocimum basilicum*. Os autores relataram, também, que a radiação atua positivamente no processo de secreção, promovendo o enchimento do espaço subcuticular, por outro lado, acelera o rompimento e perda do conteúdo por volatilização (IOANNIDIS *et al.*, 2002).

Outros autores combinaram os efeitos da luz e da temperatura sobre a produção de monoterpênicos e concluíram que estes fatores contribuem para uma condição fisiológica que provoca reflexos marcantes na qualidade e no rendimento do óleo de *M.piperita* (BURBOTT and LOOMIS, 1966).

Resultados semelhantes foram obtidos por CLARK e MENARY (1980a) após estudarem os efeitos da densidade de fótons, comprimento do dia e temperaturas diurna e noturna. Os autores confirmaram que estes fatores modulam a síntese de pulegona, mentofurano e mentol no óleo de *Mentha piperita*, ratificando os resultados encontrados por BURBOTT e LOOMIS (1966).

Foram observados também os efeitos de diferentes regimes fotoperiódicos em espécies de menta e constataram que os dias mais longos estimularam o crescimento vegetativo e que a produção de óleo essencial foi máxima sob efeito de dias curtos. Além disso, os autores perceberam variações significativas na qualidade do óleo (FAROOQI *et al.*, 1999).

Quanto ao efeito da qualidade luminosa KAROUSOU *et al.* (1998) testou a suplementação luminosa com UV-B e constatou que houve aumento no rendimento de óleos essenciais de *Mentha spicata* L., contudo, os autores não observaram variações na qualidade do óleo.

Entre os nutrientes, o nitrogênio (N) é o que mais estimula uma resposta positiva ao crescimento vegetativo. Isso se deve a um somatório de fatores fisiológicos, que interagem com o elemento e contribuem para que a planta sintetize maior massa (FERNANDES de SOUZA, 2004).

CLARK e MENARY (1980) investigaram os efeitos da irrigação e adubação nitrogenada sobre a produção e qualidade do óleo de *M. piperita* e constataram que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas na primeira colheita, contudo, foram significativos na colheita da primeira rebrota, indicando que nestas circunstâncias, tanto a irrigação como a adubação nitrogenada, afetaram a produção e qualidade do óleo essencial.

Outro elemento imprescindível ao desenvolvimento das plantas é o fósforo (P). A disponibilidade e o movimento deste nutriente no solo é lento, portanto, sua presença influencia diretamente o desenvolvimento das plantas, principalmente a parte aérea. O P faz parte de estruturas químicas importantes para as plantas (DNA, RNA e moléculas intermediárias do metabolismo especial) e sua presença está relacionada com a disponibilidade de energia química.

O desenvolvimento de plantas de *M. piperita* foi avaliado sob efeito da interação de P e N na solução nutritiva e verificou que nos tratamentos com maior concentração N e P houve maior produção de massa fresca, porém, menor rendimento de óleo essencial. Neste trabalho os autores constataram uma correlação negativa entre produção de massa e a de óleo essencial (SOUZA *et al.*, 2007).

Os efeitos da omissão de fósforo sobre a absorção de nitrogênio em plantas de *M. arvensis* foram avaliados por SINGH e SINGH (1968) os quais constataram que a ausência deste elemento alterou as frações solúveis nitrogenadas e conseqüentemente a produção de peptídeos. Os autores relataram que estas alterações podem causar reflexos na produção de óleos essenciais.

Foram realizados estudos com omissão dos elementos: nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio, na solução nutritiva, e os resultados mostraram redução significativa na produção de massa verde e alterações nas proporções de limoneno, mentona, mentol e acetato de mentila, no óleo essencial de *M. arvensis* (MAIA, 1998).

2.6 Produção de Plantas Aromáticas em Sistema Hidropônico

Cerca de 250 mil espécies vegetais são fontes de substâncias com potencial de utilização para a população mundial, entretanto, apenas algumas centenas são de uso corrente, e praticamente são inexistentes os estudos de sustentabilidade da sua exploração (NEVES, 2001). Por isso, torna-se necessário desenvolver sistemas alternativos para a produção de plantas medicinais, de forma a minimizar os efeitos da exploração dos recursos *in natura*, e também, para controlar as variáveis que interferem no rendimento do princípio ativo de interesse, diminuir custos de produção e produzir um material de qualidade.

O sistema hidropônico consiste no cultivo de plantas em uma solução nutritiva contendo os elementos essenciais à sobrevivência das mesmas (BUCHER *et al.*, 2002; TEIXEIRA, 1996).

Atualmente, diferentes hortaliças são produzidas em hidroponia e têm sido comprovados os benefícios econômicos e mercadológicos, aos produtores (VITAL *et al.*, 2001). Utilizar a hidroponia para produzir plantas medicinais é uma ferramenta de interesse científico e comercial. Através do sistema hidropônico podem ser feitos diferentes estudos de

nutrição de plantas medicinais, inferindo com maior certeza a importância que um determinado elemento pode assumir na produção de massa ou de metabólitos especiais (FURLANI, 1999).

O cultivo hidropônico entre outras formas de cultivo, pode apresentar vantagens que o sistema tradicional (plantio no solo previamente preparado com calagem e adubação conforme recomendação para a cultura) não apresenta, como observado por OCAMPOS *et al.* (2003) ao comparar a hortelã rasteira cultivada em diferentes sistemas. Estes autores concluíram que o cultivo hidropônico foi o que apresentou maior rendimento (produção de biomassa e óleo essencial), sem alteração no teor do óleo essencial.

FERNANDES *et al.* (2004) cultivando manjerição em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido, verificaram que o sistema hidropônico apresentou a maior produtividade de massa verde, aproximadamente 44% superior aos outros dois tipos de cultivo, para ambas as espécies estudadas; entretanto, os autores constataram que não houve diferença significativa entre as formas de cultivo quanto ao rendimento e composição química dos óleos essenciais dentro da mesma espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento 1: Avaliação do Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial de *Mentha arvensis* L. Obtido por Arraste com Vapor de Água e Solventes Orgânicos

3.1.1 Material vegetal

Mudas de *M. arvensis* L., variedade IAC 701, foram obtidas junto a empresa Linax sediada no distrito industrial de Votuporanga, SP, por intermédio do professor Nilson Borlina Maia, professor do Instituto Agronômico de Campinas. Mudas de *M. arvensis arvensis* foram adquiridas no comércio varejista, na cidade do Rio de Janeiro, com origem na região de Atibaia, SP. As espécie foram propagadas na casa de vegetação do Departamento de Química (UFRRJ), submetidas à técnica de herborização, depositadas no Herbário (RBR) do Departamento de Botânica da UFRRJ e registradas sob o número (RBR)-32886 (Figura 15).

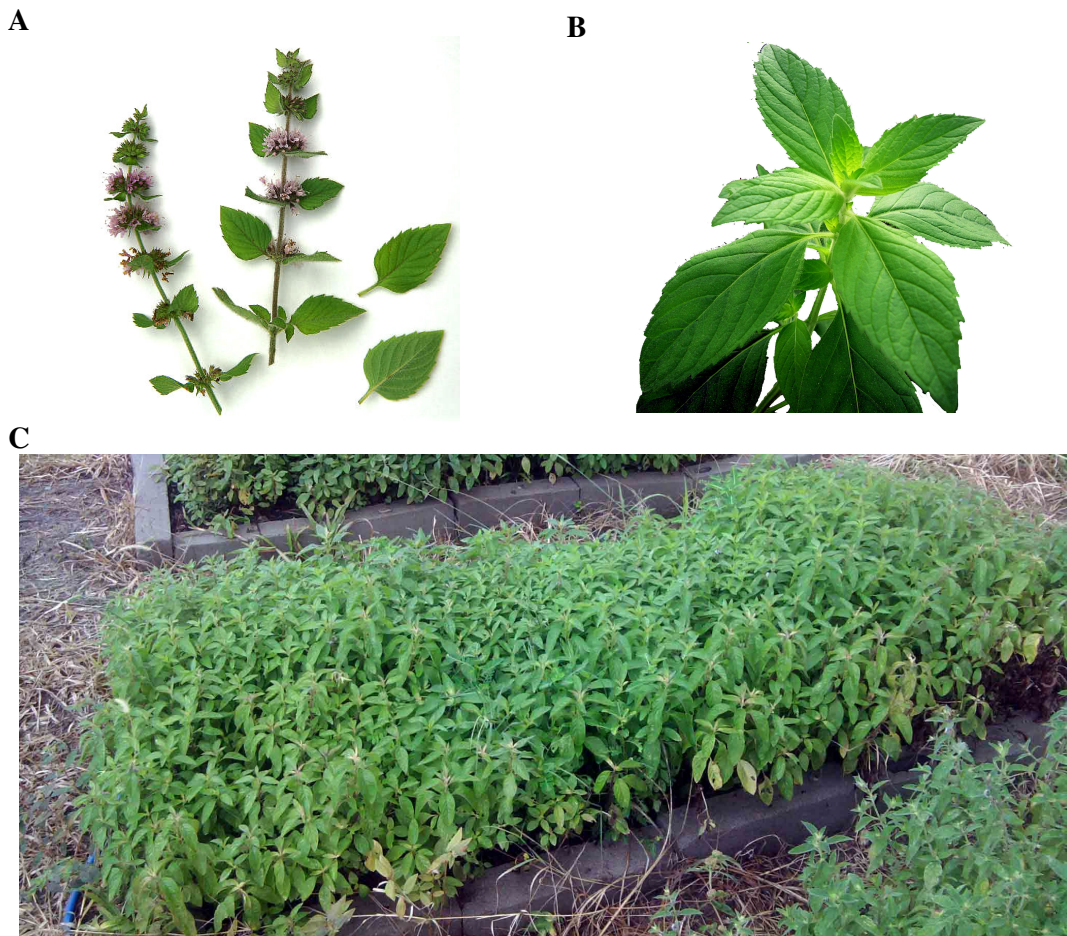


Figura 15. *Mentha arvensis* conhecida popularmente como: hortelã japonesa, menta japonesa e vique. A – Ramos no período reprodutivo, mostrando em detalhe as inflorescências (disponível em: <http://www.dkimages.com/discover/previews/829/55019156.JPG>); B – Ápice de um ramo no período vegetativo, mostrando em detalhe os primeiros cinco pares de folhas e C – matrizeiro contendo plantas com aproximadamente 45 dias de idade (imagem obtida pelo Laboratório de Bioquímica de Plantas, ICE/UFRRJ).

3.1.2 Produção de mudas

As mudas utilizadas nos experimentos foram produzidas a partir de estacas com aproximadamente 15 cm de comprimento, aproveitando-se os meristemas apicais das hastes provenientes do terço médio da parte aérea. As folhas foram cuidadosamente retiradas mantendo-se apenas os primórdios foliares e as três primeiras folhas do ápice caulinar. Em seguida as estacas foram tratadas com solução de hipoclorito 2% por 10 minutos e lavadas em água destilada em abundância, depois, foram posicionadas em suporte de isopor e com dois terços da parte inferior da estaca submersa na solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com $\frac{1}{4}$ da força iônica e aeração constante. As mudas foram produzidas em câmara de crescimento com iluminação artificial ($\pm 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de fótons fotossinteticamente ativos) por 12 horas diárias e temperatura de 25°C. Uma semana após, todas as estacas estavam enraizadas. Após duas semanas, 100% das mudas apresentavam excelente nível de padronização e estavam prontas para o plantio.

3.1.3 Confeção dos canteiros de plantas medicinais

Foram confeccionados seis canteiros com medidas de 200 x 100 cm contendo substrato comercial rico em matéria orgânica. A adubação foi realizada com NPK (15-15-20) conforme a recomendação do fabricante. Para o plantio, foram feitos sulcos com 10 cm de profundidade e 40 x 40 cm de espaçamento. Caules (estolhos e hastes) contendo estruturas propagativas foram colocados nos sulcos e cobertos com substrato. Uma camada de palha seca com 2 cm de altura foi sobreposta aos canteiros. Um sistema simples de irrigação por aspersão foi montado na área dos canteiros e acionado sempre que necessário. Para o controle da ferrugem foi necessária a aplicação do fungicida Mancozeb e para o controle de lagartas foi utilizado o inseticida Icon-Gardem (*Syngenta*), conforme orientação do fabricante.

3.1.4. Condução do Experimento

Plantas de *M. arvensis* foram cultivadas a sol pleno, em canteiro contendo substrato orgânico, adubadas com NPK (15-15-20) e conduzidas até 45 dias de idade. Plantas do centro do canteiro foram coletadas e todas as folhas (aproximadamente 80 g) separadas para extração do óleo essencial por arraste com vapor d'água. Foram retiradas, também, amostras (3g) das folhas do 4° e 5° nó para a extração de óleos essenciais com solventes orgânicos como: etanol, metanol, éter etílico, éter de petróleo, acetato de etila e diclorometano. A extração do óleo essencial utilizando solventes orgânicos ou por hidrodestilação e a análise por CG/EM foram realizadas conforme as metodologias descritas a seguir.

3.1.5 Extração do óleo essencial com solventes orgânicos

Diferentes solventes (etanol, metanol, éter etílico, éter de petróleo, acetato de etila e diclorometano) foram utilizados na extração do óleo essencial seguindo a metodologia descrita adiante. Entretanto, o diclorometano foi o solvente escolhido para a extração do óleo essencial das plantas de *Mentha arvensis*.

A metodologia utilizada consistiu na retirada de 3 g de folhas do terceiro e quarto nó, seguido pela imersão das folhas em 10 mL dos solventes, em tubo Falcon por 48 horas na geladeira (± 4 °C). Após este período as amostras foram filtradas e a fase orgânica secas com Na_2SO_4 . Por fim, as amostras dos extratos foram armazenadas no freezer a -20 °C negativos, até a análise por CG/EM.

3.1.6 Extração do óleo essencial por hidrodestilação

O óleo essencial foi extraído a partir das folhas frescas da planta (+/-100 g), através da extração por hidrodestilação por trinta minutos utilizando um aparelho de “Clevenger” modificado (Figura 16). No processo de extração o óleo essencial foi arrastado pelo vapor da água devido a sua volatilidade, depois foi condensado e recolhido. Em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido, em funil de separação, utilizando-se diclorometano (5x 25 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com Na₂SO₄ anidro, filtradas e evaporadas em rotavapor. Após evaporação do solvente, os rendimentos das extrações foram calculados com base na relação entre a massa do óleo e a massa fresca das folhas, e expresso em porcentagem (% m/m). Os óleos brutos foram armazenados em frascos de cor âmbar, sob atmosfera inerte, em freezer (-20° C) até o momento da análise.

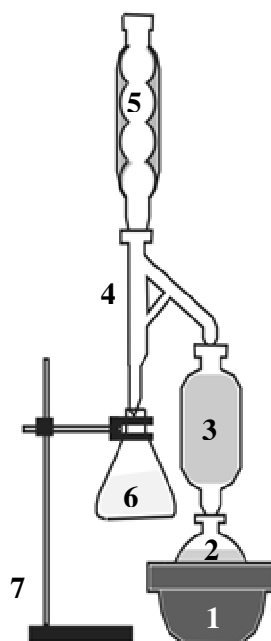


Figura 16. Montagem do sistema para hidrodestilação do óleo essencial. 1) manta aquecedora; 2) balão de fundo redondo de 2 litros; 3) Dorna ou reservatório para o material vegetal; 4) aparelho de Clevenger; 5) condensador; 6) Reservatório de 250 mL para recolhimento do hidrolato e 7) suporte.

3.1.7 Análise química do óleo essencial

A análise do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) em um sistema Hewlett Packard 5890 série I. Coluna capilar CP-Sil-8CB (5% difenil em 95% de dimetilpolisiloxano) de comprimento- 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme; gás carreador He (1mL/min), injetor no modo “split” (1:20) e integrador eletrônico HP 3396A. A programação de temperatura do forno: 50 °C (Ti) por 2 min, 50-180 °C, 5 °C/min e 180 – 280 °C, 15 °C/min, mantidos por 15 minutos a 290 °C. As temperaturas do injetor e do detector foram 230 °C e 250 °C, respectivamente. As concentrações dos componentes foram calculadas tendo como base as áreas dos picos no cromatograma, seguindo a ordem de eluição na coluna.

A análise em um cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG/EM) foi realizada em um aparelho Saturn 2000 da Varian, com o mesmo tipo de coluna capilar e nas mesmas condições de temperatura descrita acima, conectado a um detector “íon

trap” operando em modo de impacto eletrônico a 70 eV com intervalo de massa entre 40-400 μ e a razão de 0,5 scan/s. O gás carreador: He (1 ml/min); temperatura do injetor: 230 °C; temperatura da interface: 250 °C, e razão de divisão do fluxo 1:20.

Os padrões analíticos: α -terpineol, R(-)-pulegona, (-)- α -pineno, (-)-limoneno, eucaliptol, hidrato de sabineno, (-)-mentona, (+)-neomentol, mentol e (+)-mentofurano foram obtidos junto a Sigma-Aldrich do Brasil e diluídos em diclorometano, em seguida, foram injetados no cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectômetro de massa. Os componentes presentes no óleo essencial também foram injetados sob as mesmas condições dos padrões e identificados por comparação com os padrões analíticos, com o índice de retenção linear, calculado com o auxílio de uma série homóloga de n-alcenos (Sigma-Aldrich, C₈-C₄₀) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963), por comparação com os modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura (ADAMS, 1996) e por base de dados computadorizados usando biblioteca NIST (1998).

3.2 Experimento 2: Determinação da Folha Modelo Visando Análises do Metabolismo nas Plantas de *Mentha arvensis* L.

3.2.1 Material vegetal, produção de mudas e canteiros

A obtenção do material vegetal, a produção das mudas e o plantio foram realizados conforme descrito previamente nos itens 3.1.1 a 3.1.3

3.2.2 Condução do experimento

Durante a condução do experimento as plantas de *M. arvensis* foram cultivadas a sol pleno, em canteiro contendo substrato orgânico, adubadas com NPK (15-15-20) e conduzidas até 45 dias de idade. Três plantas do centro do canteiro foram coletadas, amostras em triplicata das folhas do 3°, 4° e 5° nó foram retiradas, utilizadas para a extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos e determinação da atividade da enzima nitrato redutase, conforme metodologia descrita a seguir.

3.2.3 Extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos

Para a extração e quantificação dos teores de clorofila a, clorofila b e carotenóides, duas amostras foram retiradas das folhas do 4° nó com auxílio de um furador, com área conhecida, imediatamente depois, os discos de folhas foram pesados e imersos em 10 mL de dimetilsulfóxido, em frasco com tampa, protegidos da luz e armazenado na geladeira até o dia seguinte. Em seguida, os frascos foram colocados em um banho com temperatura controlada em 64°C, por 3 horas, quando observou-se a extração de todos os pigmentos, conforme metodologia proposta por HISCOX e ISRAELSTAM (1979). Do extrato obtido, foram retiradas alíquotas de 3mL para proceder a leitura em espectrofotômetro, no modo absorvância, nos comprimentos de onda: 750 nm (turbidez), 665 nm (clorofila a), 649 nm (clorofila b) e 480 nm (carotenóides). As leituras de clorofila a, b e carotenóides são subtraídas da turbidez. Os valores obtidos foram expressos em concentração de pigmentos segundo as equações propostas por WELLBURN (1994).

3.2.4 Atividade da nitrato redutase

Para a atividade da enzima Nitrato Redutase (NR), duas amostras de 200 mg de material vegetal das partes medianas da raiz, caule e do 4º nó das folhas foram pesadas e incubadas em banho-maria a 30°C em frasco de vidro com 5 mL de tampão de fosfato pH 7,5 contendo 2 mM de KNO₃ e 3% *n*-propanol. Imediatamente após uma hora de incubação, 0,4 mL da amostra incubada foi transferida para outro tubo, no qual foram adicionados, em ordem, 0,3 mL sulfanilamida 1% em HCl 3M e 0,3 mL de N-naftil-etileno-diamino 0,02%. Após 20 minutos de repouso, adicionou-se 4 mL de água destilada, os tubos foram agitados e a leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de 540 nm. A atividade potencial da NR foi expressa com base na concentração de nitrito, o qual foi determinado com o auxílio de uma curva analítica (JAWORSKI, 1971).

3.3 Experimento 3: Efeito da Concentração de Fósforo Sobre a Produção e a Qualidade do Óleo Essencial de *Mentha arvensis* L. Cultivada por Hidroponia.

3.3.1 Material vegetal, produção de mudas

A obtenção do material vegetal, a produção das mudas e o plantio foram realizados conforme descrito previamente nos itens 3.1.1 e 3.1.2

3.3.2 Sistema hidropônico.

Para a confecção do sistema hidropônico foram utilizados potes plásticos com 1,8 L de capacidade, suporte de isopor com 2 cm de espessura, espuma sintética, temporizador analógico e alguns acessórios comumente encontrados em lojas para aquaristas, como: compressor de ar eletromagnético da marca RESUN, modelo ACO-003 com capacidade de bombear 65L de ar por minuto, mangueira flexível com abertura de 2,5mm de diâmetro, conectores de plástico, válvulas de plástico e pedra porosa. Os potes foram perfurados para a passagem da mangueira. No interior dos potes a mangueira foi conectada a pedra porosa. Na outra ponta da mangueira foi conectada uma válvula, que por sua vez, foi conectada ao compressor. A pedra porosa garante a formação de pequenas bolhas de ar que oxigenam a solução nutritiva. A intensidade da formação de bolhas depende da vazão de ar que passa pelo sistema, o qual é ajustado pela válvula. O temporizador foi programado para funcionar a cada 45 minutos por um período de 15 minutos durante todo o dia. As placas de isopor foram cortadas no formato dos potes. Dois furos foram feitos na placa de isopor para acondicionar as mudas, que por sua vez, foram fixadas ao isopor com a utilização de fitas de espumas.

3.3.3 Solução nutritiva

Foi utilizada a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), com algumas alterações nos conteúdos de P, conforme o experimento desenvolvido, ajustando sempre que possível os demais elementos químicos o mais próximo possível da concentração original. A concentração dos nutrientes nas soluções nutritivas estão discriminados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração dos nutrientes na solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) e nos tratamentos com diferentes doses de P.

Nutriente	Solução de Hoagland & Arnon (1950)	----- Tratmentos -----			
		*T1	T2	T3	T4
Macronutrientes (mM)					
N-NO ₃	14,00	15,00	15,00	15,00	15,00
N-NH ₄	1,00	-	-	-	-
P	1,00	0,05	0,50	1,00	2,00
K	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Ca	4,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Mg	2,00	2,00	2,00	2,00	2,50
S-SO ₄	2,00	2,48	2,25	2,00	2,00
Micronutrientes (µM)					
Fe	89,61	89,61	89,61	89,61	89,61
Mn	9,11	9,11	9,11	9,11	9,11
B	16,3	16,3	16,3	16,3	16,3
Zn	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76
Cu	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
Mo	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

* T1, T2, T3 e T4, respectivamente, tratamentos com 0,05; 0,5; 1 e 2 mM de P.

3.3.4 Condução do experimento

Mudas de *M. arvensis* foram cultivadas por 41 dias em sistema hidropônico, variando-se a concentração de P na solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950). As plantas foram distribuídas em 4 tratamentos, cada um composto por 4 repetições, totalizando 16 potes de 1,8 L com duas plantas cada. O sistema hidropônico foi montado sobre bancadas dentro da câmara de crescimento vegetal do laboratório de bioquímica de plantas (UFRRJ). A disposição do sistema hidropônico, dos tratamentos e dos pontos de medição da radiação fotossinteticamente ativa estão ilustrados nas Figuras 17 e 18.

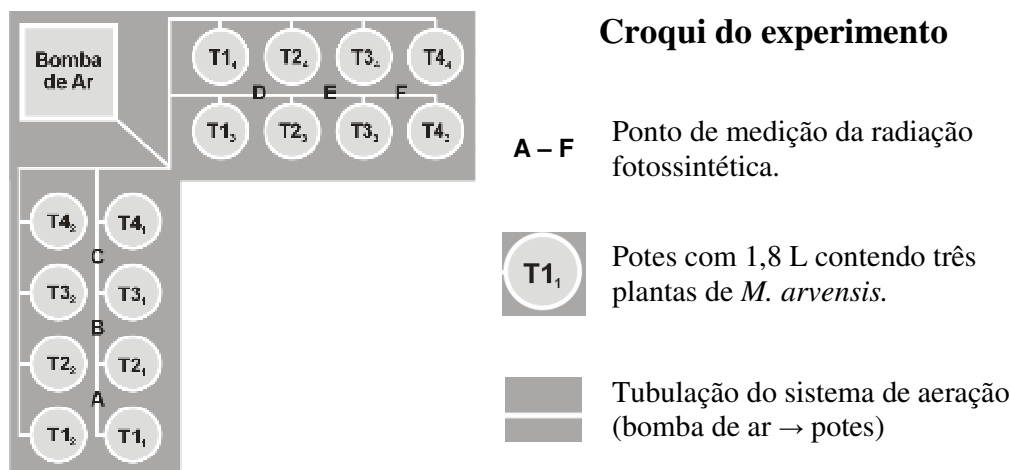


Figura 17. Posicionamento do sistema hidropônico, dos tratamentos e dos pontos de medição da luminosidade do experimento montado na câmara de crescimento vegetal. T1, T2, T3 e T4, respectivamente, tratamentos com 0,05; 0,5; 1 e 2 mM de P.

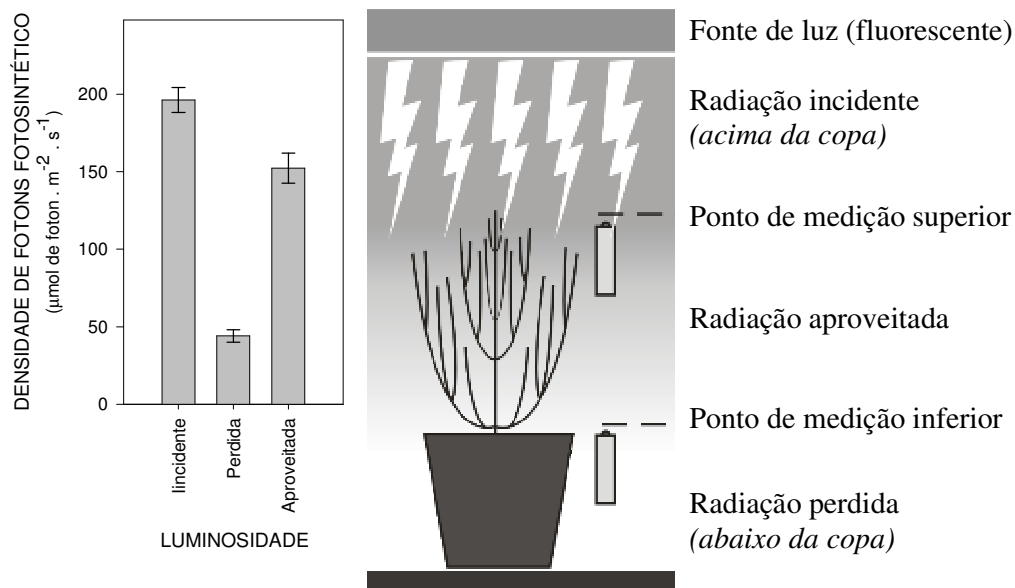


Figura 18. Descrição do método de coleta dos níveis de luminosidade e os valores obtidos aos 36 dias de cultivo.

Diariamente o nível da solução nutritiva foi acertado até 1,6 L por vaso com adição de água destilada e o pH ajustado até 5,8 utilizando solução de H₂SO₄ 0,1N ou de KOH 0,1N. Antes de qualquer intervenção na solução, os valores de pH decorrentes das alterações provocadas pela absorção de nutrientes pelas plantas, foram diariamente medidos e anotados. A cada sete dias, as soluções nutritivas correspondentes aos quatro tratamentos foram trocadas por soluções novas.

Após a colheita, as partes das plantas foram fracionadas para as análises das frações solúveis (N-nitrato, N-amônio, N-amino e açúcares solúveis) descritos a seguir, pigmentos fotossintéticos e atividades da nitrato redutase descritos previamente nos itens 3.2.3 e 3.2.4.

3.3.5 Extração e análise das frações solúveis.

Para a extração hidroalcoólica bruta 1g de material vegetal das partes medianas da raiz, caule e do 3° e 4° nó das folhas foram pesadas, imersas em 10 mL de etanol 80% em frascos com tampa e armazenados na geladeira. Em seguida, as amostras foram trituradas por 1 minuto com auxílio de um homogeneizador portátil, depois, filtradas e transferidas para funil de separação, onde depois, foi acrescentado volume igual de clorofórmio. Após uma suave agitação a mistura ficou em repouso por 40 minutos. Ao fim deste período a fase apolar foi descartada, a polar recolhida e avolumada até 50 mL com etanol 80%. O extrato foi armazenado na geladeira e utilizado para a determinação de: a) açúcares solúveis segundo a metodologia de YEMM & WILLIS (1954); b) N-amino livre pelo método da ninidrina segundo metodologia de YEMM & COCKING (1955); c) N-amônio segundo metodologia colorimétrica de FELKER (1977) e d) N-nitrato segundo a metodologia proposta por CATALDO *et al.* (1975).

3.3.6 Extração do óleo essencial com diclorometano

A extração com solvente foi utilizada porque não foi possível a obtenção de folhas suficientes para a hidrodestilação. A metodologia utilizada consistiu na retirada de 3 g de folhas da parte superior (3°, 4° e 5° nó) e inferior (6°, 7° e 8° nó), conforme Figura 19,

seguido pela imersão das folhas em 10 mL dos solventes, em tubo Falcon por 48 horas na geladeira (± 4 °C). Após este período as amostras foram filtradas e a fase orgânica secas com Na_2SO_4 . Por fim, as amostras dos extratos foram e armazenadas no freezer a -20 °C negativos, até a análise por CG/EM.

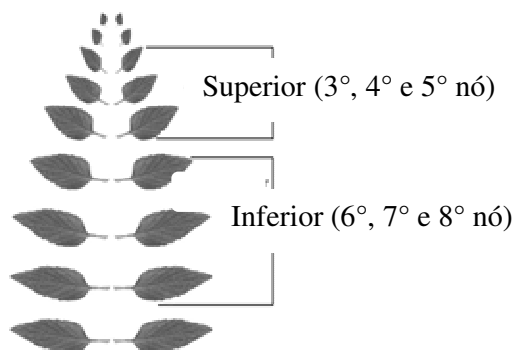


Figura 19. Esquema de separação de amostras para a extração de óleo essencial das folhas da parte superior e inferior das plantas de *M. arvensis*.

3.3.7 Análise química do óleo essencial

A metodologia utilizada na análise por CG/EM e na identificação dos componentes do óleo essencial foram semelhantes as descritas no item 3.1.7, exceto quanto a programação, que foi a seguinte: temperatura do forno de 60 °C (Ti) por 2 min, 60-110 °C, 2°C/min; 110-150 °C, 3°C/min e 150-290 °C, 15°C/min, mantidos por 15 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram 220 °C e 250 °C, respectivamente.

3.4 Experimento 4: Extração de Células Secretoras e Avaliação do Teor e do Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial das Folhas de *M. arvensis* L., com Diferentes Idades.

3.4.1 Material vegetal, produção de mudas e canteiros

A obtenção do material vegetal, a produção das mudas e o plantio foram realizados conforme descrito previamente nos itens 3.1.1 a 3.1.3.

3.4.2 Condução do experimento

Mudas de *M. arvensis* foram cultivadas até atingirem aproximadamente 45 dias de idade. Em seguida, 3,5 g de amostras de folhas do 4º e 5º nó foram separadas em quadruplicata, para a extração das células secretoras, conforme a metodologia descrita a seguir.

Para quantificação do teor e análise do perfil cromatográfico, em função da idade das folhas de *M. arvensis*, foram separadas amostras de folhas do 3º, 4º e 5º nó (superiores) e 6º, 7º e 8º nó (inferiores) em triplicata e quantidade suficiente para a extração por hidrodestilação, conforme descrito previamente no item 3.1.6 A análise do óleo essencial foi realizada conforme descrito no item 3.1.7.

3.4.3 Extração, isolamento e quantificação de células secretoras

Este procedimento visou extrair as células secretoras presentes nos tricomas secretores, localizados nas faces adaxial a abaxial das folhas, com a finalidade de se desenvolver estudos em biologia molecular. O material extraído foi filtrado em três filtros com malha de diâmetros decrescentes, de forma a concentrar as células de interesse no último filtro. A suspensão de células secretoras foi então armazenada até sua utilização no procedimento de extração do RNA total. Esta técnica foi desenvolvida por Gershenzon *et al.* (1992) e modificada para a extração de RNA total por Lange *et al.* (2000).

3.4.3.1 Extração das células secretoras

Folhas do 3° e 4° nó, totalmente expandidas, foram colhidas, das quais 3,5 g foram imersos em uma solução contendo 1 mM de ácido aurintricarboxílico, 5 mM de tiouréia e 2 mM de ditiotreitól, por uma hora a 4°C. Em seguida, as amostras de folhas foram transferidas para um reservatório com capacidade para 50 mL, no qual foram adicionados 20 g de contas de vidro com 0,5 mm de diâmetro, 3,5g da resina XAD-4 e tampão de extração contendo 25 mM de HEPES com pH 7,3; 200 mM sorbitol; 10 mM sacarose; 0,5 mM de NaH₂PO₄; 0,6% (m/v) de metilcelulose; 1% (m/v) de polivinilpirrolidona (PVP *M_r* 40.000); 1 mM ácido aurintricarboxílico; 5 mM de tioureia e 2 mM de ditiotreitól DTT. Em seguida o reservatório foi acoplado ao disruptor de células (*Bead-beater* da Biospec Product) e a potencia do motor foi ajustado com auxílio de um reostato para funcionar entre 75 e 90 volts. Em seguida o equipamento foi ligado por 15 segundos, por duas vezes, com intervalo de 15 segundos. Este procedimento foi realizado buscando-se manter a temperatura entorno de 4°C.

3.4.3.2 Isolamento das células secretoras

Depois do processo abrasivo (método de extração), todo o extrato obtido foi vertido sobre uma malha de nylon com 350 µm de porosidade, o material filtrado foi recolhido e novamente filtrado em uma malha de nylon com 100 µm de porosidade e, depois, em uma malha com 20 µm de porosidade. Para aumentar a eficiência no processo de filtragem os filtros foram rinsados com tampão de extração sem PVP e metilcelulose. O material retido na malha de 20 µm foi recolhido e transferidos para tubos, em seguida centrifugados a 10.000 gravidades, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi armazenado em N₂ líquido. Todo o procedimento foi realizado a 4°C.

3.4.3.3 Quantificação das células secretoras

Após a etapa de isolamento das células secretoras (antes da centrifugação) duas alíquotas de 10 µL de cada amostra foram pipetadas sobre uma placa de contagem de células (*Neubauer improved bright-line* da Optik Labor). A contagem foi realizada nos quadrados grandes com volume igual a 0,1 mm³. Foram realizadas 18 contagens por amostra e a média obtida foi transformada em concentração de células secretoras por mililitro de suspensão. Para efeito de contagem considerou-se apenas o agrupamento contendo 8 células secretoras em formato radial, chamado de disco ou cabeça secretora.

3.5 Experimento 5: Efeito da Luminosidade Sobre a Produção e a Qualidade do Óleo Essencial de *M. arvensis* L. Cultivada por Hidroponia.

3.5.1 Material vegetal, produção de mudas e sistema hidropônico

A obtenção do material vegetal, a produção das mudas e o plantio foram realizados conforme descrito previamente nos itens 3.1.1 e 3.1.2 O sistema hidropônico foi montado, conforme descrito anteriormente no item 3.3.2.

3.5.2 Solução nutritiva

Foi utilizada a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), com alterações nos conteúdos de N, ajustando sempre que possível os demais elementos químicos o mais próximo possível da concentração original. A concentração dos nutrientes utilizados no experimento estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração dos nutrientes na solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) e na solução adaptada para 2 mM de N-NO₃⁻ e 2mM de N-NH₄⁺.

*Nutriente	Solução de Hoagland & Arnon (1950) Macronutrientes (mM)	Solução Adaptada
N-NO ₃	14,00	2,00
N-NH ₄	1,00	2,00
P	1,00	1,00
K	6,00	6,00
Ca	4,00	5,00
Mg	2,00	2,00
S	2,00	9,50

* Micronutrientes (veja Tabela 1)

3.5.3 Controle da luminosidade

O experimento foi montado sobre quatro bancadas de madeira suspensas por estruturas de metal, dentro da casa de vegetação do Departamento de Química (UFRRJ). Três bancadas foram construídas para receber uma cobertura extra (sombrite) que permitiu a redução da luminosidade sobre os potes. A bancada sem o sombrite foi designada como tratamento com 100% de luminosidade e, as demais, designadas como tratamentos com 75, 50 e 25% de luminosidade, conforme o sombrite utilizado na bancada. Cada bancada recebeu 6 potes de plásticos totalizando 24 potes, cada um com 2 plantas. A disposição dos tratamentos e dos pontos de medição da radiação fotossinteticamente ativa estão ilustrados na Figuras 20.

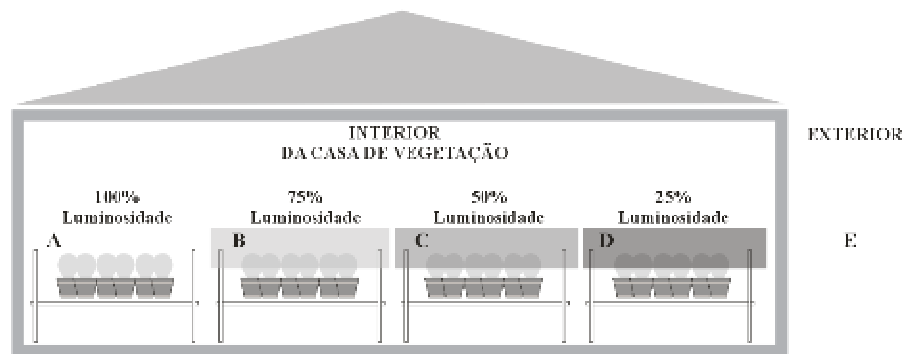


Figura 20. Posicionamento dos tratamentos e os pontos de medição da luminosidade do experimento montado na casa de vegetação.

3.5.4 Condução do experimento

As plantas de *M. arvensis* foram cultivadas por 43 dias em sistema hidropônico utilizando solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) com 2 mM de N-nitrato + 2 mM de N-amônio (Tabela 2). Diariamente o nível da solução nutritiva foi acertado até 1,6 L por vaso com adição de água destilada e o pH ajustado até 5,8 utilizando solução de H₂SO₄ 0,1N ou de KOH 0,1N. Antes de qualquer intervenção na solução, os valores de pH decorrentes das alterações provocadas pela absorção de nutrientes pelas plantas, foram diariamente medidos e anotados. A cada sete dias, as soluções nutritivas foram trocadas por soluções novas.

Após a colheita, as partes das plantas foram fracionadas para as análises das frações solúveis (item 3.3.5), pigmentos fotossintéticos (item 3.2.3), atividades da nitrato redutase (item 3.2.4), extração do óleo essencial por hidrodestilação (item 3.1.6), análise química do óleo essencial (3.1.7) e extração de células secretoras (3.4.3). As análises em material seco, obtenção do extrato protéico, atividade das enzimas da via de assimilação de N, o estado histoquímico, a contagem de tricomas por unidade de área foliar e a análise da expressão gênica por PCR em tempo real serão descritas a seguir.

3.5.5 Digestão e análises em material seco

As amostras de material vegetal das partes da planta (raiz, caule e folha) foram secas em estufa a 60°C com circulação de ar, depois, trituradas e homogeneizadas em processador. Em seguida, o material foi peneirado e duas amostras 200 mg foram retiradas e envelopadas em papel de cigarro, para a digestão sulfúrica, segundo metodologia proposta por TEDESCO (1982). O material digerido foi utilizado para quantificação de N-total e P segundo TEDESCO (1982).

3.5.6 Extrato protéico

Para a determinação da atividade das enzimas glutamina sintetase (GS), glutamato desidrogenase (GDH) e Glutamato sintase (GOGAT), duas amostras de 200 mg de material vegetal das partes medianas da raiz, caule e do 4º nó das folhas foram pesadas, identificadas e armazenadas no N₂ líquido. Em seguida, com auxílio de pistilo e almofariz, as amostras foram trituradas até a formação de um pó, ao qual foi adicionado 0,6 mL de tampão de extração contendo: de 100 mM de HEPES pH 7,5, 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, 10 mM de DTT, 1,5% (m/v) de PVPP e 30% (v/v) de glicerol. As amostras foram homogeneizadas

por mais um minuto, transferidas para microtubos, centrifugadas a 14.000 gravidades por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante armazenado no freezer a 80°C negativos. Depois, o conteúdo de proteína total solúvel presente no extrato protéico foi determinado segundo a metodologia descrita por BRADFORD (1976).

3.5.7 Atividade das enzimas glutamina sintetase, glutamato sintase e glutamato desidrogenase

Para a determinação da atividade da glutamina sintetase (GS, EC 6.3.1.2) foi utilizada a metodologia de FARDEN & ROBERTSON (1980) com algumas modificações, conforme descrito adiante. Uma alíquota de 75 µL do extrato protéico foi adicionado a 925 µL de tampão de reação contendo 50 mM de imidazol-HCL pH 7,5; 5 mM de hidroxilamina (neutralizada com Tris até pH 8), 20 mM de MgCl₂; 25 mM de L-glutamato, 5 mM de b-mercaptoetanol e 5 mM de ATP. Os tubos foram incubados a 30°C e, imediatamente após 30 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 700 µL de uma solução contendo 4% (m/v) de TCA e 3,2% (m/v) de FeCl₃ anidro preparado em HCl 0,05N. A reação controle foi conduzida sem adição de ATP ao tampão de reação. A atividade da GS foi determinada colorimetricamente em 540 nm.

Para a determinação da atividade da glutamato sintase (GOGAT, EC 1.4.7.1) foi utilizada a metodologia descrita por SCHIAVON *et al.* (2008). Com algumas modificações, conforme descrito adiante. Uma alíquota de 150 µL do extrato protéico foi adicionado a 1350 µL de o tampão de reação contendo 25 mM de Hepes pH 7,5; 2 mM de L-glutamato, 1 mM de α-cetoglutarato, 0,1 mM de NADH e 1 mM de Na₂EDTA. Iniciou-se a reação com a adição do extrato protéico, em seguida, a atividade foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de 340 nm, acompanhando a oxidação do NADH, no intervalo de 5 minutos.

Para a determinação da atividade da glutamato desidrogenase (GDH, EC 1.4.1.24) foi utilizada a metodologia descrita por TURANO *et al.* (1996). Com algumas modificações, conforme descrito adiante. Uma alíquota de 75 µL do extrato protéico foi adicionado a 1350 µL de o tampão de reação contendo 100 mM de Tris-Cl pH 8, 1 mM de CaCl₂, 50 mM de (NH₄)₂SO₄, 13 mM α-cetoglutarato e 0,25 mM de NADH (para a atividade aaminação da GDH) ou 100 mM de Tris-Cl pH 9,3; 1 mM de CaCl₂, 35 mM de L-glutamato e 0,25 mM de NAD⁺ (para a atividade desaminação da GDH). Iniciou-se a reação com a adição do extrato protéico, em seguida, a atividade foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de 340 nm, acompanhando a oxidação ou redução do NADH, no intervalo de 5 minutos.

3.5.8 Anatomia e histoquímica dos tricomas secretores em *Mentha arvensis*

A espécie utilizada, *Mentha arvensis* (IAC-701), foi cultivada durante 43 dias em um experimento na casa de vegetação do Departamento de Química (UFRRJ), conforme metodologia descrita anteriormente, o qual possibilitou o estudo anatômico e histoquímico, das folhas expandidas do terceiro e quarto nó, em microscopia de luz.

3.5.8.1 Anatomia e contagem dos tricomas secretores

O material para o estudo anatômico constou de amostras da região do terço médio da lamina foliar, das quais foram obtidas secções transversais. No preparo das lâminas semipermanentes, foram utilizadas amostras de material fresco, fixadas em FAA 70% (ácido acético, formol e álcool etílico 70%), estocadas em álcool 70% (JOHANSEN, 1940) e seccionadas com auxílio do micrótomo de Ranvier. As secções (10–12 µm) foram clarificadas

com hipoclorito sódico a 20%, neutralizadas em água acética 1%, lavadas em água destilada, coradas com mistura de azul de astra-safranina (BUKATSCH, 1972), montadas entre lamina e lamínula com glicerina a 50% (STRASBURGER, 1924) e lutadas com esmalte incolor.

Para a contagem dos tricomas, foram feitas observações em vista frontal das faces adaxial e abaxial das folhas, as quais foram diafanizadas de acordo com a técnica (FOSTER, 1949). Em seguida, as folhas foram coradas com Safranina, montadas em lâmina e lamínula utilizando glicerina 50% (STRASBURGER, 1924) e lutadas com esmalte incolor. O cálculo da densidade de tricomas secretores foi realizado contando-se 30 campos no microscópio de luz, do qual obteve-se a média aritmética equivalente a um mm² de área.

3.5.8.2 Histoquímica dos tricomas secretores

Para verificar os diferentes compostos químicos presentes nos tricomas secretores e a natureza das paredes celulares, foram utilizadas secções de material fresco, as quais foram tratadas com Sudan IV (JOHANSEN, 1940) e Sudan Black B (PEARSE, 1980) para identificar lipídeos em geral; Dicromato de potássio 10% (GABE, 1968) para detectar compostos fenólicos; Vermelho de rutênio a 0,02% para identificação de substâncias pécnicas (JENSEN, 1962); xylidine ponceau (CORTELAZZO & VIDAL 1991, AMARAL *et al.* 2001) para detecção de proteínas; Ácido periódico/Reagente de Schiff (PAS) para identificar polissacarídeos neutros (CORTELAZZO 1992, TABOGA & VILAMAIOR 2001, AMARAL *et al.* 2001). Foi aplicado tratamento controle para os testes histoquímicos de acordo com a indicação dos respectivos autores acima citados.

3.5.9. Avaliação por PCR em tempo real da expressão dos genes que codificam para as enzimas da rota de síntese do mentol.

3.5.9.1 Extração do RNA total

Todo o processo foi realizado a 4 °C com o objetivo de parar a ação das ribonucleases. A metodologia utilizou o cloreto de lítio para precipitar preferencialmente o RNA. As amostras contendo os tricomas peltados foram trituradas em 850µl de tampão de extração SDS 2%, com auxílio do grau e pistilo. Em seguida, os extratos obtidos foram transferido por pipetagem para microtubos de 2,0 mL, os quais foram incubados por 30 minutos a 60°C com agitação a cada 5 minutos. Depois, foram adicionados mais 850µL de Fenol:clorofórmio:alcool-isoamílico e os tubos agitados por 1minuto no vortex, seguido de centrifugação por 30 minutos a 20.000 gravidades e 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida por pipetagem (5x150 µL) para um novo tubo, ao qual foram adicionados 75µl de CTAB 10% + NaCl (1,4M), seguido de agitação no vortex por 30 segundos. A seguir, foram adicionados 825µl de clorofórmio:alcool-isoamílico, agitados por 1minuto no vortex e centrifugar por 30 min. a 20.000 gravidades e 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida por pipetagem (5x 145µL) para um novo tubo, ao qual adicionou-se o mesmo volume (725µL) de LiCl (6M) tratado com DEPC e deixou-se em repouso a 4°C por 16 horas, no isopor com gelo, dentro da geladeira. Após o período de repouso, as amostras foram centrifugar por 15 minutos a 20.000 gravidades e 4°C e o pellet formado foi resuspendido novamente com 1 mL de LiCl (3M) e precipitado por centrifugação a 15 minutos, 20.000 gravidades e 4°C. Na etapa seguinte o precipitado formado foi resuspendido com 250µL de água destilada DEPC,depois, foram adicionados 25µL de NaOAc (3M) tratado com DEPC + 825 µL de etanol absoluto gelado, o qual ficou no freezer -20°C por duas 48 horas. Após este período, as amostras passaram por outra centrifugação de 15 minutos a 20.000 gravidades e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado. Após outra centrifugação de 15

minutos a 20.000 gravidades e 4°C, o etanol foi descartado com auxílio de uma pipeta e a umidade foi eliminada do precipitado com auxílio de um banho seco (a 55°C). Por fim, o precipitado foi resuspendido com 10 µl de água DEPC e armazenado a -80 °C.

3.5.9.2 Quantificação do RNA total extraído

Alíquotas do RNA foram examinadas em espectrofotômetro NanoDrop ND 2000 e as razões de absorbância A260/A230 e A260/A280 foram usados para avaliar a pureza da amostra, em seguida, a concentração de RNA total foi determinada considerando que 1 unidade de absorbância a 260 nm equivale a 40 µg.mL⁻¹ de RNA, conforme instruções contidas no manual do aparelho. Após a quantificação, com o objetivo de verificar a qualidade do RNA extraído, uma alíquota do RNA total foi diluída para a concentração de 1 µg.µL⁻¹ para visualização em gel de agarose (1,5%) com brometo de etídio.

3.5.9.3 Tratamento do RNA total com DNase

Para tratamento do RNA total foi utilizado o kit *Deoxyribonuclease I, Amplification grade* da Invitrogen. Para cada 1 µg de RNA total tratado, utilizou-se 1 µL de tampão de reação (10x), 1 µL da enzima DNase I (1U.µL⁻¹) e água para o volume total de 10 µL de reação. Em seguida, as amostras foram incubadas no termociclador à 25°C por 15 minutos, depois, foi adicionado 1 µL de EDTA 25 mM (para cada 1 µg de RNA tratado), por fim, as amostras foram incubadas em termociclador a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima DNase.

3.5.9.4 Síntese de cDNA fita simples (ss cDNA)

A síntese de cDNA fita simples foi feita a partir das amostras de RNA total que foram previamente tratadas e quantificadas. Para este procedimento utilizou-se o kit de síntese de cDNA da Applied Biosystems. A reação foi realizada conforme as especificações do fabricante: 5 µL de 10xTaqMan RT buffer, 11 µL de MgCl₂ 25 mM, 10 µL de dNTPs mix, 2,5 µL de primer oligo-dT, 1 µL de RNase inhibitor, 1,25 µL da enzima MultiScribe™ reverse Transcriptase 50 U.µL⁻¹, até 11 µL de amostra de RNA tratado com DNase (máximo de 1 µg de RNA total) e água para avolumar em 50 µL. A reação foi realizada no termociclador com a seguinte programação: 25 °C por 10 minutos, 48 °C por 30 minutos e 95 °C por 5 minutos.

3.5.9.5 Construção dos iniciadores

As seqüências dos RNAs mensageiros da planta de *M. arvensis* foram obtidas no banco de dados da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Depois, com o auxílio do programa *Primer Express*® 3.0 da Applied Biosystems, foram construídos os iniciadores (primers) específicos para as seqüências do RNAs mensageiros pesquisados para a espécie *M. arvensis*. Para cada gene foram desenhados dois iniciadores: forward e reverse (Tabela 3).

Tabela 3. Relação dos genes e dos primers utilizados nas análises de expressão gênica em plantas de *M. arvensis*.

----- Gene -----		----- Primer -----
Nome	Acesso	Forward / reverse
Limoneno sintase	EF426463	F: 5'-GTTCGTTGGTCGTCCTTCGT- 3' R: 5'-CACCGAGGTTCCCAAATC- 3'
Limoneno-3-hidroxilase	EF546776	F: 5'-TGCAGAAGGATAGCCAGATCAA- 3' R: 5'-GCTGAGAACGTGTCGAAGATGA- 3'
Isopiperitenol desidrogenase	EF426465	F: 5'-AGCTACGTCCACTGCGACATC- 3' R: 5'-AGGTTGAGGCGGTCCAATC- 3'
Isopiperitenona redutase	EF426466	F: 5'-TTCGCCGAGAATCGTCAAC- 3' R: 5'-CTCCCTTTGCCCATTCGTT- 3'
Pulegona redutase	EF426467	F: 5'-CCGAAGGCGTCCACAAC- 3' R: 5'-CGACAAACCCTTGCATACGA- 3'
Mentol desidrogenase	EF426468	F: 5'-GGCTTTGTTGCCCAATGG- 3' R: 5'-GATTTAGTACAAGGACAAGGCTTCCT- 3'
Mentofurano sintase	EU108707	F: 5'-GATTCTACGCCTACATCCACCTTT- 3' R: 5'-CGAGCATGTTGGCGTCTTG- 3'
*RNA ribossomal 18S	DQ667325	F: 5'-CGGGCGTCTATCAAATGTC- 3' R: 5'-CGCATTTGCTACGTTCTTCA- 3'

*Gene constitutivo (padrão interno)

Os iniciadores construídos foram analisados pelo programa *Oligo Analyser* (software de uso livre, <http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware/>), para verificação das seguintes características dos pares de iniciadores: tamanho da seqüência, temperatura de anelamento, quantidade de nucleotídeos G e C, potencial dos iniciadores para formar estruturas secundárias (*self annelling* e *loops*). Depois de definidas as seqüências dos iniciadores, os mesmos foram alinhados para verificar se existe similaridade com outras seqüências de RNA mensageiro da planta de *M. arvensis*. Em seguida as seqüências dos iniciadores construídos foram enviadas para síntese pela empresa Invitrogen.

3.5.9.6 Pré-amplificação dos genes de interesse

Como os genes de interesse possuem baixa expressão e a quantidade de RNA na amostra é reduzida, foi proposta uma pré-amplificação utilizando o Kit de PCR da *Applied Biosystems*. A reação foi realizada conforme as especificações do fabricante: 2,5 µL de 10x *Taq* DNA Polymerase buffer, 0,75 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µL de dNTPs mix 10mM, 3,47 µL de primer mix *Forward* e *Reverse* 3,6 µM, 6 µL de amostra de cDNA, 0,25 µL da enzima *Taq* DNA Polymerase recombinat 50 U.µL⁻¹ e água para atingir 25 µL. A reação foi conduzida em termociclador com a seguinte programação: 94°C por 3 minutos, (94°C por 45 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos) x 15 ciclos e 72°C por 10 minutos para extensão final. Após a PCR, as amostras foram diluídas 1000 e 10000 vezes para os genes de interesse e o padrão interno, respectivamente.

3.5.9.7 PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, de acordo com as recomendações do fabricante: 3 µL da mistura de primers (forward + reverse); 6 µL de "SYBR® Green PCR Master Mix" e 3 µL da amostra proveniente da pré-amplificação e diluída 100x (genes de interesse) e 10000x (padrão interno). A mistura foi centrifugada na placa a 4.000 rpm por 3 minutos e levada para o aparelho de PCR em tempo real. Essa técnica permitiu analisar a expressão gênica em tempo real à medida que o gene foi amplificado. Para

a reação foram usados os iniciadores (primers) específicos para cada gene. Os produtos de PCR foram detectados com “SYBR® Green PCR Master Mix” da *Applied Biosystems*.

3.5.9.8 Cálculo da expressão relativa dos genes

Utilizando a plataforma *StepOne Software v2.1* da *Applied Biosystems*, foram obtidos os valores da C_T (*cycle threshold*) ou ciclo limite, que corresponde ao número de ciclos da PCR em tempo real no qual um sinal fluorescente é detectado, acima da fluorescência de fundo e, exatamente, na fase exponencial da reação (POLANCZYK *et al.*, 2004). Com base nos valores de C_T , relativo aos genes constitutivos e os genes alvo de estudo, e utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), foram calculados os valores de expressão dos genes entorno de um tratamento referência, ao qual é designado o valor de 100%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1: Avaliação do Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial de *Mentha arvensis* L. Obtido Por Arraste Com Vapor de Água e Solventes Orgânicos

4.1.1 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais

Entre os solventes utilizados o etanol, o metanol e o acetato de etila apresentaram perfis cromatográficos pobres em relação aos constituintes analisados, demonstrando não serem bons solventes para a extração dos componentes do óleo essencial. Ao contrario, os solventes: diclorometano, éter etílico e de petróleo apresentaram perfis cromatográficos ricos e com a presença das principais substâncias comuns no óleo essencial de *M. arvensis* (Figura 22).

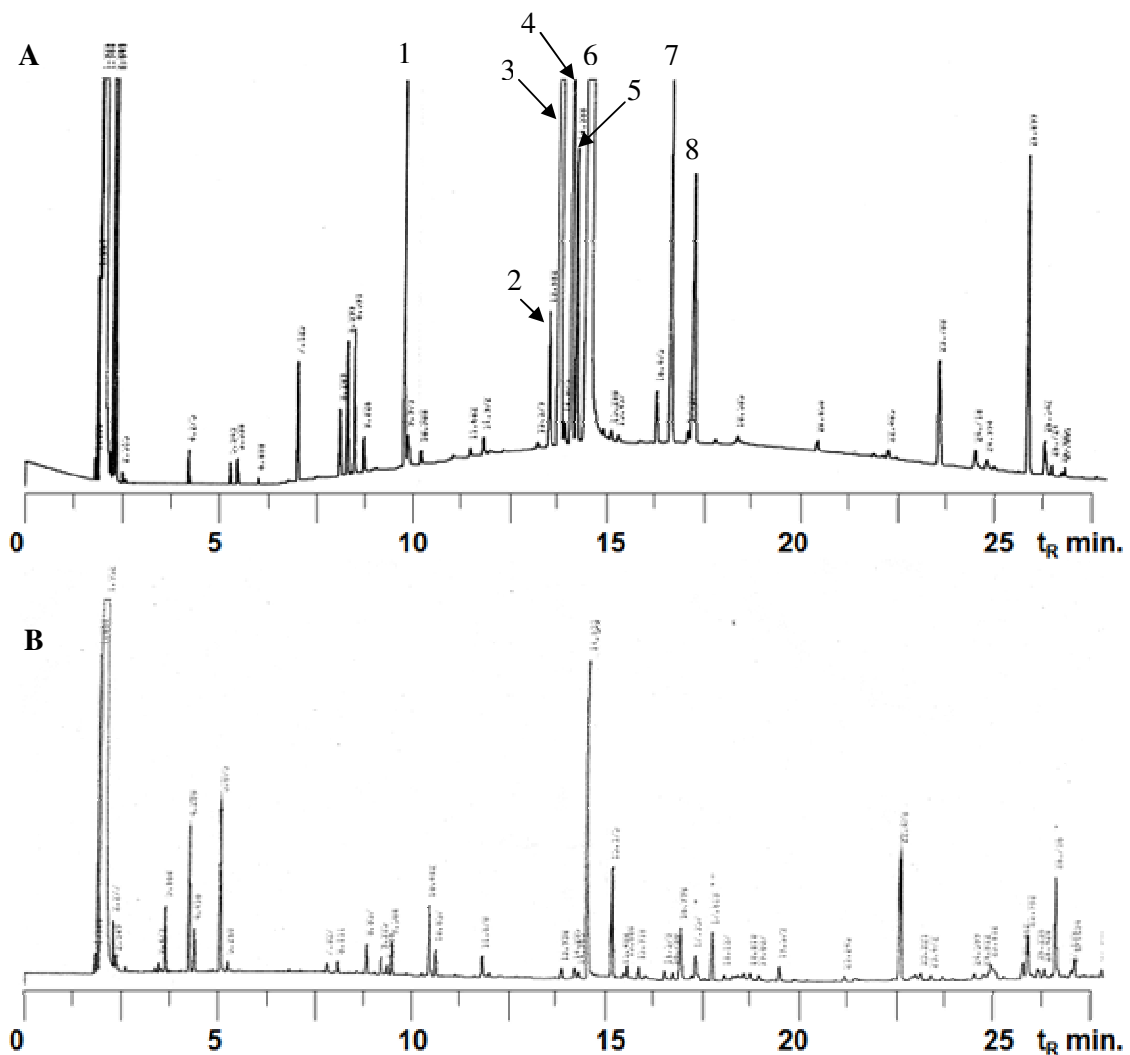


Figura 21. Cromatograma de íons totais (CG/FID) do óleo essencial extraído das folhas de *M. arvensis* utilizando o método hidrodestilação (A), utilizando o solvente diclorometano (B), éter de petróleo (C), éter etílico (D), etanol (E) e acetato de etila (F). Monoterpenos: limoneno (1), isopulegol (2), mentona (3), isomentona (4), neomentol (5), mentol (6), piperitenona (7) e acetato de mentila (8).

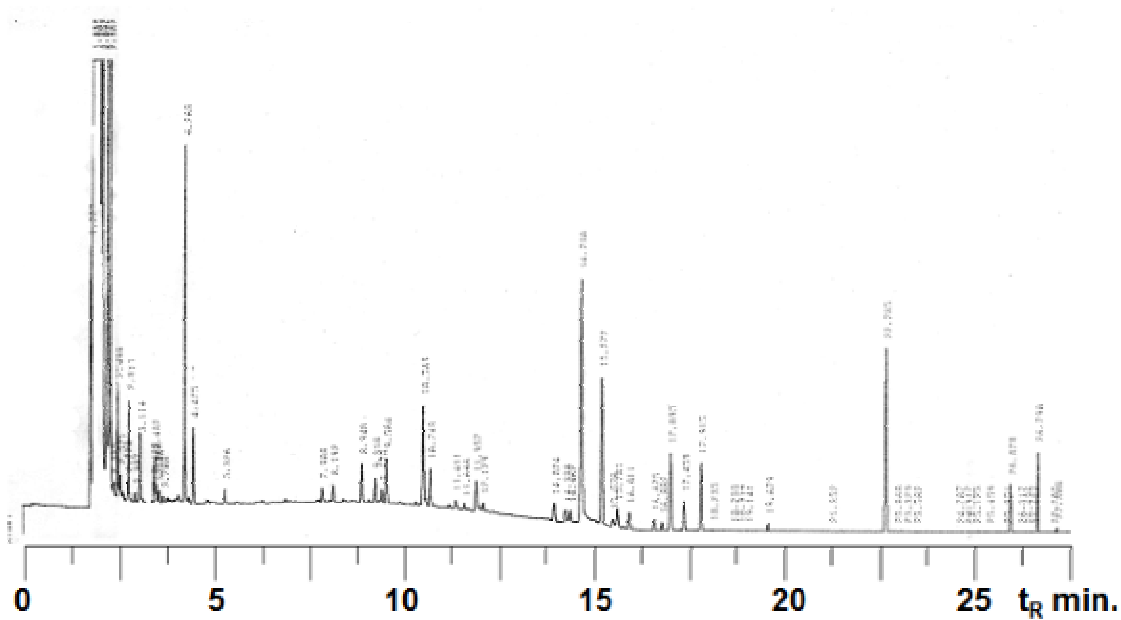
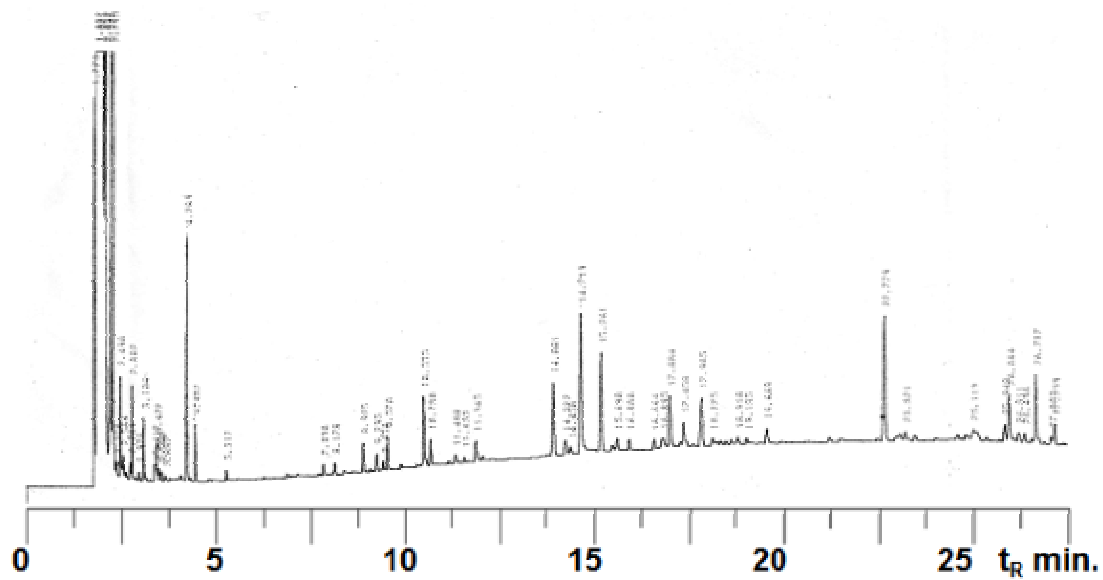


Figura 21. Continuação.

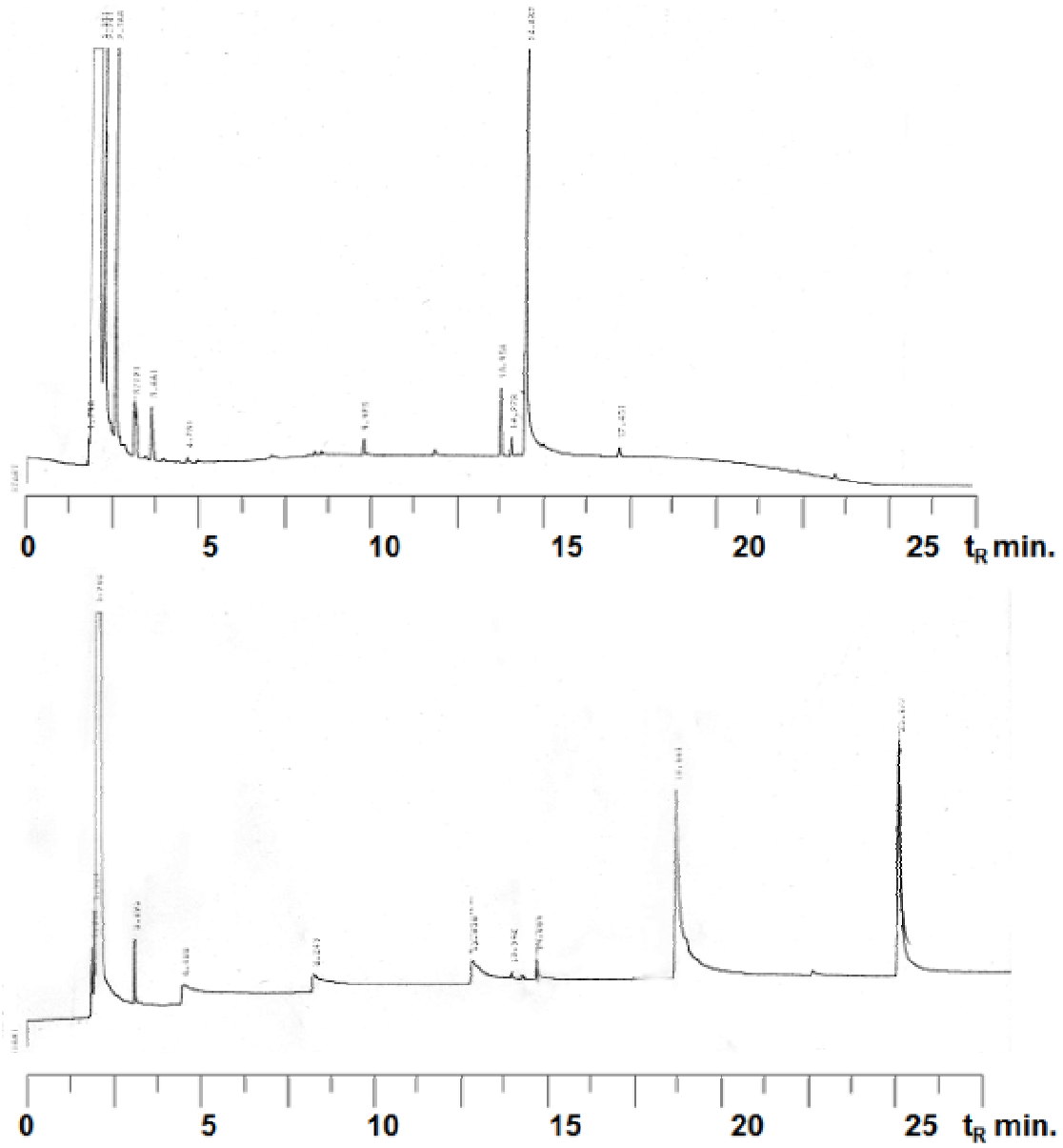


Figura 21. Continuação.

Os cromatogramas provenientes dos extratos obtidos a partir de diclorometano, éter etílico e éter de petróleo, apresentaram de forma intensa a presença de substâncias com maior massa molar e outras que normalmente não estão presentes no óleo essencial, contudo na impossibilidade de se realizar a extração por arraste com vapor de água, em função de pouca disponibilidade de material vegetal a extração com solventes é uma solução viável.

Os resultados apresentados confirmaram que a utilização de diferentes solventes orgânicos, no processo de extração dos componentes do óleo essencial, tem efeito direto no perfil e na concentração dos componentes analisados por cromatografia em fase gasosa. Um dos métodos utilizados para identificar um componente de um óleo essencial, em cromatografia em fase gasosa, é a determinação do seu índice de retenção de Kowats (KI). Este índice é determinado através da injeção de uma mistura de *n*-alcanos com tempo de retenção e ordem de eluição conhecidos juntamente com o óleo que terá seu índice calculado.

Neste trabalho, a composição química do óleo essencial da *M. arvensis* foi determinada com o auxílio do índice de retenção médio de cada componente e a comparação com os espectros de massa destes com os padrões de igual índice de retenção encontrados na literatura (ADAMS, 1995) (Tabela 4).

Tabela 4. Composição química do óleo essencial de *M. arvensis* obtido por hidrodestilação.

¹ t _R	Substância	IK	² IR	Porcentagem (%)
8,630	α -pineno	939	938	0,077
9,863	sabineno	976	979	0,063
10,055	β -pineno	980	985	0,137
10,317	mirreno	991	993	0,155
10,588	3-octanol	993	1002	0,148
11,683	limoneno	1031	1036	0,380
11,817	(Z)-ocimeno	1040	1040	0,104
12,167	(E)-ocimeno	1050	1049	0,046
12,982	cis-hidrato de sabineno	1068	1076	0,034
13,427	isoterpinoleno	1086	1090	0,022
13,744	terpinoleno	1088	1099	0,077
13,914	linalool	1098	1105	0,035
15,270	neo-isopulegol	1145	1148	0,031
15,597	isopulegol	1146	1158	0,413
15,855	mentona	1154	1166	5,822
16,135	isomentona	1164	1175	2,657
16,264	neomentol	1165	1179	1,603
16,599	mentol	1173	1190	72,659
17,682	(Z)-ocimenona	1231	1226	0,029
18,406	pulegona	1237	1250	0,050
18,771	cis-mirtanol	1252	1262	0,031
18,899	Piperitona	1252	1266	2,200
19,803	acetato de mentila	1299	1297	8,544
20,525	6-OH-carvotonacetona	1304	1322	0,009
22,649	acetato de carvacrol	1371	1397	0,174
23,198	β -elemeno	1391	1417	0,350
23,676	β -cariofileno	1433	1435	0,650
24,652	α -humuleno	1454	1472	0,292
25,317	germacreno D	1480	1497	1,346
25,707	germacreno B	1494	1512	0,189
26,206	α -farneseno	1508	1532	0,011
27,786	germacrenol	1574	1494	0,010
			Total	98,227

¹T_R, tempo de retenção (minutos). ²IR, (índice de retenção) medida relative ao *n*-alcanos (C₈-C₄₀) em coluna apolar conforme descrito no material e métodos

Em sua grande maioria, o mercado de óleos essenciais é abastecido por óleo extraído por hidrodestilação ou arraste com vapor d'água (BIZZO *et al.*, 2009; SIMÕES e SPITZER, 2001; SANTOS, *et al.*, 2004; SERAFINI e CASSEL, 2001). Estas técnicas são mais acessíveis, pois, necessitam de baixo investimento financeiro e técnico, entretanto, expõem as substâncias extraídas a condições indesejadas, como altas temperaturas e exposição ao ar, que pode levar a geração de artefatos.

Existem meios de se evitar a perda de qualidade do óleo essencial que se inicia com cuidados durante a colheita, a extração e o armazenamento do óleo essencial (BLANK *et al.*, 2007). Contudo, neste experimento buscou-se avaliar o perfil qualitativo dos óleos essenciais extraídos com diferentes solventes e por arraste com vapor d'água.

4.1.2 Análise do mentol extraído do óleo essencial de *Menta arvensis*

Após o processo de extração do óleo essencial por arraste com vapor d'água, o hidrolato obtido foi resfriado a 4 °C, em seguida observou-se a turvação da solução e a formação de uma massa, a qual foi separada cuidadosamente. Esse material apresentava forte aroma semelhante ao do mentol, formando cristais translúcidos após a secagem. A análise CG/EM desse material gerou o espectro de massa com picos de m/z: 138, 123, 109, 95, 81 (100%), 55 e 43, que estão de acordo com os espectros de massa para a molécula do mentol (ADAMS, 1996) e o padrão analítico injetado nas mesmas condições (Figura 22 e 23).

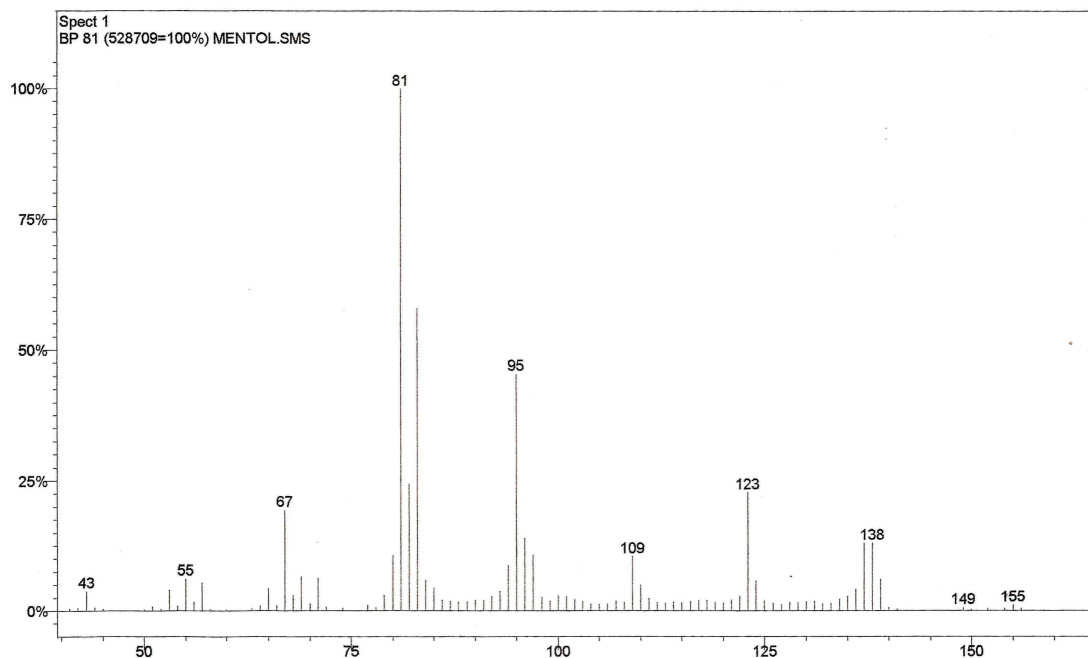


Figura 22. Espectro de massa do mentol extraído das folhas de *M. arvensis* por hidrodestilação.

Os solventes extraem os pigmentos com maior ou menor velocidade em função de suas características físico-químicas e afinidade pelo soluto (WELLBURN, 1994), assim como também possuem forte influência na estabilidade dos pigmentos, principalmente, as clorofilas que se degradam facilmente em contato com o oxigênio e a luz (HISCOX e ISRAELSTAM, 1979).

Segundo HISCOX e ISRAELSTAM (1979), os teores de clorofila total extraídos com DMSO a 64°C não sofreram diminuição durante quatro dias consecutivos de estocagem, tornando este solvente uma excelente alternativa se comparado ao metanol, acetona e éter.

Deste modo, a metodologia proposta por HISCOX e ISRAELSTAM (1979) foi utilizada neste experimento e os resultados obtidos permitiram verificar que a velocidade de extração dos pigmentos, em temperatura ambiente durante as primeiras cinco horas foi constante (6,0 mg clorofila total por gms.hora⁻¹), quando aproximadamente 70% do total de clorofila havia sido extraído (Figura 24).

A extração total foi completada por volta da 24^a hora, com valores aproximados de 45 mg.gms⁻¹ de pigmentos, sendo que não foi observado diminuição significativa dos valores obtidos ao final de 120 horas, demonstrando a estabilidade do solvente no processo de extração (Figura 24).

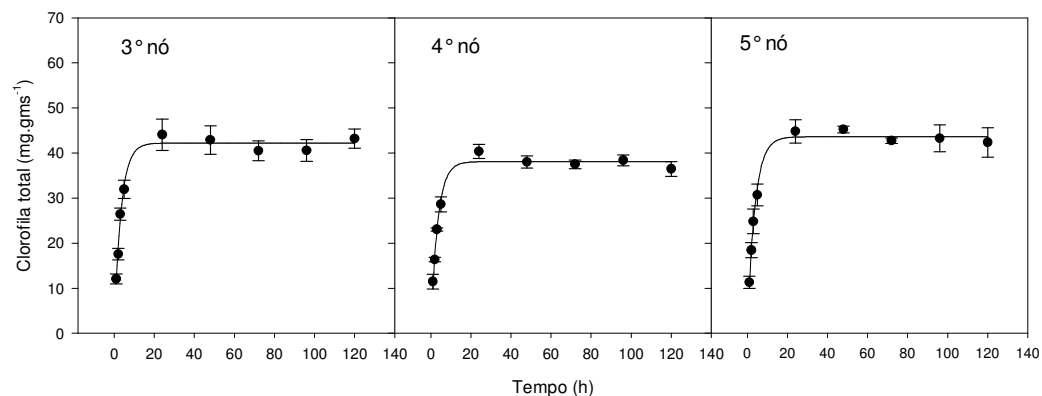


Figura 24. Concentração dos pigmentos fotossintéticos em plantas de *M. arvensis*, em função do tempo, e do posicionamento da folha na planta. Folhas do 3º, 4º e 5º nó. Plantas cultivadas sobre luz natural (no período da medição os valores de radiação fotossinteticamente ativa foram superiores a 2.000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), Extração com DMSO a frio, protegido da luz. Os valores de concentração de pigmentos foram submetidos a análise de regressão não linear. A curva representa distribuição dos pontos a um nível de significância de 0,997 (altamente significativo) e coeficiente de correlação variando de 0,997 a 0,987. As barras representam do desvio padrão das amostras.

Ao comparar o processo de extração em temperatura ambiente com a temperatura constante de 64° C, conforme proposto por HISCOX e ISRAELSTAM (1979), observou-se que os valores obtidos foram semelhantes (aproximadamente 46 mg.gms⁻¹), sendo que no processo a 64° C o tempo de extração foi concluído em três horas (Figura 25).

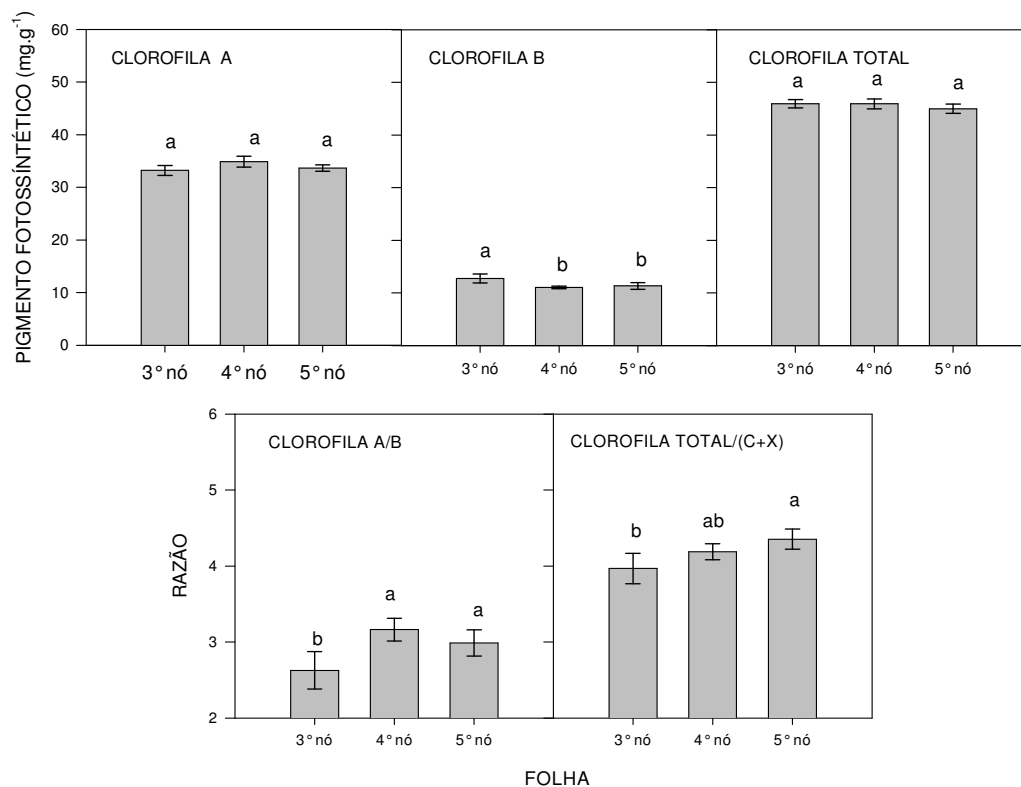


Figura 25. Concentração e taxa entre os pigmentos fotossintéticos em plantas de *M. arvensis*, em função do posicionamento da folha na planta (3° , 4° e 5° nó). Plantas cultivadas sobre luz natural (no período da medição os valores de radiação fotossinteticamente ativa foram superiores a 2.000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Extração com DMSO a 64° C por 3 horas, protegido da luz. Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

Não foram observadas variações significativas entre os teores de clorofila a e b das folhas do 3° ao 5° nó (Figura 25), contudo, a relação entre os pigmento (clorofila a/b), apresentaram uma pequena diferença entre as folhas do 3° e as folhas do 4° e 5° nó, assim como, a relação entre clorofila total e carotenóides (c+x), nas folhas do 3° e 5° nó.

Esperava-se que as folhas mais adultas apresentassem uma maior quantidade de clorofila total em função da maturação fisiológica, como também, em função do sombreamento que as últimas folhas estavam expostas. Porém os resultados apresentados mostraram apenas alteração nas relações entre os pigmentos o que, também, pode ser reflexo da a exposição a luz e/ou maturidade da folha (Figura 25).

As folhas das plantas que se desenvolvem sob baixa iluminação ou sombreadas apresentam maiores teores de clorofila total e menores teores de carotenoides que as expostas a alta incidência luminosa, entretanto, LICHTENTHALER e BUSCHMANN (2001) observaram que a razão entre clorofila a e b é maior em plantas sob alta incidência luminosa e menor sob baixa incidência luminosa.

Os resultados obtidos mostraram que mesmo não havendo variações nos teores de pigmentos existe uma diferença significativa nas razões entre os pigmentos o que provavelmente é um indício de folhas com diferentes níveis de maturidade e, portanto, com características bioquímicas próprias.

Além disso, a metodologia proposta por HISCOX e ISRAELSTAM (1979), garante a estabilidade do pigmento após a extração, permitindo que o protocolo seja desenvolvido alguns dias após a coleta do material, sem prejuízos as atividades do laboratório. Contudo,

recomenda-se o armazenamento das amostras em DMSO na geladeira por um período máximo de três dias, em frasco âmbar rosqueável, seguido por extração em banho-maria a 64°C.

4.2.2 Atividade da nitrato redutase nas folhas do 3º, 4º e 5º nó.

A nitrato redutase é uma das enzimas da via de assimilação de nitrogênio, a qual é responsável em converter o nitrato em nitrito no citossol das células. Esta é a primeira etapa de redução do N-nítrico e é um processo extremamente endergônico e limitante à continuidade da via (FERNANDES e SOUZA, 2006).

A metodologia proposta por JAWORSKI (1971) para determinação da atividade potencial da N.R. se dá *in vivo* e o sucesso do procedimento depende que as amostras sejam coletadas e processadas de forma prática. Além disso, a uniformidade da amostra coletada diminui a possibilidade de erros nos resultados obtidos.

Os resultados apresentados na Figura 26 mostram uma diferença significativa entre as folhas do 3º nó e 4º nó., por outro lado, não foi constatada diferença significativa entre as folhas do 5º e 3º nó e do 5º e 4º nó.

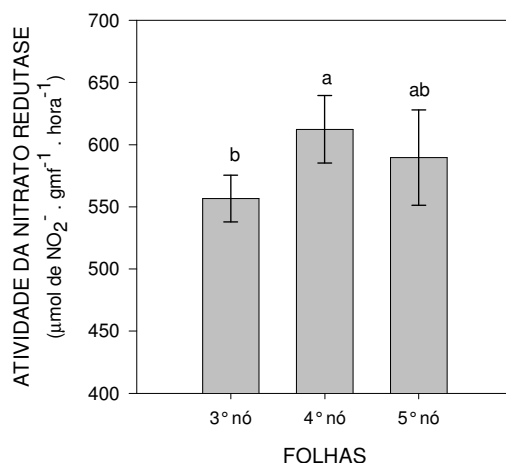


Figura 26. Atividade da Nitrato Redutase em folhas do 3º, 4º e 5º nó de plantas de *M. arvensis*. Plantas cultivadas sobre luz natural, análise realizada no período da manhã. Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

O crescimento foliar e a produção de organelas são atividades que demandam muita energia e as prioridades metabólicas podem tornar os recursos para a redução do nitrato escassos, portanto, diminuindo a atividade da NR. Esta seria uma possível justificativa para os menores valores de atividade da N.R. encontrados nas folhas do 3º nó.

A atividade da NR demanda muita energia, principalmente poder redutor, proveniente da degradação de glicídios e/ou fotossíntese (FERNANDES e SOUZA, 2006). Contudo, em fase de crescimento esta energia é direcionada principalmente para a construção de macromoléculas estruturais, como parede celular e lipídios de membranas.

Considerando os aspectos analisados, pigmentos fotossintéticos e a atividade da NR, os resultados obtidos nas folhas do 4º e 5º foram muito semelhantes, permitindo concluir que estas folhas podem ser utilizadas como modelo para as análises laboratoriais de rotina.

4.3 Experimento 3: Efeito da Concentração de Fósforo Sobre a Produção e a Qualidade do Óleo Essencial de *M. arvensis* Cultivada por Hidroponia.

4.3.1 Condução do experimento

Até o 17º dia do experimento as plantas aumentaram o pH da solução nutritiva acima do valor 5,8; sendo que este aumento variou em função da concentração de P na solução nutritiva. A partir do 21º dia do experimento as variações de pH apresentaram uma grande oscilação entorno do ponto de correção (pH 5,8) e, também, em função da troca das soluções nutritivas, exceto no tratamento com 2,0 mM de P (Figura 27).

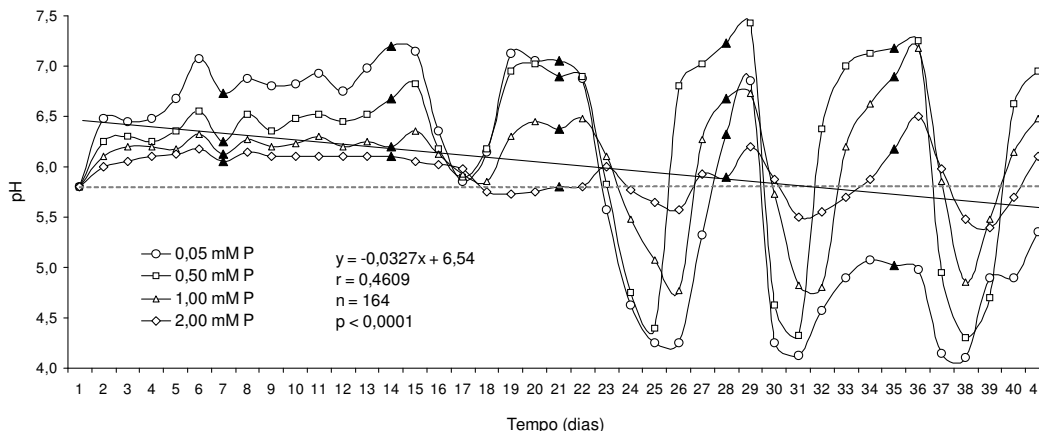


Figura 27. Variação média do pH na solução nutritiva para o cultivo de *Mentha arvensis* em função dos teores de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM de P) e do tempo. Linha pontilhada representa o valor de ajuste diário do pH da solução nutritiva (pH= 5,8). Linha contínua representa a regressão linear de todos os pontos. Os triângulos de cor preta representam os dias de troca da solução nutritiva.

Foram observadas duas fases distintas, até o 17º dia e após este marco. O comportamento inicial mostra a alcalinização da solução nutritiva, o qual está relacionado com a fase inicial de crescimento das plantas, quando a disputa por nutrientes na solução nutritiva não é intensa. A segunda fase apresenta uma forte oscilação no pH e a acidificação mais intensa da solução, com um padrão repetitivo associado ao dia de troca da solução nutritiva (Figura 27, triângulos pretos).

A oscilação nos valores de pH é uma resposta das plantas a disponibilidade de nutrientes na solução nutritiva. Foi observado que nos primeiros dias que sucedem a troca da solução nutritiva ocorre a alcalinização do pH e nos dias seguintes a acidificação.

A faixa de pH adequada ao melhor desenvolvimento das culturas, geralmente está entorno de 5,8. Este valor está relacionado principalmente à disponibilidade de nutrientes na solução. Por isso, constantemente a planta altera o pH da rizosfera, para facilitar a absorção de determinados nutrientes, sobretudo os aniônicos, como fosfatos e nitratos que são absorvidos através do transporte simporte, acompanhados com H⁺ (FERNANDES & SOUZA, 2006).

A absorção do P ocorre através de um simporte acompanhado com 3 a 5 H⁺, o que justifica a alcalinização da solução, durante a absorção deste nutriente. Como o P é um elemento químico de grande demanda na planta, ela utiliza de artifícios para captar este nutriente com maior facilidade. Dentre os artifícios mais comuns a planta bombeia H⁺ do citossol para a solução nutritiva, a um custo energético elevado (hidrólise de ATP), que culmina com a acidificação da solução.

Deste modo, a planta no período de grande competição pelo nutriente acidifica o meio nutritivo para captar o fósforo, em seguida a absorção gradual deste nutriente a planta acaba

alcalinizando o meio, até o momento da próxima troca de solução, quando o processo se repete (FERNANDES & SOUZA, 2006).

4.3.2 Pigmentos fotossintéticos

A primeira etapa da fotossíntese começa na captação de energia luminosa pelos pigmentos, nos complexos de captação de luz (CCL), transferência dessa energia até os fotossistemas e utilização desta energia para produzir ATP e NADPH.

Qualquer fator que perturbe o funcionamento adequado dos CCL pode interferir diretamente no fluxo de elétrons nos fotossistemas e causar diminuição no rendimento de ATP e NADPH.

As diferentes concentrações de fósforo na solução nutritiva não provocaram efeitos drásticos na concentração dos pigmentos, contudo, no tratamento com 0,05 mM de P houve uma pequena redução na concentração de clorofila a e no tratamento com 2 mM de P um ligeiro aumento na concentração de carotenóides (Figura 28).

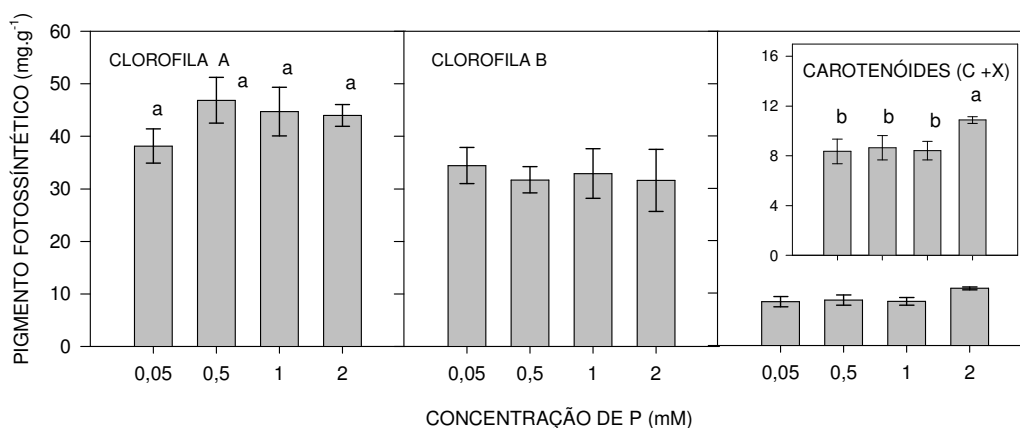


Figura 28. Níveis de clorofila a, b e carotenóides nas folhas da parte aérea da *M. arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM). Letras diferentes no mesmo gráfico resultam significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

O teor de clorofila e carotenóides e a sua razão nas folhas podem indicar o nível de dano que determinado estresse causa a planta. Níveis elevados de nutrientes ou deficiência, salinidade (BELKHODJA *et al.*, 1994), temperatura (OLIVEIRA *et al.*, 2002), radiação (MAZZA *et al.*, 2000), deficiência hídrica (RODEN e BALL, 1996) e outros fatores podem danificar as clorofilas totais com maior intensidade que os carotenóides.

As faixas consideradas normais das razões clorofila (a/b) e clorofila total/carotenóides em plantas do tipo C3 são respectivamente, 2,5-3,5 e 4,2-5,0 (LICHTENTHALER & BUSCHMANN, 2001). Os valores encontrados neste trabalho foram menores para a razão clorofila (a/b) e maiores para a razão clorofila total/carotenóides (Figura 29).

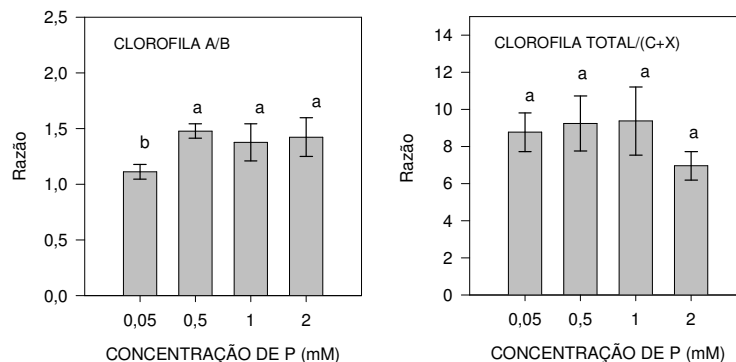


Figura 29. Razão entre clorofila a e b e entre clorofila total (a+b) e carotenóides (x+c) nas folhas da parte e aérea de *Mentha arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM). Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

A baixa razão entre as clorofilas a e b indica uma maior concentração de fotossistema II e maior empilhamento das membranas dos tilacoides, que forma o *granum* (BOWYER & LEEGOOD, 1997). Está é uma estratégia da planta para aumentar a área de captação de energia luminosa, aproveitando os fótons captados para produzir NADPH e ATP.

Os valores da razão entre clorofila a e b e entre clorofila total (a+b) e carotenóides (x+c) encontrados nas folhas de *M. arvensis* indicam que a planta está sobre estresse por efeito da baixa luminosidade.

4.3.3 Biomassa

Entre os fatores ambientais que interagem influenciando o desenvolvimento e as produções das plantas cultivadas estão os níveis inadequados de nutrientes disponíveis na solução do solo. O fósforo (P) que é um importante componente das moléculas de ATP, responsáveis pelo armazenamento e transporte de energia para os processos endergônicos como a síntese de compostos orgânicos e a absorção ativa de nutrientes (MARSCHNER, 1995).

Após 41 dias de cultivo foram observadas variações na produção de biomassa nas plantas de *M. arvensis* submetidas as soluções nutritivas com diferentes concentrações de fósforo (Figura 30).

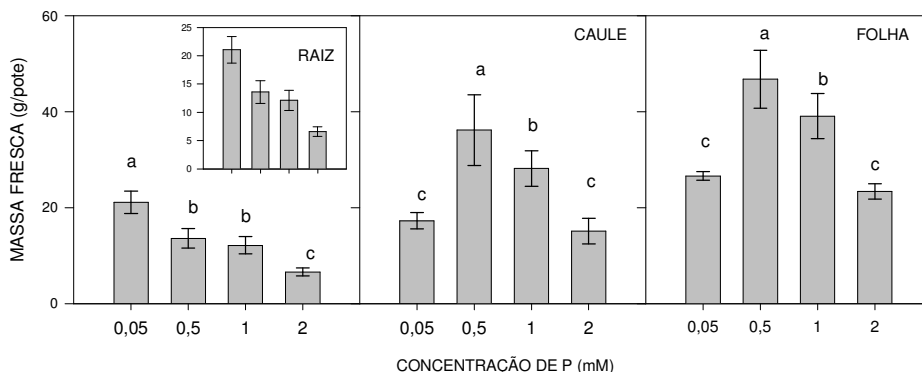


Figura 30. Biomassa de raiz, caule e folha da *Mentha arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM). Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

A produção de massa fresca na raiz foi correlacionada com a concentração de P na solução nutritiva e os resultados obtidos mostraram uma correlação negativa comprovando que as plantas de *M. arvensis* investem em crescimento radicular quando estimuladas por baixas concentrações de P, por outro lado, foi encontrada uma relação quadrática entre a produção de massa na parte aérea e a concentração de P na solução nutritiva, que indicaram a concentração de 0,95 mM de fósforo como a ideal para a maior produção de massa na parte aérea (Figura 31).

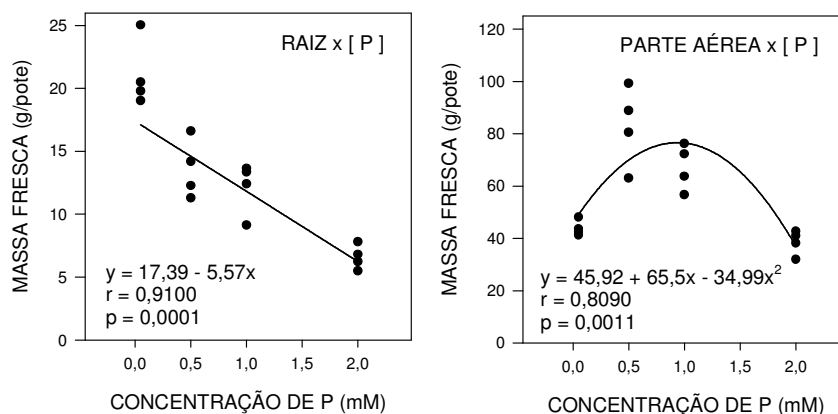


Figura 31. Correlação entre massa fresca das raízes de *Mentha arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM).

Foi observada a diminuição da razão parte aérea/ raiz nas plantas submetidas ao tratamento com 0,05 mM de P na solução nutritiva. Entretanto, não foram constatadas alterações nas folhas quanto a quantidade de massa por unidade de área (Figura 32).

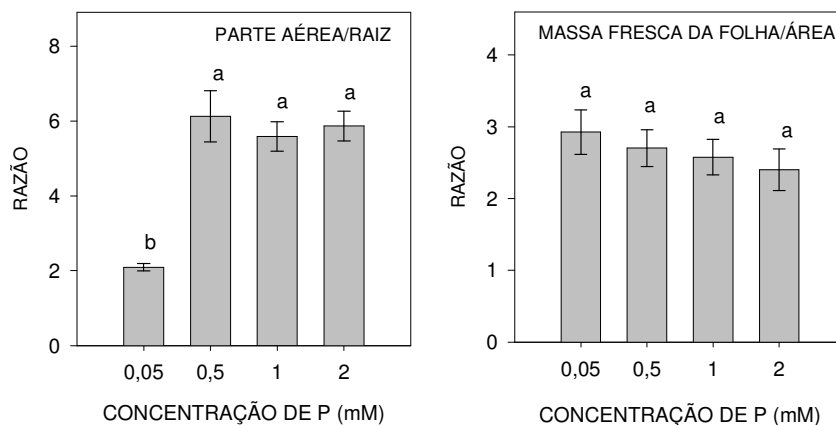


Figura 32. Razão entre parte aérea/raiz e massa por unidade de área em plantas de *Mentha arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM). Letras diferentes no mesmo gráfico resultam em resultados significativos (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

Resultados semelhantes foram encontrados por SOUZA *et al.* (2007) em cultivo hidropônico de hortelã com diferentes concentrações de N e P. Em contra partida, RODRIGUES *et al.* (2004) não observaram aumento na produção de massa nas raízes de hortelã, quando cultivadas nas soluções nutritivas com menores doses de P.

As plantas quando submetidas a um ambiente com menor concentração de P são estimuladas a produzir mais raízes, principalmente as de menor calibre, visando aumentar a área de absorção deste nutriente (EPSTEIN e BLOOM, 2005).

O maior crescimento das raízes funcionam drenando os recursos energéticos provenientes da parte aérea, como consequência ocorre a diminuição da produção de massa na parte aérea (FERNANDES & SOUZA, 2006), que associado ao aumento na produção de raízes diminui consideravelmente a razão parte aérea/raiz.

As concentrações intermediárias de fósforo na solução nutritiva (0,5 e 1 mM) estimularam maior produção de parte aérea e as plantas submetidas ao tratamento com 2 mM de P apresentaram menor produção de parte aérea, florescimento antecipado e sintomas de toxidez (Figura 34).

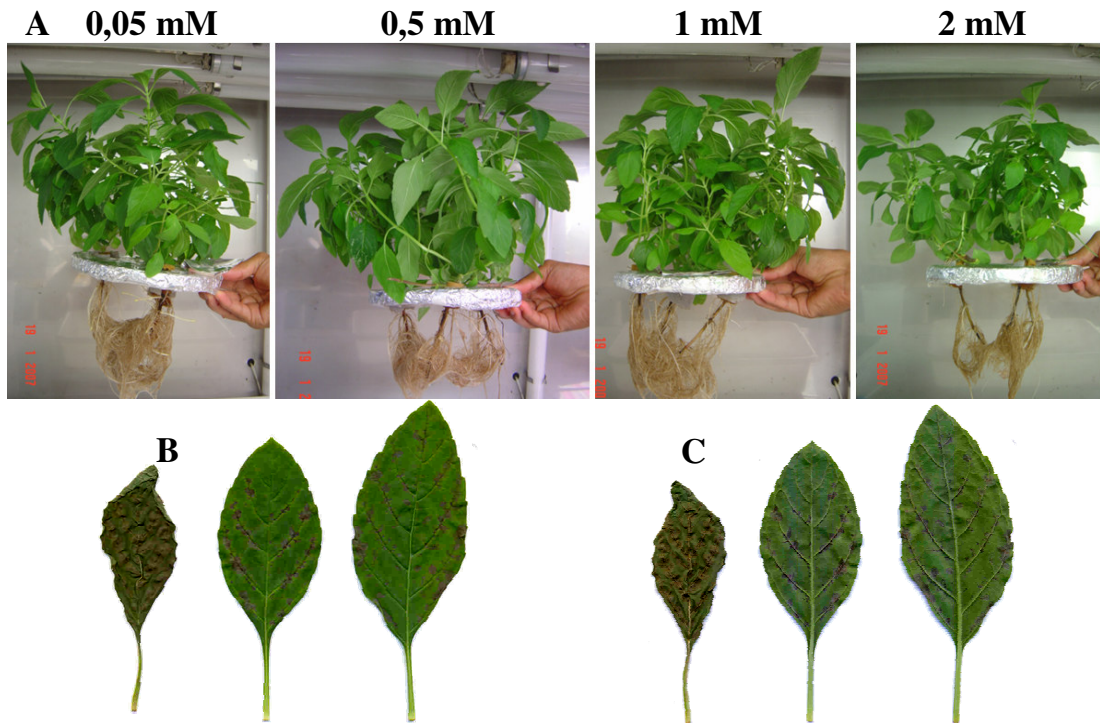


Figura 33. A) Detalhes das plantas de *Mentha arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM). Folhas da face B) adaxial e C) abaxial com sintomas de distúrbios fisiológicos sob efeito do tratamento com 2 mM P.

O estímulo provocado sobre as plantas cultivadas com 2 mM de P foi prejudicial a produção de biomassa, nas raízes, nos caules e nas folhas, pois este foi o tratamento com menor produção de biomassa (Figura 34). Este fato pode ser o reflexo da toxidez observado nas folhas de hortelã.

A sintomatologia da toxidez por excesso de fósforo não é muito conhecida (CECONI *et al.*, 2007). Porém, sabe-se que acima de certos níveis este elemento causa antagonismo nutricional (MOTA *et al.*, 2003), deste modo, os sintomas observados nas plantas submetidas a 2 mM de P podem estar associados à deficiência de outros nutrientes ocasionada pelo excesso de fósforo.

Deve-se ressaltar que nas condições deste experimento a dose de fósforo no qual as plantas produziram maior massa de folhas, corresponde a apenas a metade da dose presente na solução de Hoagland e Arnon (1950) e em outras soluções utilizada em cultivo hidropônico para a maioria das culturas.

4.3.4 Frações solúveis e atividade da enzima nitrato redutase

Nas raízes destaca-se os menores teores de açúcares solúveis nos tratamentos com 0,5 e 1 mM de P, justamente onde são encontrados os maiores teores de N-nitrato, o qual pode estar associado ao gasto de energia para a absorção deste íon; os maiores teores de N-amino, que por sua vez indica gasto energético no processo de assimilação de N e maior atividade da nitrato redutase, que é a primeira enzima na via de redução, a qual utiliza poder reductor a partir da degradação de glicídios no citossol (Figura 34).

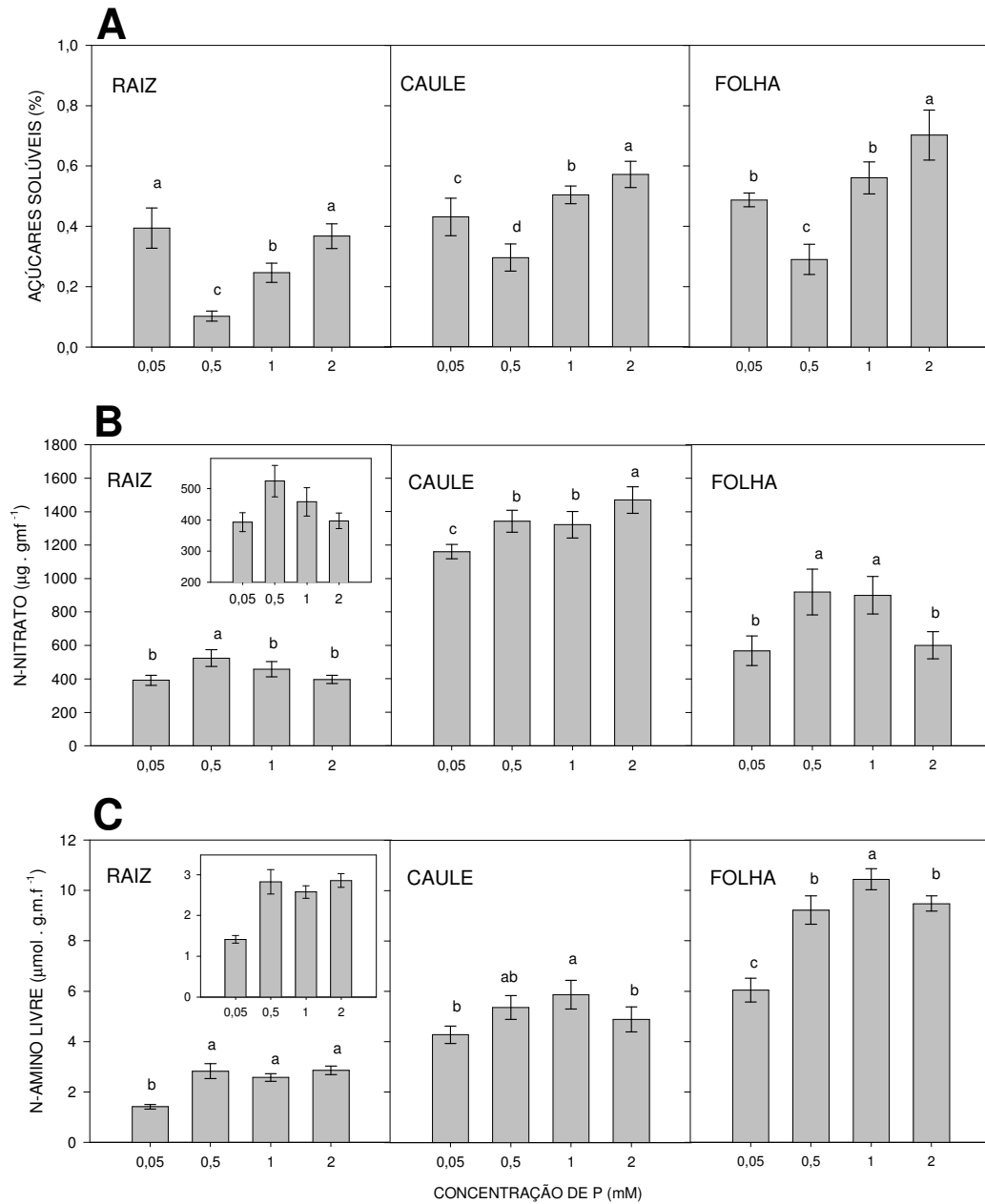


Figura 34. Teores de A) açúcares solúveis, B) N-nitrato e C) N-amino em folhas, caules e raízes de *Mentha arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM). Letras diferentes no mesmo gráfico resultam significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

Nas outras partes da planta (caule e folha) o tratamento com 0,5 mM de P apresenta comportamento semelhante ao discutido no parágrafo anterior, porém muito mais evidente, demonstrando como clareza como o teor de açúcares solúveis está correlacionado negativamente com a atividade metabólica.

Os carboidratos são a fonte de energia que as plantas utilizam para o seu sustento, seja através da disponibilização de esqueletos carbônicos ou pela energia proveniente de sua degradação, todas as funções ou rotas metabólicas dependem direta ou indiretamente dos carboidratos (BOWYER e LEEGOOD, 1997; HELDT, 2005).

Os teores de açúcares solúveis indicam os níveis potenciais de energia que a planta dispõe para as suas funções vitais, deste modo, é de se esperar que as plantas com desenvolvimento adequado apresentem níveis compatíveis com as atividades metabólicas que desempenham.

Por outro lado, não é verdadeiro afirmar que as plantas que mais crescem sejam as que possuem maiores teores de açúcares solúveis. Ao contrário, estas são as plantas que mais consomem estes recursos energéticos para o seu contínuo desenvolvimento.

Normalmente as plantas apresentam uma correlação negativa entre os teores de açúcares solúveis e os de N-amino, o que é uma indicação de que as plantas consomem boa parte da energia disponível no processo de redução do nitrato absorvido. Neste trabalho esta correlação foi encontrada e está apresentada na Figura 35.

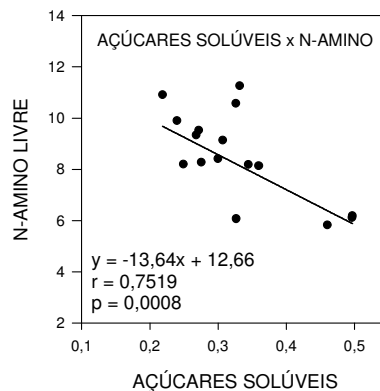


Figura 35. Correlação linear entre os teores de Açúcares Solúveis e os de N-Amino nas folhas de *Mentha arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM).

Segundo FERNANDES (1990) o metabolismo do N absorvido, em plantas de arroz, é controlado principalmente, pelos fluxos internos de energia, o que pode explicar a diminuição dos teores de açúcares nas plantas de *M. arvensis* que apresentaram melhor desenvolvimento.

Os resultados mostraram que o caule foi o local de maior acúmulo de N-nitrato, seguido pela folha e raiz. SOUZA *et al* (2006), também encontrou valores de N-nitrato mais altos nos caules, associando o órgão como local preferencial de estocagem do nutriente. COMETTI (2003) relatou que o acúmulo de N-nitrato pode estar relacionado com uma estratégia evolutiva da planta para impedir excesso de nitrato nas folhas.

Foram encontrados níveis mais altos de N-nitrato nas plantas submetidas aos tratamentos com 0,5 e 1 mM de P. Este resultado é um exemplo claro que mostra como um nutriente pode interferir na absorção de outro.

A atividade da enzima nitrato redutase foi mais expressiva nas folhas, seguido pelas raízes (tratamentos com 0,5 e 1,0 mM de P) e com menor intensidade nos caules (Figura 36). Quanto aos tratamentos, observou-se um comportamento semelhantes aos níveis de N-nitrato e N-amino e antagônico aos de açúcares solúveis, nas folhas.

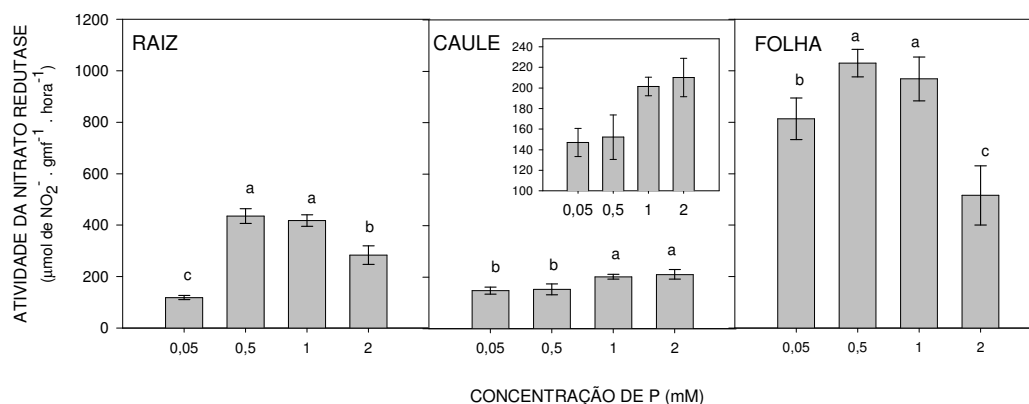


Figura 36. Atividade da NR em folhas, caules e raízes de *Mentha arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM). Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

4.3.5 Óleo essencial

O perfil cromatográfico apresenta-se semelhante com aqueles do óleo essencial da *M. arvensis* encontrados na literatura (SINGH *et al.*, 2005) e preconizado pela Farmacopéia Brasileira II, pois, apresentou alta concentração de mentol (>70%) associado a valores baixos de pulegona e mentofurano, este último não detectado (Tabela 5).

Tabela 5. Percentual médio das substâncias presentes no óleo essencial de *Mentha arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico com diferentes concentrações de P (0,05; 0,5; 1 e 2 mM).

¹ t _R	Substância	----- Concentração de P (mM) -----				² Posição da folha	
		0,05	0,5	1	2	Inferior	Superior
8,30	<i>p</i> -Cimeno	2,89 b	2,06 c	3,95 a	3,80 a	4,08 a	2,27 b
12,05	pentona	2,00 a	2,42 a	1,84 a	2,02 a	1,25 b	2,89 a
12,33	isomentona	1,54 a	1,51 a	1,52 a	1,49 a	1,40 b	1,63 a
12,44	neomentol	1,61 a	1,51 a	1,47 a	1,53 a	1,53 a	1,54 a
12,70	mentol	72,28 a	75,60 a	68,18 a	70,98 a	76,22 a	67,31 b
14,58	pulegona	4,43 b	6,51 a	3,81 b	5,18 ab	3,75 b	6,22 a
15,10	piperitona	0,73 a	0,74 a	0,66 a	0,34 a	0,51 a	0,72 a
Monoterpenos Cetônicos		7,97	10,44	7,17	8,69	6,4	10,74
Alcools monoterpênicos		73,89	77,11	69,65	72,51	77,75	68,85
Total		85,49 b	90,35 a	81,44 c	85,33 b	88,73 a	82,58 b

¹t_R – tempo de retenção analisado por CG/EM. ²Posição da folha – superior (3°, 4° e 5° nó) e inferior (6°, 7° e 8° nó). Letras iguais na mesma linha o resultado não é significativo (Fisher LSD, 5%).

Quanto ao efeito do tratamento, constatou-se que houve diminuição de *para*-cimeno nas plantas sob o efeito dos tratamentos com 0,05 e 0,5 mM de P e diminuição de pulegona no tratamento com 1 mM de P (Tabela 5).

No gráfico de scores (Figura 37A) podem ser observadas as variações nos perfis cromatográficos das amostras de óleos essenciais obtidas das folhas superiores (3°, 4° e 5° nó) e inferiores (6°, 7° e 8° nó). Os resultados mostraram que o aumento na concentração de mentol (folhas inferiores) está associado a diminuição nos teores de pulegona, mentona e isomentona (Figura 37B).

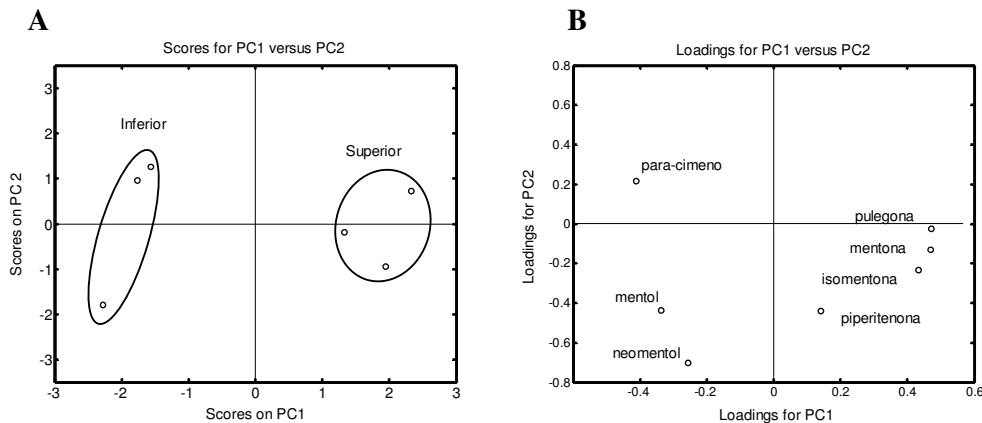


Figura 37. Avaliação do perfil cromatográfico (CG) dos óleos essenciais por meio da análise de componentes principais (PCA, 5%) . A) Gráfico de scores mostra o agrupamento por semelhança no perfil cromatográfico. B) Gráfico de loadings mostra a participação de cada substância para a formação dos agrupamentos no gráfico de scores. A PCA foi conduzida em triplicata com 95% de confiança. Óleo essencial obtido das folhas frescas da parte superior e inferior das plantas de *Mentha arvensis* cultivada por 41 dias em sistema hidropônico.

A constatação desse resultado gerou o seguinte questionamento: a síntese destas substâncias é controlada pela idade da folha?

Certamente as folhas superiores são mais novas que as inferiores, aproximadamente 2,4 dias separam a formação das folhas entre os nós (TURNER *et al.*, 2000a; 2000b). Contudo, as folhas inferiores, também, estão sombreadas, podendo existir um sinergismo provocado pela idade e a intensidade luminosa na qualidade do óleo.

A resposta a este questionamento será discutida a partir dos resultados obtidos nos próximos experimentos, no qual serão avaliados os efeitos da luminosidade sobre a qualidade e expressão das enzimas da via do mentol.

Por outro lado, a idade pode ser uma das respostas para explicar o incremento de 9% na concentração de mentol das folhas inferiores, uma vez que a maior produção de mentol ocorre tardiamente, por volta de 40 dias após a iniciação da folha e com incremento máximo de 2% de mentol ao dia, após 30 dias de surgimento da folha (DAVIS *et al.*, 2005).

4.4 Experimento 4: Extração de Células Secretoras e Avaliação do Teor e do Perfil Cromatográfico do Óleo Essencial das Folhas de *M. arvensis*, Com Diferentes Idades.

4.4.1 Método de extração, isolamento e quantificação de células secretoras.

Uma das dificuldades ao se pesquisar o metabolismo especial, focando os eventos bioquímicos, é que estes eventos são relativamente raros se consideradas como parte integrante de todos o metabolismo da planta, por exemplo, a expressão de genes ou a síntese de proteínas específicas ao metabolismo de terpenos.

Por outro lado, muito destes eventos são restritos a um órgão ou tecido especial que é responsável em secretar estas substâncias. Por exemplo, os óleos essenciais que são metabolizados nos tricomas secretoras, especificamente nas células secretoras. Nestas células, as reações bioquímicas são intensas, muitas vezes exclusivas, não ocorrendo em outros tecidos da planta.

Deste modo, o isolamento das células ou do tecido responsável pela síntese de metabólitos especiais, permite ao pesquisador concentrar os elementos bioquímicos de

interesse e realizar os estudos com maior precisão, como vem sendo feito por outros grupos de pesquisa (GERSHENZON *et al.*, 1992)

A síntese de óleos essenciais nas plantas de *Mentha arvensis*, como discutido na revisão de literatura, ocorre na parte aérea das plantas, mais especificamente nos tricomas secretores capitado e principalmente nos peltados.

As técnicas para o isolamento destes tricomas têm sido descritas por vários autores, entre elas a escovação da face da folha (CROTEAU e WINTERS, 1982), a limpeza da face da folha com laminas de vidro (KEENE e WAGNER, 1985), provocando atrito mecânico da face da folha com contas de vidro (GERSHENZON *et al.*, 1987), extração da camada epidérmica da face da folha (CROTEAU, 1977) e através da homogeneização dos extratos das folhas, seguido por separação dos tricomas secretores isolados por gradiente de densidade de percolação (SLONE e KELSEY, 1985).

Dentre as técnicas listadas, a proposta por GERSHENZON *et al.* (1987) e modificada em 1992 pelos mesmos autores, pareceu ser a mais apropriada. O procedimento visa concentrar a células secretoras de óleos essenciais após duas etapas, a primeira consiste num método abrasivo e, depois a seleção do tecido por filtragem.

Após a realização do procedimento, imagens foram obtidas e estão apresentadas na Figura 38. Observou-se grande concentração de células secretoras de tricomas secretores do tipo peltado, alguns poucos do tipo capitado e grande quantidade de tricoma não glandulares. Foi possível observar o local de ruptura nas células secretoras, algumas cutículas estouradas entre outras estruturas celulares.

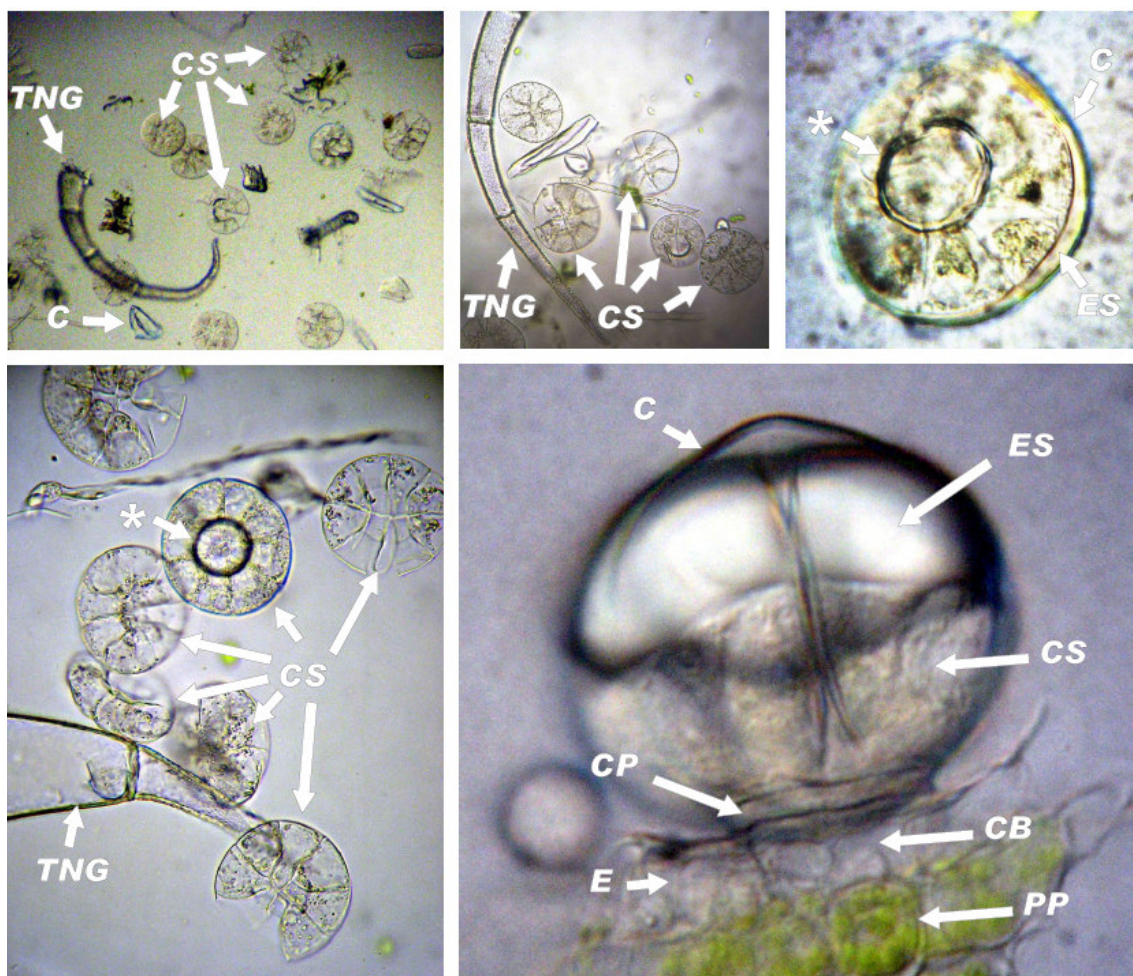


Figura 38. Imagens obtidas de uma suspensão contendo $1,1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ de cabeças do tricoma secretor (CS) extraída das folhas de *M. arvensis* utilizando a metodologia proposta por GERSHENZON *et al.*, (1992). Tricoma não glandular (tector – TNG), espaço subcuticular (ES), célula basal (CB), célula peduncular (CP), cutícula (C), epiderme (E) e parênquima paliádico (PP). Após o rompimento e separação da cabeça do tricoma secretor do restante, nota-se a presença de uma cicatriz circular (*) mostrando o exato local de rompimento. Imagem obita no microscópio de luz no laboratório de Bioquímica de Plantas (ICE/UFRRJ).

Os resultados foram reprodutíveis e a concentração média de cabeças secretoras obtidas foi de aproximadamente $3,6 \times 10^5 \text{ gmf}^{-1}$, desvio padrão de $5,5 \times 10^4$, valores semelhantes os dados encontrados na literatura (GERSHENZON *et al.*, 1992).

4.4.2 Avaliação do teor e qualidade do óleo essencial em folhas com diferentes idades.

Muitos trabalhos de pesquisa descreveram a idade das plantas como um dos fatores associados a produção e qualidade dos óleos essenciais (SHANKER *et al.*, 1999, TURNER *et al.*, 2000a; 2000b). Estas variações podem estar associadas ao início da fase reprodutiva das plantas, pois foram observadas variações nos teores de mentol e limoneno nas plantas do gênero *Mentha* coletados antes e após o florescimento (MAIA, 1998), assim como em função da idade das folhas (BURBOTT e LOOMIS, 1967).

Outro fator determinante para as alterações na produtividade ou qualidade do óleo está associado a idade fisiológica das folhas, que por sua vez, influencia no estágio de desenvolvimento dos tricomas secretores (TURNER *et al.*, 2000a; 2000b; SHARMA *et al.*, 2003).

Por este motivo foi desenvolvido um experimento para avaliar a qualidade e o teor dos óleos essenciais extraídos das folhas superiores (3^o, 4^o e 5^o nó) e inferiores (6^o, 7^o e 8^o nó) das plantas de *Mentha arvensis* conduzidos em canteiros sob iluminação natural. Os resultados obtidos mostraram diminuição no teor de óleo essencial extraído das folhas superiores da planta de *M. arvensis* (Figura 39).

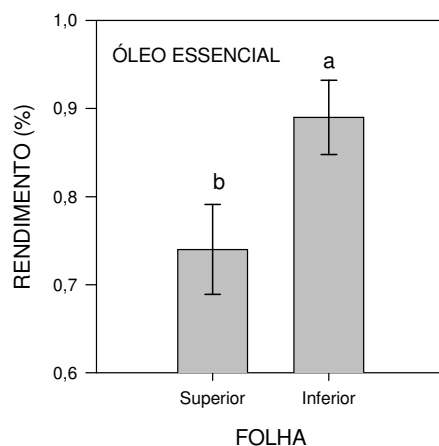


Figura 39. Teor (%) de óleo essencial extraído das folhas superiores (3^o, 4^o e 5^o nó) e inferiores (6^o, 7^o e 8^o nó) das plantas de *Mentha arvensis* cultivadas em canteiros por 45 dias. Letras diferentes no mesmo gráfico resultam em resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

BURBOTT e LOOMIS (1967) mostraram que o teor de óleo essencial nas folhas adultas em expansão (a partir do terceiro nó) não varia com a idade, contudo, os autores ressaltam modificações na qualidade do óleo essencial.

Além disso, foram observadas variações de cunho qualitativo nos óleos essenciais extraídos das folhas superiores e inferiores (Tabela 6).

Os óleos essenciais das folhas superiores estão associados a maiores conteúdos de limoneno, mirceno, isopulegol, mentona, pulegona, piperitona, germacreno D e germacreno B, enquanto que as folhas inferiores possuem mais β -pineno, neomentol, mentol, acetato de mentila e β -elemeno (Figura 40).

Tabela 6. Percentual médio das substâncias presentes nas folhas superiores (3°, 4° e 5° nó) e inferiores (6°, 7° e 8° nó) das plantas de *Mentha arvensis*, cultivadas em canteiros por 45 dias.

¹ t _R	Substância identificada	² IR	----- Tratamentos -----			
			Superior	³ dsvp	Inferior	dsvp
10,055	β -pineno	985	0,09	0,00	0,18	0,01
10,317	mirceno	993	1,23	0,96	0,16	0,00
11,683	limoneno	1036	1,42	0,03	0,48	0,00
15,597	isopulegol	1158	0,49	0,00	0,39	0,01
15,855	mentona	1166	13,34	0,15	3,83	0,02
16,135	isomentona	1175	2,51	0,34	2,64	0,03
16,264	neomentol	1179	1,43	0,01	1,68	0,04
16,599	mentol	1190	67,27	1,11	73,35	0,12
18,406	pulegona	1250	0,31	0,02	0,05	0,00
18,899	piperitona	1266	2,49	0,02	2,28	0,04
19,803	acetato de mentila	1297	2,33	0,09	10,03	0,37
23,198	β -elemeno	1417	0,12	0,00	0,43	0,02
23,676	β -cariofileno	1435	0,46	0,38	0,60	0,01
25,317	germacreno D	1497	1,75	0,04	1,14	0,01
25,707	germacreno B	1512	0,38	0,11	0,19	0,00
<i>Monoterpenos Cetônicos</i>			18,65		8,79	
<i>Ésteres e alcools monoterpênicos</i>			71,52		85,45	
<i>Sesquiterpenos</i>			2,71		2,37	
Total			95,62		97,44	

¹T_R, tempo de retenção (minutos). ²IR, índice de retenção, medida relativa ao *n*-alcanos (C₈-C₄₀) em coluna apolar conforme descrito no material e métodos. ³dsvp – desvio padrão das amostras em triplicata.

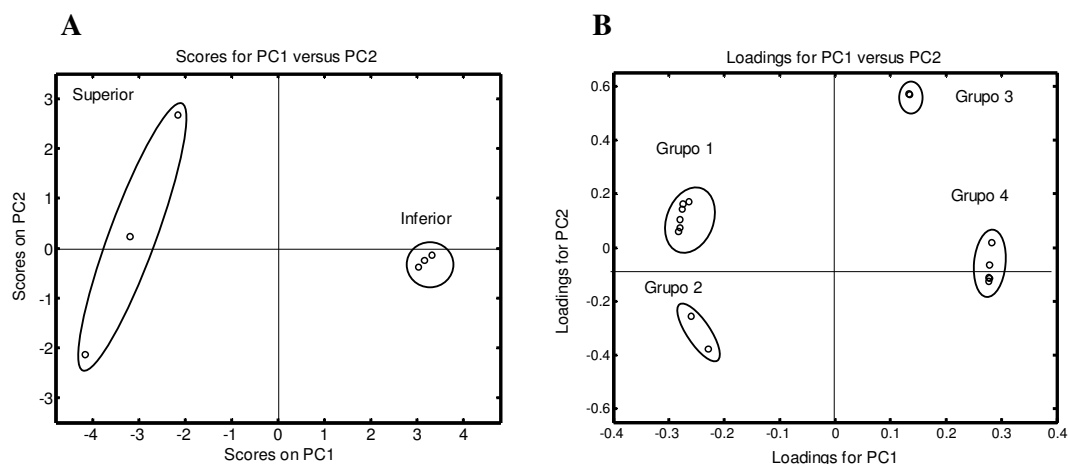


Figura 40. Avaliação do perfil cromatográfico (CG) dos óleos essenciais por meio da análise de componentes principais (PCA, 5%). A) Gráfico de scores mostra o agrupamento por semelhança no perfil cromatográfico. B) Gráfico de loadings mostra a participação de cada substância para a formação dos agrupamentos no gráfico de scores. Grupo 1: limoneno, isopulegol, mentona, pulegona, piperitona, germacreno D. Grupo 2: mirceno, germacreno B. Grupo 3: β -cariofileno, isomentona. Grupo 4: β -pineno, neomentol, mentol, acetato de mentila, β -elemeno. presentes nas folhas superiores (3°, 4° e 5° nó) e inferiores (6°, 7° e 8° nó). Óleo essencial obtido das plantas de *Mentha arvensis*, cultivadas em canteiros por 45 dias.

CLARK e MENARY (1980) e BURBOTT e LOOMIS (1967) obtiveram resultados semelhantes ao avaliarem a qualidade das folhas da base até o ápice em plantas de *M. piperita*. Os autores observaram aumento de mentol nas folhas mais velhas e diminuição nos conteúdos de mentona e nas folhas mais novas aumento de mentona com diminuição do mentol. Além disso, BURBOTT e LOOMIS (1967) perceberam teores maiores de pulegona nas folhas mais jovens.

Com base nos resultados apresentados é possível afirmar que em planta com a mesma idade, as variações na produção do óleo essencial, assim como na qualidade, dependem do estágio de desenvolvimento das folhas.

4.5 Experimento 5: Efeito da Luminosidade Sobre a Produção e a Qualidade do Óleo Essencial de *M. arvensis* Cultivada por Hidroponia.

4.5.1 Intensidade luminosa, temperatura e pH.

Para confirmar na prática a ação dos sombrites na diminuição dos valores de radiação foi realizada a medição diária da radiação fotossinteticamente ativa (às 9, 12 e 15 horas), no lado externo a casa de vegetação e sobre as bancadas, no interior da casa de vegetação (Figura 41).

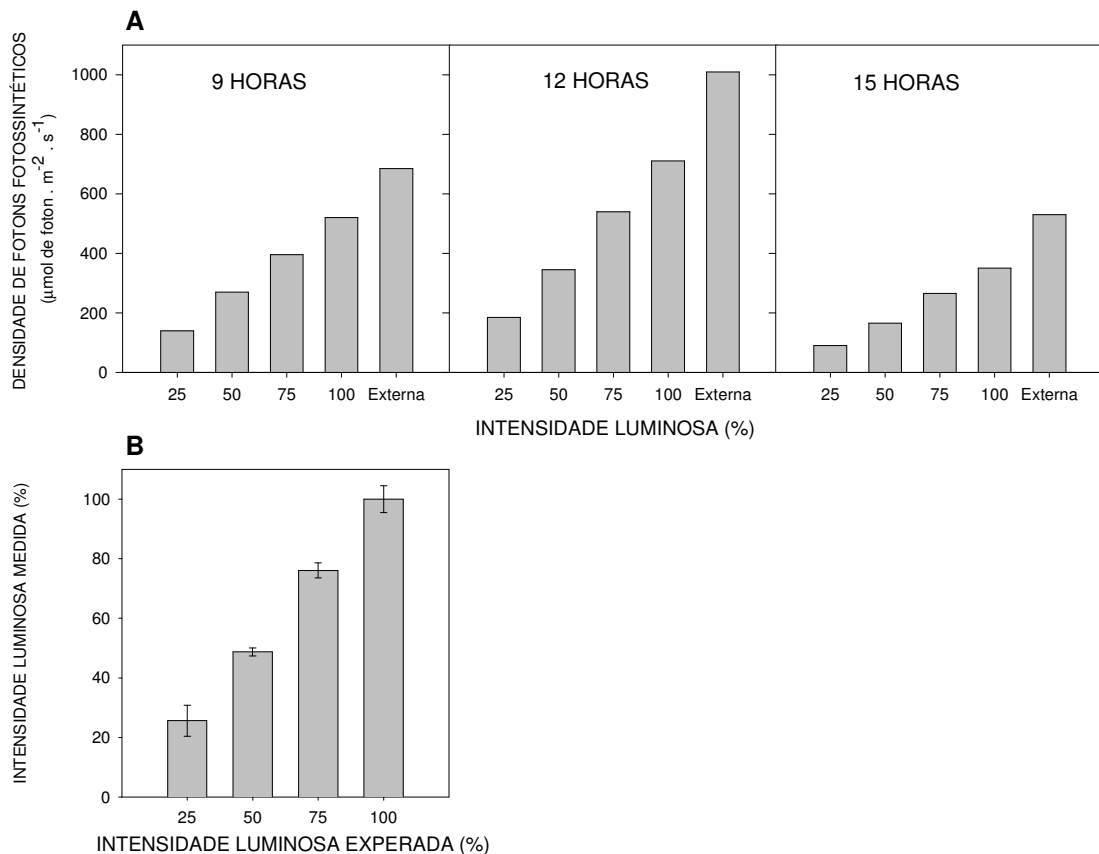


Figura 41. A) Radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) obtida nos pontos de medição diariamente as 9, 12 e 15 horas. B) Percentual de redução da luminosidade na casa de vegetação proporcionado pelo sombrite em cada tratamento proposto. Tratamento sem o sombrite foi considerado referência (100% luminosidade).

Após o término do experimento os dados foram processados e os resultados obtidos permitiram concluir que os sombrites realmente proporcionaram uma redução na radiação luminosa próxima da esperada (Figura 41). Foi observado também que o filme difusor utilizado como cobertura da casa de vegetação diminuiu em 40% a radiação incidente.

O experimento foi conduzido no período de 22 de maio até 05 de julho de 2009, período de transição entre o outono e o inverno, a temperatura média máxima foi de 31 °C e a mínima de 18 °C, no interior da casa de vegetação. Os valores diários das temperaturas máximas e mínimas, medido dentro da casa de vegetação e da radiação fotossinteticamente ativa, medido fora da casa de vegetação, estão apresentados na Figura 42.

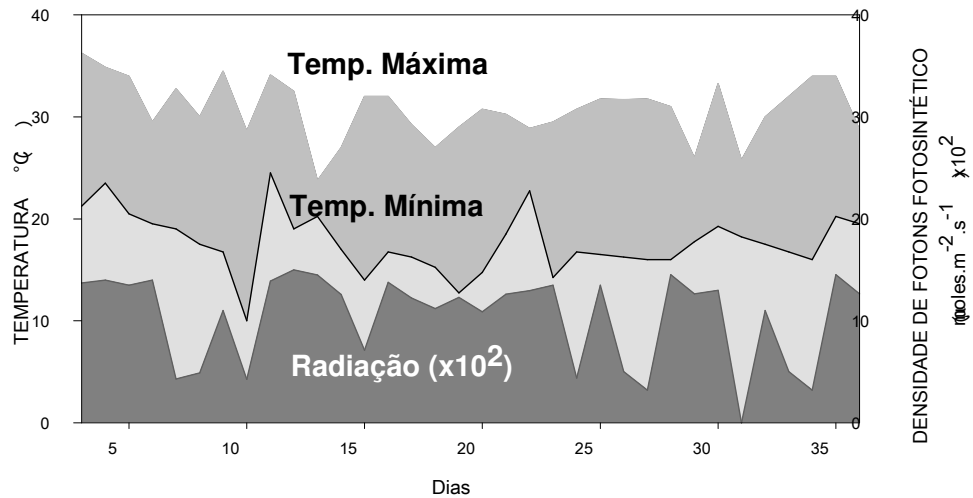


Figura 42. Os valores diários das temperaturas máxima e mínima (° C), medidos dentro da casa de vegetação e do fluxo de fotons fotossintético ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1} \times 10^2$), medido fora da casa de vegetação.

Os valores de pH obtidos durante o experimento mostraram uma amplitude maior na variação do pH após o 14º dia do experimento, quando as plantas se encontravam na fase de crescimento exponencial (Figura 43). Os valores de pH foram submetidos a análise de regressão linear e os resultados obtidos mostraram que os valores não apresentam uma tendência significativa.

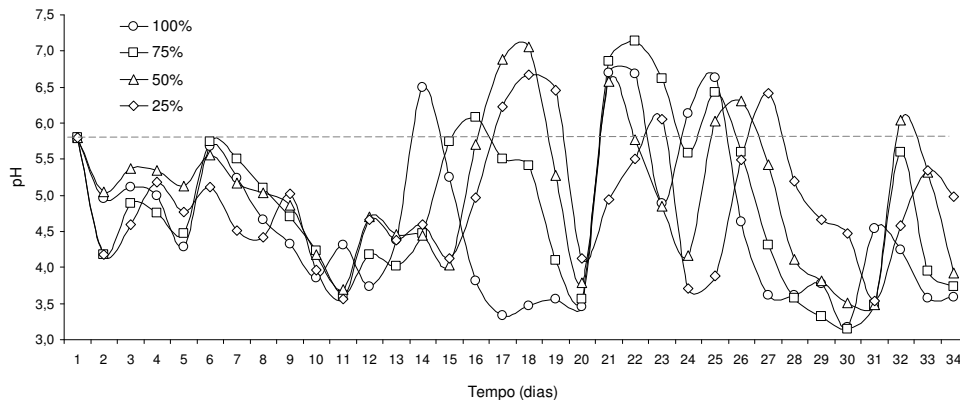


Figura 43. Variação média do pH na solução nutritiva no cultivo de *Mentha arvensis* submetida a quatro intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). Linha tracejada representa o valor de ajuste diário do pH da solução nutritiva (pH= 5,8).

Após a condução do experimento foi realizada a colheita. Três potes por tratamento foram separados para a análise da biomassa, pigmentos, frações solúveis, matéria seca e atividade das enzimas do metabolismo de nitrogênio. Os outros três potes foram utilizados para a avaliação da densidade de tricomas secretores na epiderme, extração e isolamento de células secretoras e o restante de material fresco, da parte aérea, foi utilizado para a extração do óleo essencial por arraste com vapor d'água.

4.5.2 Pigmentos fotossintéticos

Os resultados encontrados mostraram que as plantas sob menor intensidade luminosa responderam positivamente aumentando a concentração de clorofilas (Figura 44). Esta é uma resposta típica das plantas de sol quando submetidas a um ambiente com menor intensidade luminosa, ou seja, esta é uma forma de ampliar a área de captura de luz (LICHTENTHALER e BUSCHMANN, 2001; BOWYER e LEEGOOD, 1997).

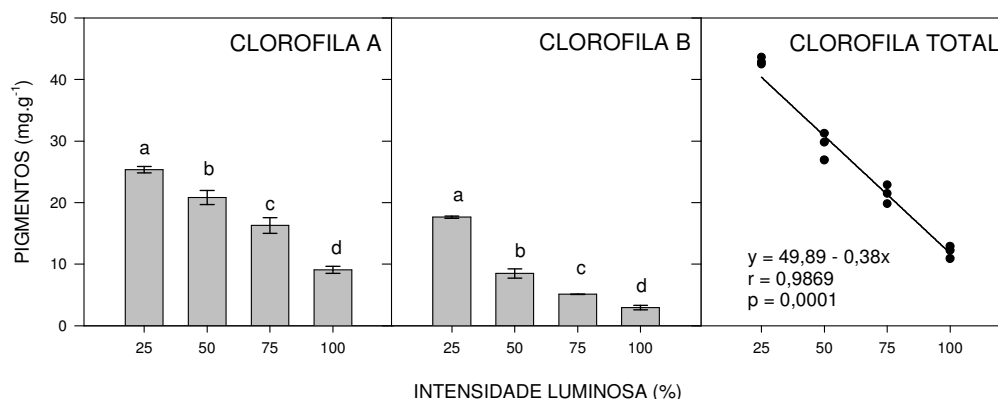


Figura 44. Teores de clorofilas a, b e total nas folhas da parte aérea de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). Letras diferentes no mesmo gráfico resultaram significativas (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

A luz é a fonte primária de energia para os sistemas biológicos e regula a atividade de diferentes vias metabólicas e funções importantes para o desenvolvimento da planta (HELDT, 2005). A entrada da energia luminosa até sua conversão em energia química, útil para a síntese de carboidratos, se inicia nos complexos de captação de luz, após a captura da energia dos fótons por moléculas especiais chamadas de pigmentos fotossintéticos (BOWYER e LEEGOOD, 1997).

A concentração e relação destes pigmentos nas folhas é uma importante informação para se avaliar a qualidade e eficiência do aparato de captura da energia luminosa, os quais dependem de fatores genéticos, climáticos e nutricionais.

Por outro lado, a relação entre as clorofilas a e b diminuiu com o decréscimo de luminosidade (Figura 45). Quanto menor a relação clorofila a/b maior a presença dos fotossistemas do tipo II, o qual está relacionado ao processo contínuo de produção de ATP e NADPH (HELDT, 2005). Além disso, o valor encontrado para a relação clorofila a/b, no tratamento com 25% de luminosidade, está abaixo do valor normalmente encontrado para este tipo de planta, 2,5-3,5 (LICHTENTHALER e BUSCHMANN, 2001).

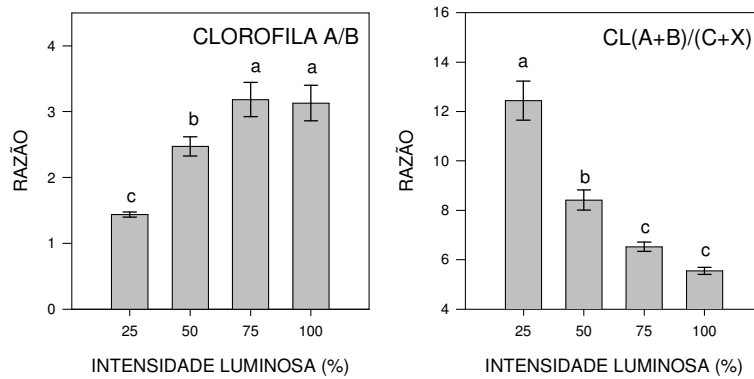


Figura 45. Razão entre clorofila a e b e entre clorofila total (a+b) e carotenóides (x+c) nas folhas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

A relação entre clorofila total e carotenóides (xantofilas e carotenos) apresentou valores crescentes associados ao declínio da luminosidade (Figura 45). Os carotenóides são pigmentos fotoprotetores que auxiliam protegendo os complexos de captação de luz, por isso, proporcionalmente, estão mais concentrados nos tratamentos com maior incidência luminosa. Os valores encontrados nos tratamentos com 75, 50 e 25% de luminosidade foram superiores aos normalmente encontrados nas plantas do tipo C3, 4,2 -5,0 (LICHTENTHALER e BUSCHMANN, 2001).

4.5.3 Biomassa

Os resultados obtidos (Figuras 46 e 47) apresentaram valores crescentes de massa (raiz, caule e folha) em função do aumento da luminosidade. De fato, a luz é a fonte de energia do qual as plantas se aproveitam para crescer e realizar suas funções vitais, sendo, por isso, afetada intensamente nas condições de limitação de luminosidade (HELDT, 2005).

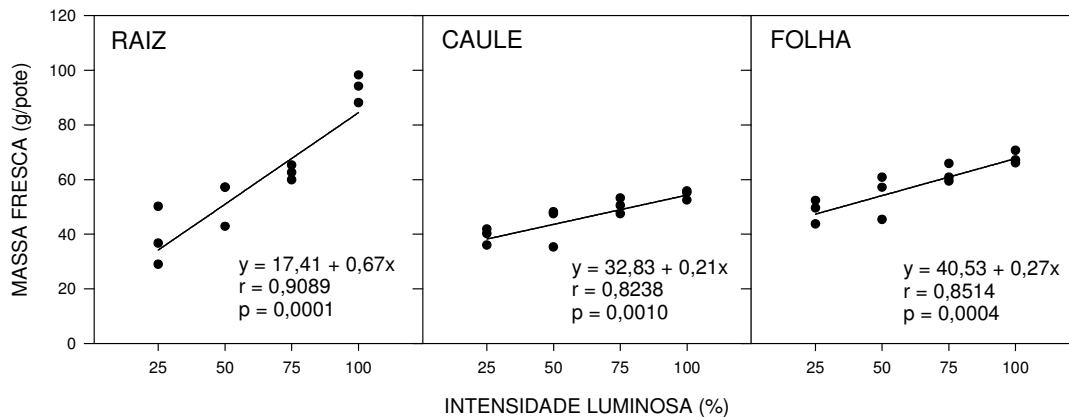


Figura 46. Biomassa de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%).

A produção de massa fresca é modulada por fatores ambientais e nutricionais, dentre os fatores ambientais a luminosidade e a temperatura do dia e da noite possuem forte influência (BUBOTT e LOOMIS *et al.*, 1966; CLARK e MENARY, 1980a). Do mesmo modo, a ausência ou a diminuição na disponibilidade de nutrientes afeta a partição e a produção de massa nos diferentes órgãos das plantas (FERNANDES e SOUZA, 2006; SOUZA, 2006).



Figura 47. Detalhes das plantas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%).

Contudo, neste experimento a disponibilidade de nutrientes não foi afetada, pois, utilizou-se a solução completa de HOAGLAND E ARNON (1950) com algumas modificações, conforme descrito na Tabela 1. Também, não foram observadas variações de temperatura (diurna e noturna) entre os tratamentos.

Outro resultado interessante mostra como a partição de fotoassimilados influencia na produção de biomassa nas diferentes partes da planta. Proporcionalmente, houve a diminuição na produção de raiz nos tratamentos com menor incidência de luz, ou seja, apresentaram a razão parte aérea/raiz mais alta (Figura 49).

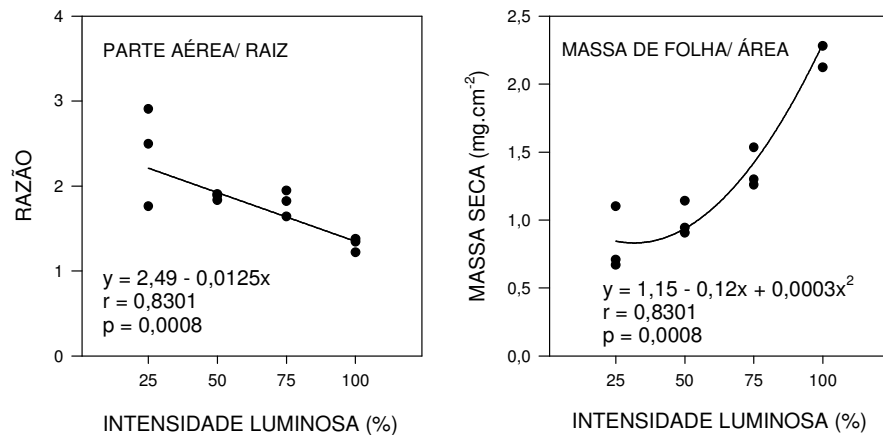


Figura 49. Razão parte aérea/ raiz e massa seca de folha por unidade de área em plantas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%).

Ocorreram também alterações morfofisiológicas na parte aérea da planta. Na Figura 47 pode ser observado com as plantas dos tratamentos com 25 e 50% de luminosidade estão com as folhas expandidas, com aspecto semi-decumbente e com coloração verde mais intensa que nos outros tratamentos.

A diferença na coloração está relacionada com o aumento na concentração de clorofilas em detrimento dos carotenóides (discutido no item 4.5.2.), a expansão das folhas é um artifício utilizado pelas plantas para aumentar a área de captação de luz e o aspecto semi-decumbente está associado ao estiolamento provocado pela baixa luminosidade ($< 200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

A limitação da luz durante o processo de expansão das folhas provoca a diminuição na espessura das mesmas, acarretando redução na massa por unidade de área, conforme apresentado na Figura 49.

4.5.4 Análise do material seco

A grande maioria do nitrogênio presente nas plantas está nos aminoácidos que compõem as proteínas. Deste modo, a partir do processo de absorção e assimilação até a síntese de proteínas muita energia é necessária. Por isso, é de se esperar que as plantas sob baixa luminosidade possuam menores teores de N-total. Porém, este resultado não foi encontrado, ao contrário, foram encontrados teores crescentes de N em função da diminuição da luminosidade (Figura 50).

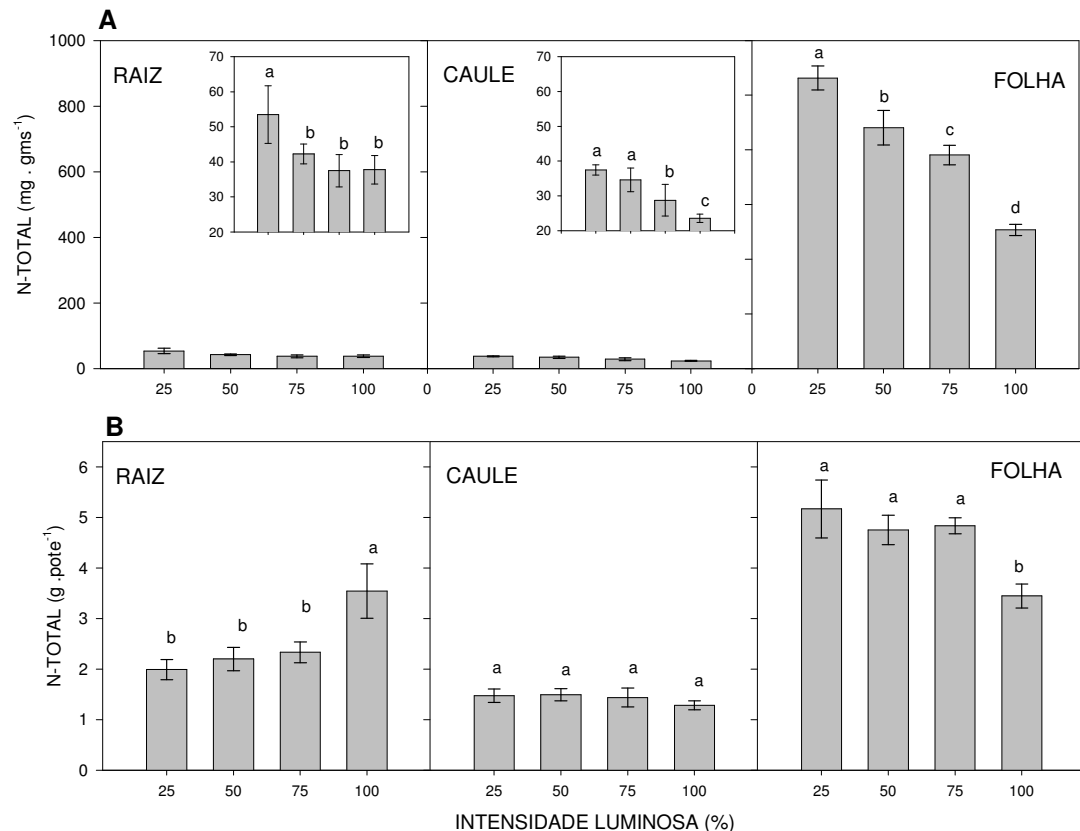


Figura 50. A) Teor (mg.gms^{-1}) e B) conteúdo (mg.pote^{-1}) de N-Total nas partes da plantas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

Uma possível justificativa para este resultado, se apóia no fato de as plantas sob baixa luminosidade investirem maior parte dos recursos energéticos na síntese de proteínas, possivelmente, relacionadas a captação (complexo antena) e processamento (fotosistemas) da energia luminosa e absorção e transporte de nutrientes nas raízes e nos caules, em detrimento do crescimento vegetativo.

Os teores de fósforo encontrados nos tecidos das plantas de *M. arvensis*, também, apresentaram crescimento associado a diminuição de luz, o qual pode ser igualmente justificado pelo aumento nos processos metabólicos nestas plantas (Figura 51).

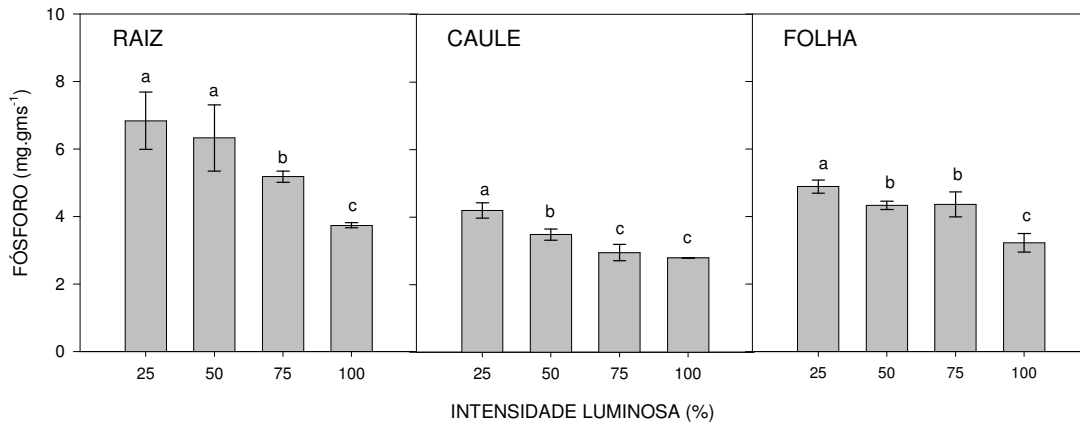


Figura 51. Teor (mg.gms⁻¹) de fosforo nas partes da plantas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

4.5.5 Análise das frações solúveis

Foram encontrados maiores teores de açúcares solúveis nos caules se comparado com as raízes e as folhas, indicando que este é um local de intenso trânsito de fotoassimilados entre os tecidos fonte e dreno (Figura 52). Foi encontrada também uma relação crescente entre a intensidade luminosa e o teor de açúcares solúveis, principalmente nas folhas e caules.

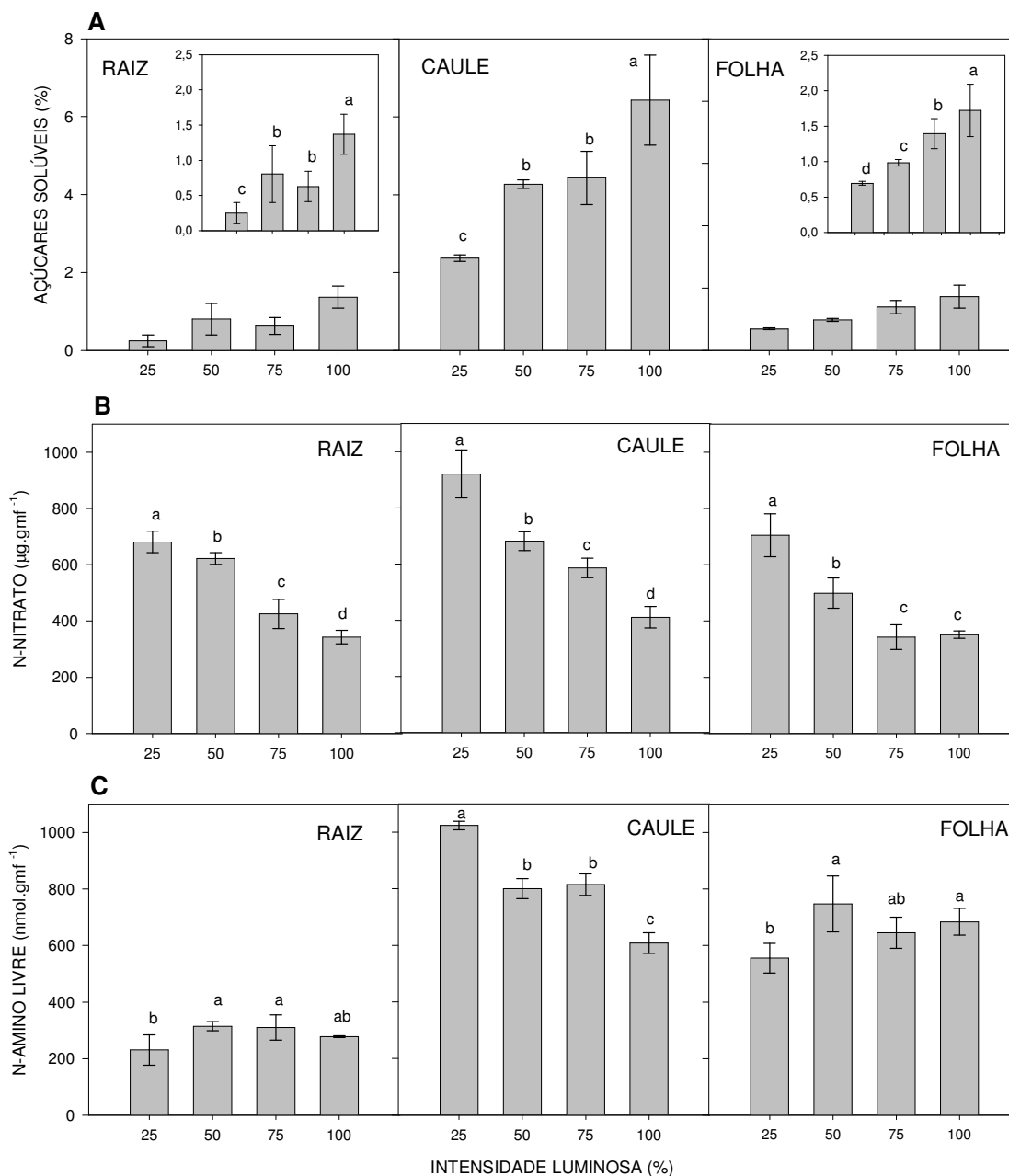


Figura 52. Teores de A) açúcares solúveis, B) N-Nitrato e C) N-aminos nas folhas, caules e raízes de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

Certamente, as plantas que possuem maior disponibilidade de luz tendem a apresentar maiores conteúdos de fotoassimilados, mas, essa relação nem sempre é verdadeira, pois, a interpretação correta depende de uma avaliação integrada do metabolismo vegetal.

Neste experimento não foi observada a correlação entre os valores de açúcares e N-amino nas folhas, entretanto, foi constatada uma correlação indireta entre os teores de açúcares solúveis e os de N-total, N-nitrato e a atividade da NR, os quais possibilitaram concluir que as plantas submetidas a níveis decrescentes de luminosidade tendem a investir os recursos energéticos na absorção e assimilação de N, visando, possivelmente, aumentar a

produção de proteínas associadas a captação e processamento da energia luminosa. Esta observação foi evidenciada com mais clareza nas folhas (Figura 53).

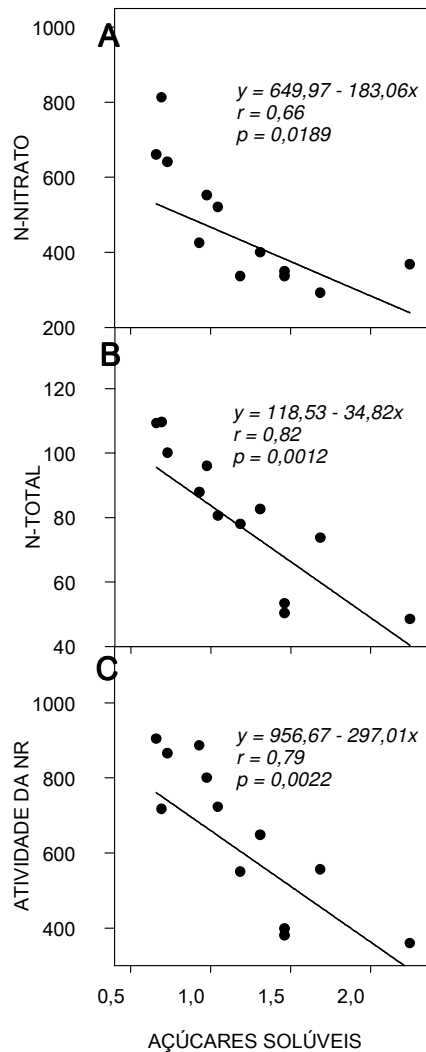


Figura 53. Correlação linear entre os teores de Açúcares Solúveis e os de A) N-Nitrato, B) N-total e C) atividade da NR nas folhas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%).

4.5.6 Atividade das enzimas nitrato redutases, glutamina sintetase e glutamato desidrogenase

Os resultados da atividade da NR encontrados nas folhas (Figura 54) estão em consonância com os resultados das frações solúveis (Figura 52), pois, foram observadas maiores atividades da NR nos tratamentos com menores intensidades luminosas, menores teores de açúcares solúveis e maiores teores de N-nitrato e N-total.

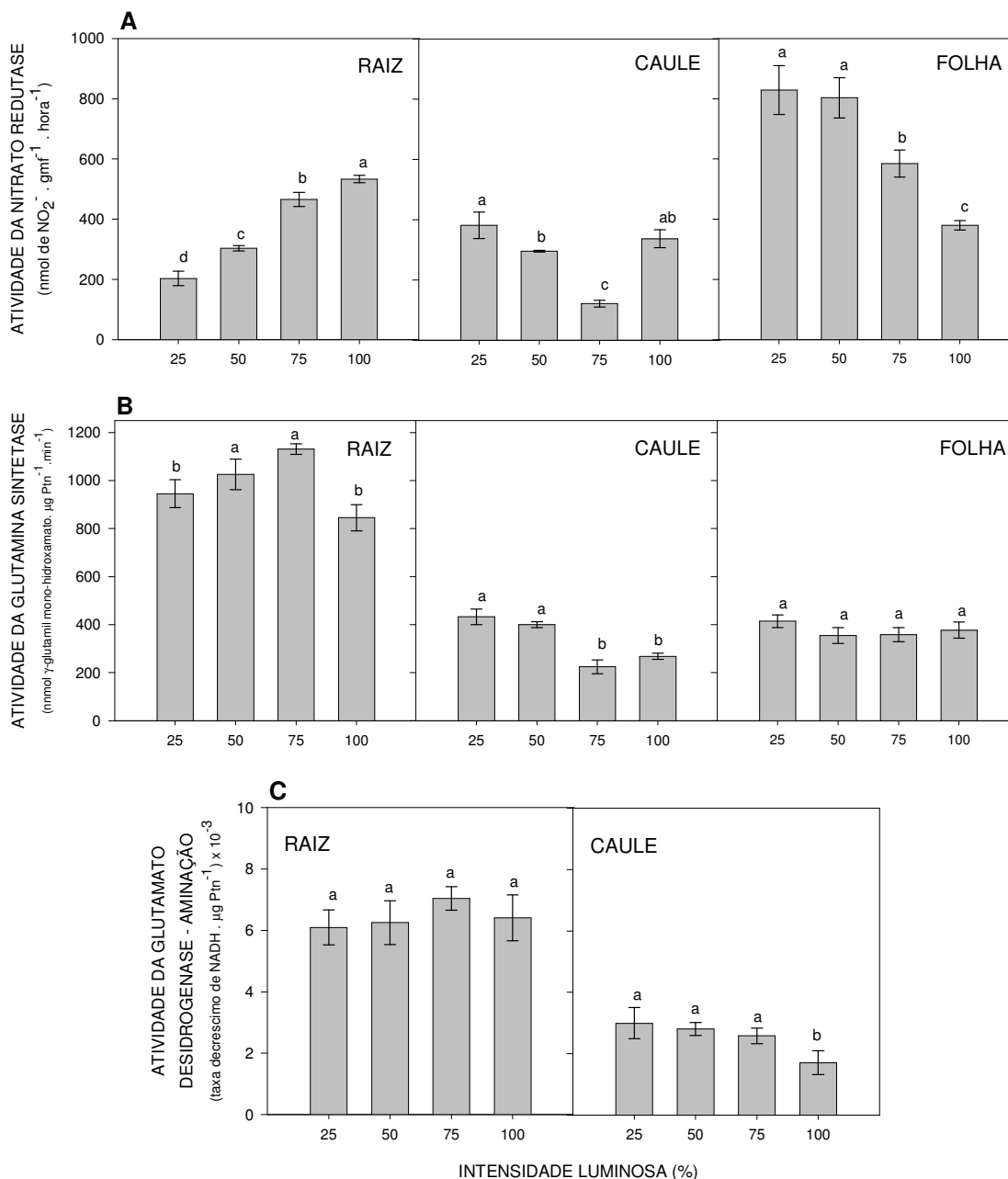


Figura 54. A) Atividade da nitrato redutase (NR), B) glutamina sintetase (GS) e C) glutamato desidrogenase – aminação (GDH) nas folhas, caules e raízes de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). Letras diferentes no mesmo gráfico resultam significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o desvio padrão das amostras.

Entretanto, esta relação não é a mesma nas raízes, pois, neste órgão a energia para o processo de absorção e redução vêm de recursos drenados dos tecidos fotossinteticamente ativos (folhas), tornando-se escassa nas raízes das plantas submetida a baixa luminosidade, que nestas condições realizam o processo de redução preferencialmente nas folhas.

Quanto ao processo da assimilação, pode-se notar que a atividade da GS é maior nas raízes que nos caules e folhas (Figura 54). A explicação para este resultado pode estar

relacionado com a disponibilidade de 2 mM N-NH₄⁺ na solução nutritiva, o qual deve estar estimulando a atividade da GS citossólica nas raízes.

Semelhante aos resultados da GS, os resultados encontrados para a atividade aminação da GDH mostraram-se superiores nas raízes (Figura 54). Nas folhas a atividade aminação da GDH não foi detectável, assim como as atividades desaminação da GDH e a atividade da GOGAT.

Nas condições experimentais propostas foram apresentadas maiores atividades das enzimas de assimilação nas raízes e de redução nas folhas o que justifica os altos conteúdos de açúcares solúveis nos caules (possivelmente de transporte) e baixos nas raízes e folha (Figura 52 e 54).

4.5.7 Estudo anatômico e histoquímico

Os tricomas secretores encontrados em ambas as faces da lamina foliar foram de dois tipos: peltados, formados por 10 células e capitados, formados por três células (Figura 50). Os tricomas secretores peltado são constituídos por uma célula basal, um pedúnculo unicelular, e uma cabeça composta por oito células secretoras, revestidas por cutícula delgada. Observa-se a presença de espaço subcuticular conspícuo preenchido por secreção. Nota-se que as paredes laterais das células do pedúnculo são mais espessas e impregnadas por substâncias lipídicas (Figura 55).

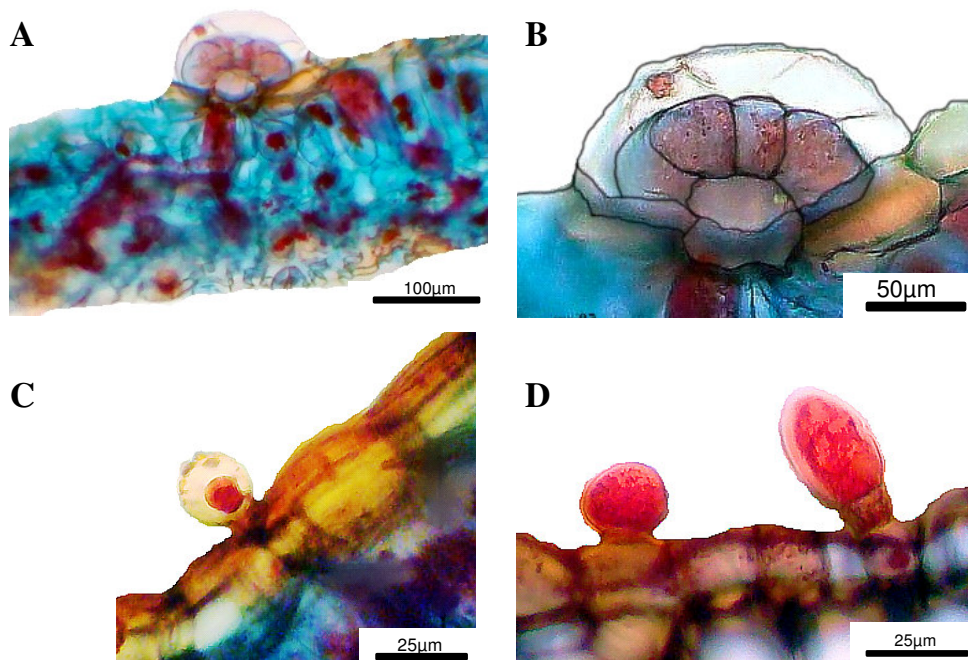


Figura 55. Tricomas secretores peltado (A e B) e capitado (C e D) presente nas folhas de *Mentha arvensis*, cultivar IAC 701. Imagem obtida por microscopia de luz no laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biologia (UFRRJ).

Os tricomas secretores capitado são constituídos por uma célula basal, um pedúnculo unicelular e uma cabeça secretora de forma globosa ou ovalada, revestidas por cutícula delgada. Nota-se que as paredes laterais das células do pedúnculo são mais espessas e impregnadas por substâncias lipídicas. O espaço subcuticular é pouco desenvolvido e apresenta-se preenchido por secreção (Figura 55).

A descrição anatômica dos tricomas secretores presentes nas plantas de *M. arvensis*, cultivar IAC 701, a qual foi utilizada neste experimento, estão em consonância com os resultados apresentados por outros autores (SHANKER *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 2000a; 2000b; MARTINS, 2002; MARTINS, 2003; SHARMA *et al.*, 2003).

Os testes histoquímicos revelaram a presença de substâncias lipofílicas, proteínas, substâncias fenólicas, polissacarídeo ácidos e neutros. As reações foram igualmente positivas no protoplasto das células dos tricomas peltados e capitados.

Segundo TURNER *et al.* (2000b) existe grande quantidade de depósito de substâncias lipofílicas e fenólicas no retículo endoplasmático e em vesículas, o que justificam os testes positivos para estas substâncias no protoplasma.

No espaço subcuticular de ambos tricomas nota-se numerosas gotas de material lipofílico compondo a secreção. Visualmente observa-se que a reação para as substâncias fenólicas e mais intensa no protoplasto das células dos tricomas capitados (Tabela 7).

Tabela 7. Histoquímica dos tricomas peltados e capitados. (-) reação negativa, (+) reação positiva e (++) reação mais intensa.

Reagentes	Substâncias identificadas	----- Reatividade -----			
		Peltado		Capitado	
		Citoplasma	Secreção	Citoplasma	Secreção
Sudan IV	Lipofílicas	+	+	+	+
Sudan Black B	Lipofílicas	+	+	+	+
Dicromato de potássio	Fenólicas	+	-	++	-
Vermelho de rutênio	Pécticas	+	-	+	-
Ác. periódico + Reagente de Schiff	Polissacarídeos neutros	+	-	+	-
Xylidine ponceau	Proteínas	+	-	+	-

Secreção – conteúdo presente no espaço subcuticular.

Estes resultados foram igualmente observados por outros autores em plantas representantes do gênero *Mentha* (MARTINS, 2002) e em outros espécimes da família *Lamiaceae* (GIULIANI e BINI, 2008).

Entretanto alguns autores descreveram que em plantas de *Mentha piperita* os tricomas capitados não apresentavam secreção de monoterpenos (BRUN, 1991), que a secreção dos tricomas capitado consiste principalmente de uma mistura de polissacarídeos, proteínas e lipídios (WERKER *et al.*, 1985, ASCENSÃO e PAIS, 1998; TURNER *et al.*, 2000a). Por outro lado, foi observado a presença de conteúdos de monoterpenos em tricomas capitados de *Mentha piperita* (AMELUNXEN *et al.*, 1969).

4.5.8 Densidade de tricomas

Folhas do 4° e 5° nó foram avaliadas quanto a concentração de tricomas secretores, em função da intensidade luminosa (25, 50, 75 e 100%) e os resultados obtidos mostraram que a diminuição da luminosidade provoca igualmente a redução na densidade de tricomas peltados e capitados, tanto na face adaxial quanto na abaxial (Figura 56).

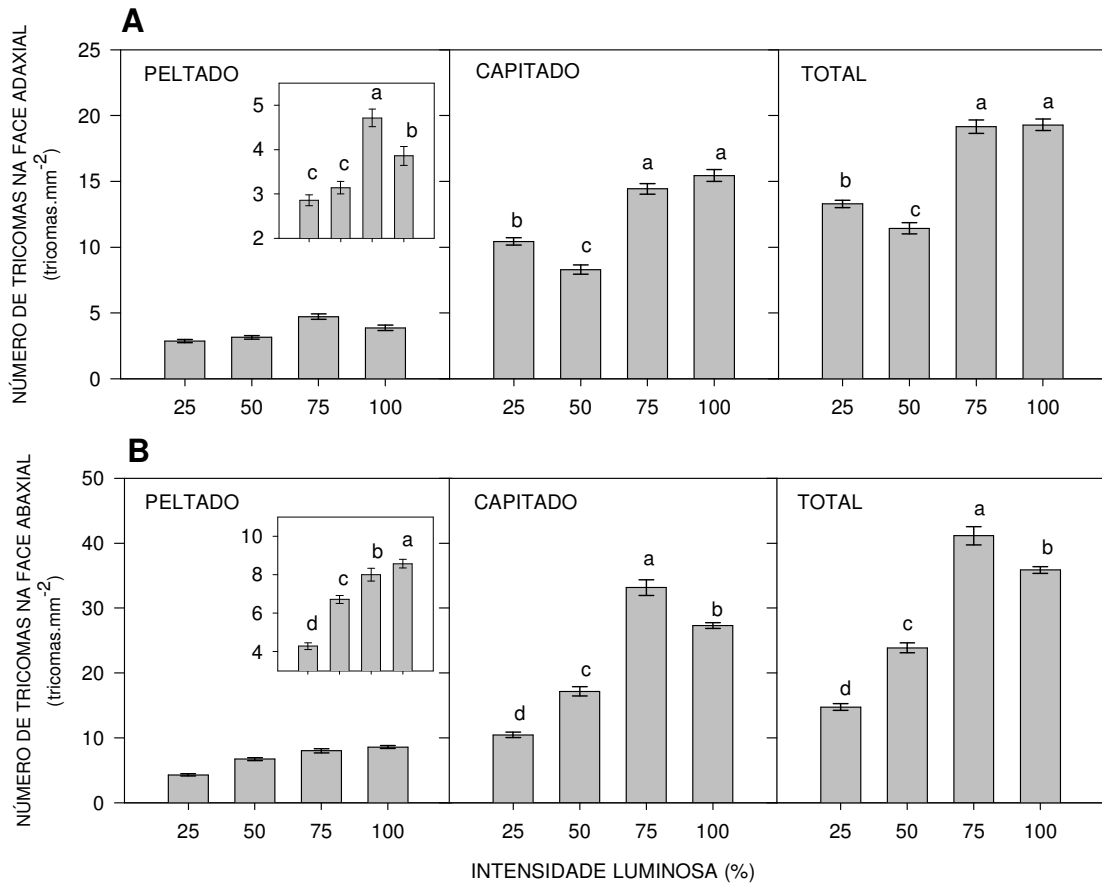


Figura 56. Densidade de tricomas secretores peltado e capitado nas face A) adaxial e B) abaxial das folhas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). Dados obtidos com auxílio de um microscópio de luz, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biologia (UFRRJ). Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o erro padrão das amostras.

Não foram encontrados trabalhos na literatura mostrando o efeito da luminosidade sobre a distribuição ou concentração de tricomas secretores, todavia, alguns trabalhos expuseram o efeito da qualidade de radiação sobre a variação de tricomas secretores (IOANNIDIS *et al.*, 2002).

Com relação a distribuição e concentração dos tricomas peltado e capitado nas faces das folhas, foi observado que a concentração é duas vezes maior na face abaxial (Figura 56) e diminui no sentido distal das folhas, em ambas as faces (Figura 57).

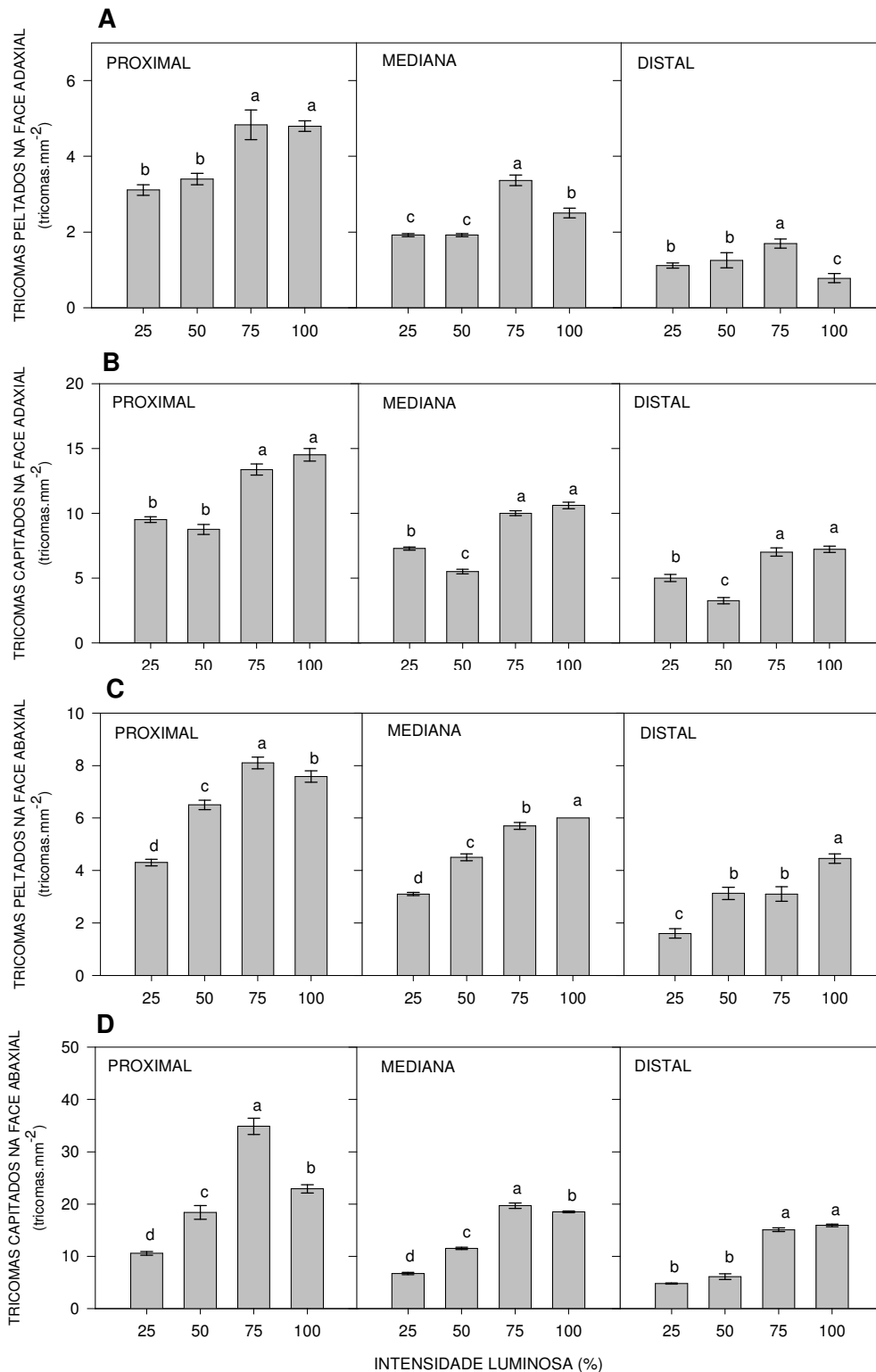


Figura 57. Densidade de tricomas secretores peltado e capitado nas faces adaxial (A e B) abaxial (C e D) em função das regiões proximal, mediana e distal das folhas de *M. arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). Dados obtidos no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biologia (UFRRJ). Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o erro padrão das amostras.

Estes resultados são semelhantes aos apresentados em plantas de *M. arvensis*, *M. spicata* e *M. aquática*, exceto em plantas de *M. piperita*, no qual a densidade de tricomas é maior na face adaxial (TURNER *et al.*, 2000b; MARTINS, 2002; DESCHAMPS *et al.*, 2006).

Outro resultado interessante diz respeito a diferença de concentração entre tricomas peltado e capitado (Figura 56 e 57), os quais não foram os mesmos encontrados para esta espécie na literatura. Diferentes trabalhos apontaram uma relação de quatro tricomas peltados para cada tricoma capitado (SHANKER *et al.*, 1999; SHARMA *et al.*, 2003). Neste trabalho a relação encontrada foi de três tricomas capitados para cada tricoma peltado.

4.5.9 Óleo essencial

O percentual de óleo essencial encontrado nas folhas foram maiores nos tratamentos com 100 e 75% de luminosidade e menores nos tratamentos com 50 e 25% de luminosidade (Figura 58). Alguns trabalhos demonstraram o efeito da luminosidade sobre a produção dos óleos essenciais.

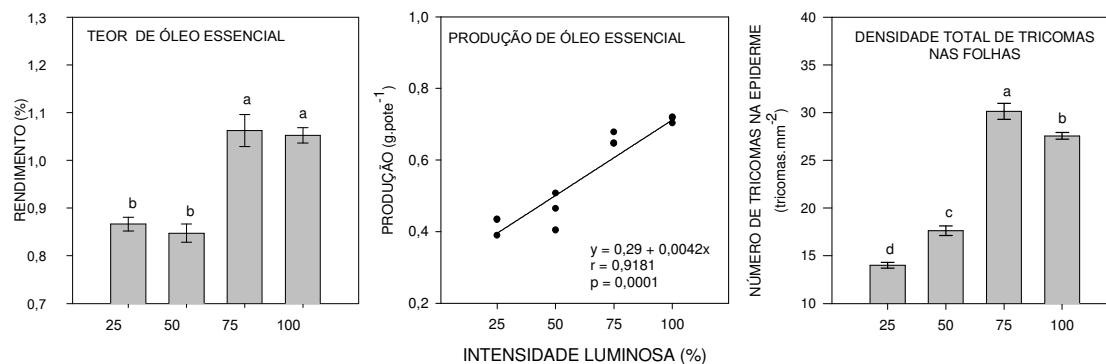


Figura 58. Teor do óleo essencial obtido por arraste com vapor d'água e densidade de tricomas secretores peltado e capitado nas folhas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%). Dados para densidade de tricomas obtidos com auxílio de um microscópio de luz, no laboratório de anatomia vegetal do instituto de biologia (UFRRJ). Letras diferentes no mesmo gráfico resultado significativo (Fisher LSD, 5%). As barras representam o erro padrão das amostras.

BURBOTT e LOOMIS (1967) observaram uma diminuição no rendimento de óleo essencial nas plantas de *M. piperita* submetidas a baixa intensidade luminosa. CLARK e MENARY (1980) constataram diminuição no rendimento de óleo essencial extraído das folhas de *M. piperita*, sob a influência dos tratamentos com 50 e 10% de luminosidade, em detrimento do tratamento com 100% de luminosidade.

O teor do óleo essencial encontrado neste trabalho, possivelmente, apresenta uma intensa relação com a densidade de tricomas secretores nas folhas de *M. arvensis* (Figura 58), de tal modo, que os gráficos possuem aspectos semelhantes.

Resultados similares foram obtidos por SHANKER *et al.* (1999) que relacionou o aumento e a diminuição na concentração de tricomas, durante a ontogenia da folha, com a elevação e posterior queda no teor do óleo essencial em plantas de *M. arvensis*.

Por outro lado, esta relação nem sempre é verdadeira, pois, DESCHAMPS *et al.* (2006) identificaram maior concentração de tricomas secretores nas folhas de *M. arvensis*, as quais produziram menor quantidade de óleo essencial.

Trabalhos apresentados anteriormente mostraram que a concentração de tricomas secretores varia em função da idade da folha (TURNER *et al.*, 2000a; 2000b). Por outro lado, o aumento na concentração de tricomas não garante que será produzida maior quantidade de óleo essencial, isto porque a produção depende da eficiência da planta em secretar este óleo para o espaço subcuticular.

Portanto, fica claro que a concentração de tricomas é um fator importante à produção, mas não é o único, outros fatores estão relacionados, entre eles, a eficiência no processo de biossíntese, o qual depende de características genéticas e das condições de cultivo, sobretudo a intensidade luminosa.

A relação das principais substâncias presentes nos óleos essenciais, em função dos tratamentos, está discriminada na Tabela 8. O perfil encontrado em todos os tratamentos condiz com um óleo essencial de *M. arvensis* com boa qualidade (Farm. Bras. II), ou seja, rico em mentol (mais que 40%), contendo acetato de mentila, mentona e no máximo 2% de pulegona.

Tabela 8. Percentual médio das substâncias presentes nas folhas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%).

¹ t _R	Substância	² IR	----- Tratamentos -----			
			100%	75%	50%	25%
10,055	<i>β</i> -pineno	985	0,15	0,13	0,15	0,15
10,317	mirceno	993	0,23	0,21	0,22	0,21
11,683	limoneno	1036	1,24	1,16	1,15	0,87
15,597	isopulegol	1158	0,50	0,49	0,51	0,51
15,855	mentona	1166	16,57	16,76	16,37	13,60
16,135	isomentona	1175	3,09	3,03	2,98	2,82
16,264	neomentol	1179	1,25	1,23	1,26	1,31
16,599	mentol	1190	66,53	66,52	67,29	69,39
18,406	pulegona	1250	0,36	0,31	0,33	0,20
18,899	piperitona	1266	2,78	2,86	2,82	2,72
19,803	acetato de mentila	1297	0,85	1,02	1,09	1,63
23,676	<i>β</i> -cariofileno	1435	0,79	0,66	0,59	0,58
25,317	germacreno D	1497	2,07	1,84	1,66	1,57
25,707	germacreno B	1512	0,30	0,35	0,32	0,22
<i>Monoterpenos cetônicos</i>			22,8	22,96	22,5	19,34
<i>Ésteres e alcools de monoterpenos</i>			69,13	69,26	70,15	72,84
<i>Sesquiterpenos</i>			3,16	2,85	2,57	2,37
Total			96,71	96,56	96,74	95,76

¹T_R, tempo de retenção (minutos). ²IR, (índice de retenção) medida relative ao *n*-alcanos (C₈-C₄₀) em coluna apolar conforme descrito no material e métodos

No gráfico de *scores*, pode ser observada a formação de agrupamentos, os quais representam amostras de um mesmo tratamento, ou seja, com um mesmo perfil químico (Figura 59A). O gráfico de *loadings* mostra a contribuição das substâncias para a formação de um perfil característico, que por sua vez promove a formação dos agrupamentos (Figura 59B).

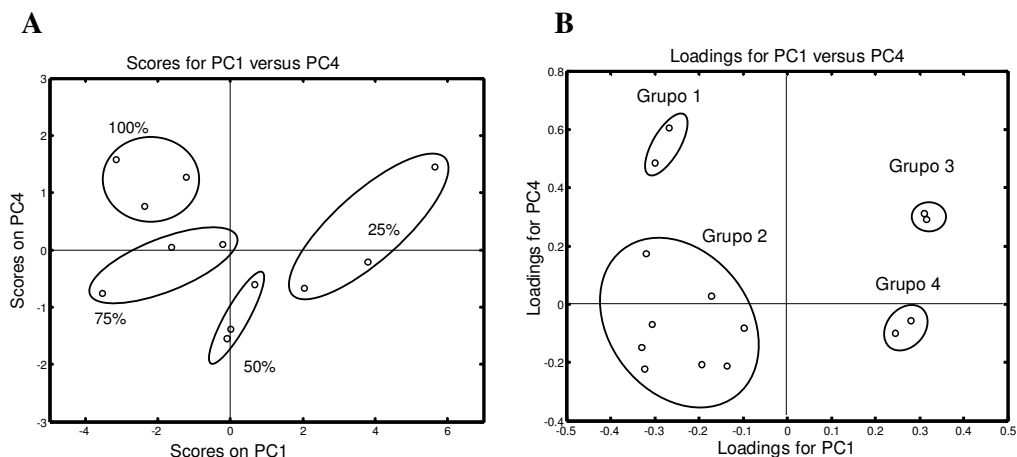


Figura 59. Avaliação do perfil cromatográfico (CG) dos óleos essenciais por meio da análise de componentes principais (PCA, 5%). A) Gráfico de scores mostra o agrupamento por semelhança no perfil cromatográfico. B) Gráfico de loadings mostra a participação de cada substância para a formação dos agrupamentos no gráfico de scores. Grupo 1: β -cariofileno, germacreno D. Grupo 2: β -pineno, mirceno, limoneno, mentona, iso-mentona, pulegona, piperitona, Germacreno B. Grupo 3: neomentol e mentol. Grupo 4: acetato de mentila e isopulegol. Óleo essencial extraído das folhas frescas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (25, 50, 75 e 100%).

As amostras de óleo essencial proveniente dos tratamentos com maior intensidade luminosa (100%) apresentaram conteúdos maiores de β -cariofileno e germacreno D e menores de acetato de mentila. Por outro lado, as amostras sob efeito dos tratamentos com menor intensidade luminosa apresentaram conteúdos mais elevados de neomentol, mentol e acetato de metila e menores de mentona e germacreno D e β -cariofileno.

Dentre as substâncias citadas neste trabalho, a variação no conteúdo de acetato de mentila é semelhante aos resultados apresentados por CLARK e MENARY (1980) que pesquisou o efeito de três intensidades luminosas em plantas de *M. piperita*.

Por outro lado, as substâncias pulegona e mentona apresentam variações parecidas com as apresentadas por BURBOTT e LOOMIS (1967) ao submeterem plantas de *M. piperita* a baixas intensidades luminosas.

4.5.9 Avaliação da expressão gênica¹

Neste trabalho foram avaliadas as expressões dos genes das enzimas envolvidas na síntese do mentol em plantas de *M. arvensis* sob efeito de diferentes intensidades luminosas, exceto os genes que codificam para as enzimas (+)-*cis*-isopulegona isomerase e mentofurano sintase.

Foram encontradas variações significativas na expressão dos genes, sendo que a diminuição da intensidade luminosa causou aumento na expressão dos genes que codificam para as enzimas (-)-limoneno sintase (LS), limoneno-3-hidroxilase (L3H), (-) -*trans*-isopiperitenol desidrogenase (IPD), (+)-pulegona redutase (PR) e (-)-mentona redutase (MR).

¹ Foram avaliadas as expressões dos genes sob o efeito dos tratamentos com 100, 75 e 50% de luminosidade, exceto o tratamento com 25% de luminosidade, isto porque, a concentração de RNA total extraída neste tratamento foi insuficiente para a síntese de cDNA.

Não foi observada variação significativa na expressão do gene que codifica para (-)-isopiperitenona redutase (IPR) (Figura 60).

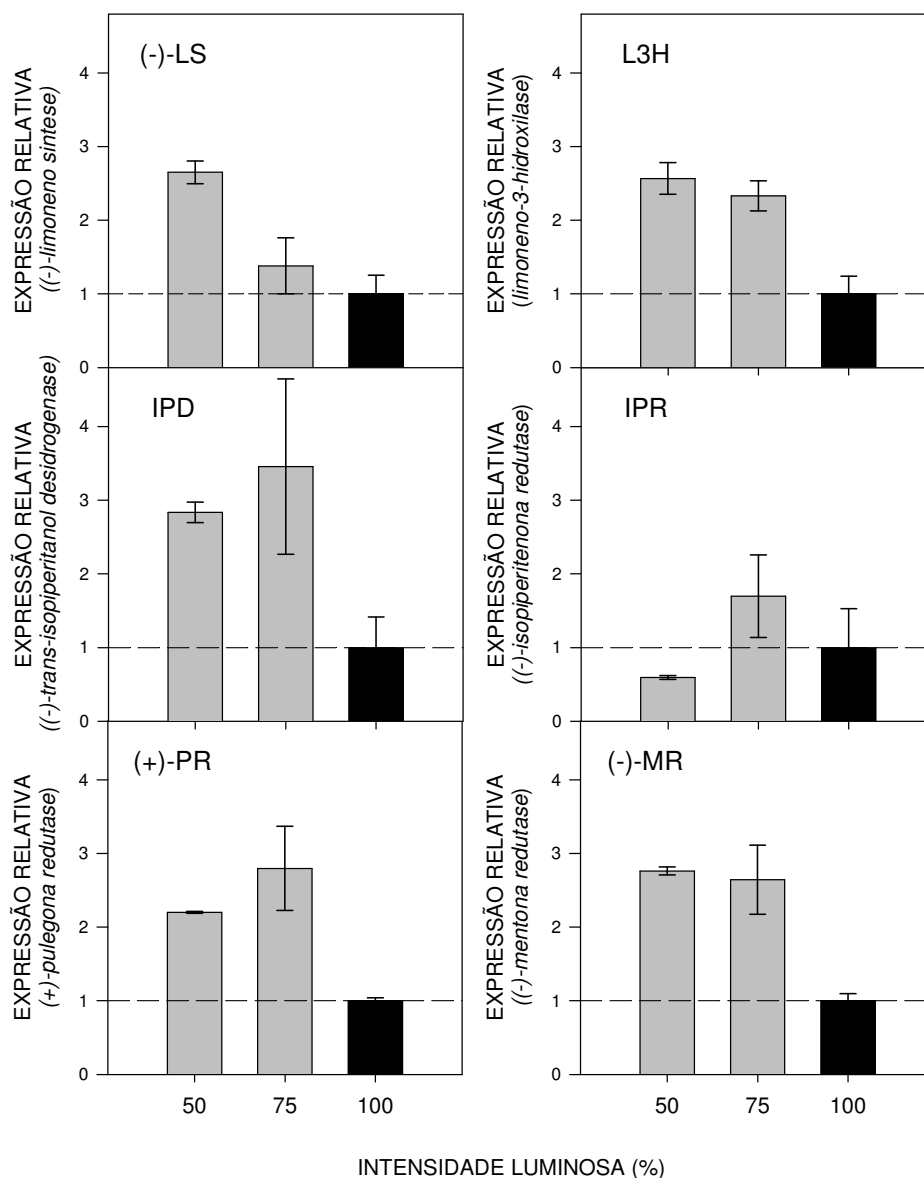


Figura 60. Expressão relativa dos genes que codificam para as enzimas (-)-limoneno sintase (LS), limoneno-3-hidroxilase (L3H), (-)-trans-isopiperitenol desidrogenase (IPD), (-)-isopiperitenona redutase (IPR), (+)-pulegona redutase (PR) e (-)-mentona redutase (MR) em plantas de *Mentha arvensis* (IAC-701) cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (50, 75 e 100%). Tratamento com 100% de intensidade luminosa (coluna preta) é o tratamento referência. Colunas acima ou abaixo da linha tracejada indicam aumento ou diminuição da expressão relativa. As barras representam o erro padrão das amostras.

Estes resultados são inéditos e não foram encontrados na literatura trabalhos que mostrem o efeito da intensidade luminosa sobre a expressão destes genes em plantas de *M. arvensis* ou em outras plantas do mesmo gênero, o que dificulta a discussão dos resultados.

Todavia, resultados apresentados por MCCONKEY *et al.* (2000) mostraram uma estreita afinidade entre os conteúdos de mentona e mentol no óleo essencial de *M. piperita*

com a atividade enzimática, abundância das enzimas e dos transcritos (RNA) em função da idade, indicando que a rota é controlada ao nível da expressão gênica.

O efeito da diminuição na intensidade luminosa provocou alterações metabólicas nas plantas que podem estar relacionados ao aumento da expressão dos genes da via de síntese do mentol (Figura 60 e 61). Do mesmo modo, foram observados também, aumento na atividade da NR (Figura 54), no teor de N-total (Figura 50) e nos teores de ésteres e alcools de monoterpenos, presentes nos óleos essenciais (Tabela 6), com a redução da luminosidade.

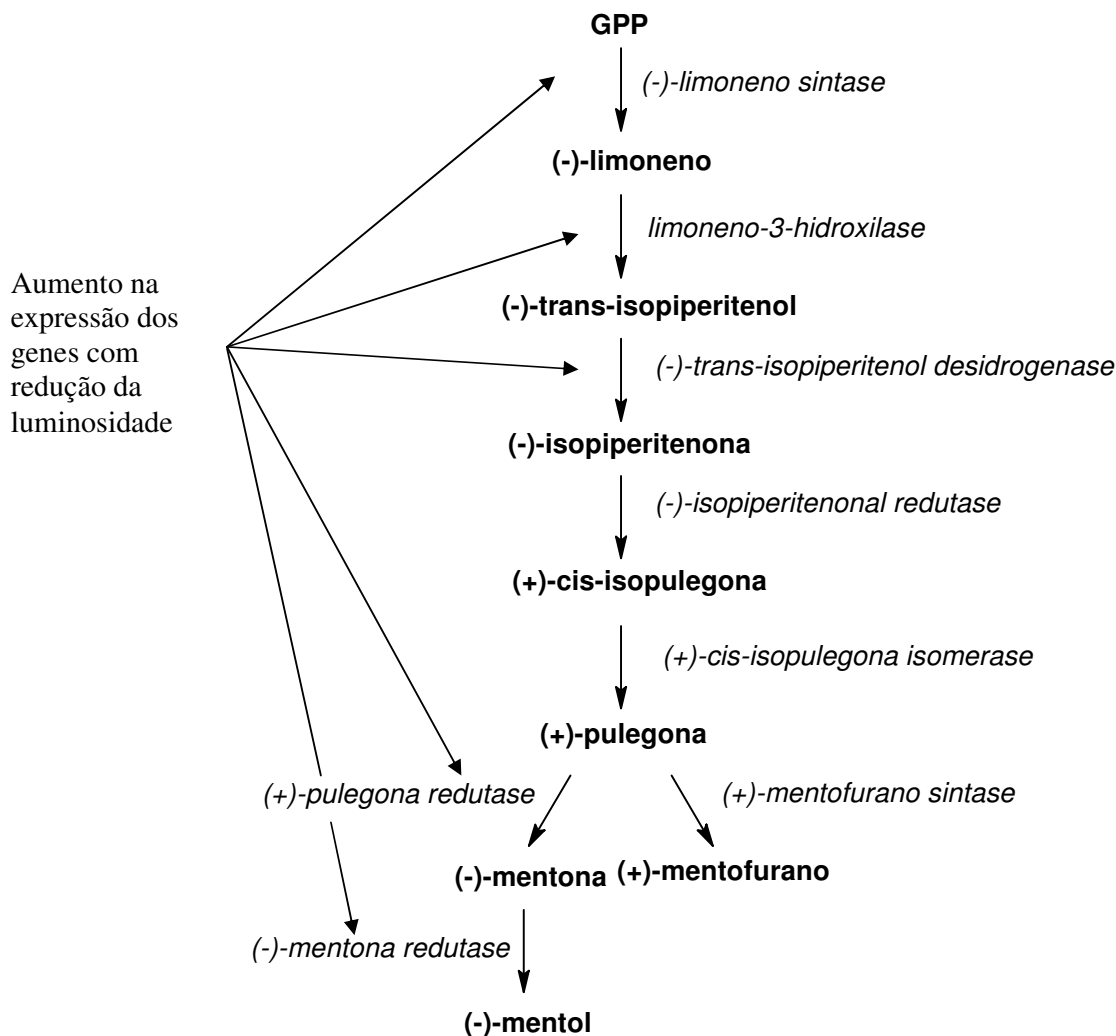


Figura 61. Associação entre o aumento na expressão dos genes que codificam para as enzimas envolvidas com a via de biossintese do mentol em plantas de *Mentha arvensis* cultivadas em sistema hidropônico por 43 dias e submetida a diferentes intensidades luminosas (100, 75 e 50%).

Por outro lado, a diminuição da intensidade luminosa promoveu a redução na densidade total de tricomas secretores e no rendimento (%) do óleo essencial (Figura 58), assim como, nos teores de açúcares solúveis (Figura 52A). Estes resultados são contrastantes com o aumento na expressão dos genes e sugerem que a luz pode estar promovendo um efeito indireto sobre a expressão dos mesmos.

Em plantas de *M. piperita*, cultivadas em condições naturais, a cada 2,4 dias uma nova folha é emitida (TURNER *et al.*, 2000a; 2000b). Em condições de sombreamento as folhas são emitidas com um intervalo maior e o processo de expansão foliar é mais demorado que em condições normais de luminosidade.

Deve-se ressaltar que o RNA utilizado para a análise da expressão gênica, neste trabalho, foi extraído das células secretoras das folhas do 4 e 5º nó, que sob o efeito dos tratamentos sofreram alterações fisiológicas que promoveram um processo de expansão foliar mais lento entre as folhas dos tratamentos, culminando em folhas com idades diferentes que, por sua vez, é o fator que afeta diretamente a expressão dos genes estudados (TURNER *et al.*, 2000b).

Alguns trabalhos de pesquisa mostraram que a densidade de tricomas (SHANKER *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 2000a; 2000b), a abundância e a atividade das enzimas da rota do mentol (MCCONKEY *et al.*, 2000) são controlados pela idade e pelo processo de expansão foliar, sendo 15 dias o pico máximo de atividade enzimática em plantas de *M. piperita* (CROTEAU *et al.*, 2005).

De fato, as plantas sob efeito do sombreamento estavam em estágio de maturidade superior se comparado as plantas não sombreadas, as quais estariam em um período de decréscimo da expressão, enquanto as folhas sombreadas estariam no período de aumento na expressão dos genes.

Outro ponto de vista deve ser considerado: diz respeito ao fluxo de energia que é necessário para suprir a síntese dos monoterpenos. É de se esperar que as plantas sob sombreamento tenham diminuição dos processos bioquímicos que levam a síntese dos monoterpenos, como a diminuição da transcrição, da tradução e da atividade das enzimas relacionadas com as vias metabólicas, uma vez que o fluxo de energia que chega até a planta é menor.

Por outro lado, neste trabalho foram apresentadas evidências de que a planta sob baixa incidência luminosa investe seus recursos energéticos limitados na síntese de proteínas (Figuras 50 e 54), evento bioquímico que ocorre após a transcrição gênica.

Portanto, o aumento na expressão dos genes pode ser uma estratégia da planta para aumentar a eficiência na síntese do óleo essencial e compensar a diminuição no número de tricomas secretores, tornando estes tricomas mais eficientes nos tratamentos sob baixa luminosidade. Que não significa que a planta vai produzir mais óleo essencial, uma vez que a produção não depende apenas da eficiência no processo de síntese, mas, também, da densidade de tricomas secretores.

Deste modo, é bastante provável que ou a expressão dos genes é afetada indiretamente pela intensidade luminosa e diretamente pelo processo de maturação foliar ou ambos os fatores atuam em sinergismo.

Além disso, o aumento na expressão dos seis genes de um total de oito que atuam na rota do mentol, sugere a presença de um fator de transcrição modulando a expressão dos genes. De fato, os fatores de transcrição são proteínas que atuam após um sinal exógeno ou endógeno a planta, ativando a expressão dos genes de uma rota metabólica e também de outras associadas.

SANTOS (2009) avaliou o efeito da superexpressão dos fatores de transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* sobre a eficiência de uso de nitrogênio em *Arabidopsis thaliana* e constatou que houve aumento na expressão dos genes envolvidos com a absorção e assimilação de N e das vias do metabolismo de C, responsáveis em suprir a demanda de carboidratos para a assimilação de N.

Trabalhos de pesquisa recentes com espécimes de *Mentha piperita* melhorados através da engenharia genética têm mostrado grandes avanços em produtividade e qualidade dos

óleos essenciais (MAHMOUD e CROTEAU, 2001, 2003 e MAHMOUD *et al.*, 2004), abrindo as portas para outras pesquisas com outras plantas aromáticas.

Os trabalhos em biologia molecular em plantas de *M.arvensis* ainda são incipientes e desprovidos de caráter aplicado ao aumento da qualidade e produtividade, principalmente no Brasil. Espera-se que a partir deste trabalho, seja estimulada a geração de novas pesquisas, que poderão se beneficiar das ferramentas e das técnicas adaptadas ao estudo biomolecular em planta *M. arvensis*.

5 CONCLUSÕES

Experimento 1:

A análise cromatográfica dos óleos essenciais obtidos por arraste com vapor de água foram os que apresentaram melhor perfil qualitativo. Dentre os solventes o diclorometano, éter etílico e o de petróleo foram os que apresentaram maior riqueza no perfil cromatográfico, com a presença das principais substâncias do óleo essencial de *M. arvensis*.

Experimento 2:

As folhas do quarto e quinto nó apresentaram características bioquímicas semelhantes após avaliação dos teores e a relação dos pigmentos fotosintéticos, assim como a atividade da nitrato redutase, mostrando que estas duas folhas podem ser utilizadas para análises bioquímicas de referência.

Experimento 3:

A produção de biomassa na parte aérea das plantas de *M. arvensis* apresentou uma distribuição quadrática nos valores permitindo identificar a concentração de 0,95 mM de P como a que permitirá maior produção de massa na parte aérea.

A solução com 1 mM de P foi a que produziu o óleo essencial com menor teor de pulegona, substância indesejada no óleo essencial. A dose de 2 mM de P na solução nutritiva proporcionou diminuição na produção de massa associado a sintomas de toxidez e a concentração de 0,05 mM de P provocou aumento excessivo de massa na raiz em detrimento da produção de massa na parte aérea.

Experimento 4:

Foi constatado que as folhas maduras (6° ao 8° nó) apresentaram maior teor de óleo essencial associado a um perfil de químico de melhor qualidade, com aumento nos teores de mentol e acetato de mentila, permitindo concluir que a idade é um fator importante para o amadurecimento do óleo essencial.

O procedimento de extração, isolamento e quantificação das cabeças secretoras foi adaptado a planta de *M. arvensis* com sucesso, proporcionando resultados semelhantes aos encontrados na literatura para outras espécies.

Experimento 5:

Foi constatado uma correlação linear positiva entre a intensidade luminosa e concentração de pigmentos, produção de biomassa, de óleo essencial e teores de açúcares solúveis e uma correlação negativa entre os teores de açúcares solúveis nas folhas com os teores de N-total, N-nitrato e atividade da nitrato redutase.

Constatou-se também que o fluxo de energia entre o tecido fonte e dreno tem relevante efeito na composição das frações solúveis, os quais possivelmente influenciam a produção e o perfil cromatográfico do óleo essencial.

Foi encontrada uma relação positiva entre o aumento da luminosidade e o aumento na concentração de tricomas secretores e no teor de óleos essenciais. Os testes histoquímicos comprovaram a presença de substâncias lipofílicas no citoplasma e na secreção dos tricomas capitado e peltado, justificando a secreção de óleos essenciais por estas estruturas.

A avaliação do perfil cromatográfico dos óleos essenciais em função da luminosidade permitiram concluir que a qualidade do óleo essencial é determinada pelas condições fisiológicas e a idade das folhas, assim como, a produção é dependente da eficiência de síntese e da densidade de tricomas nas folhas.

As composições químicas dos óleos essenciais obtidos das plantas de *M. arvensis* apresentaram elevado teor de mentol, teores adequados de mentona, acetato de mentila e teores aceitáveis de pulegona, conforme preconiza a Farm. Bras. II.

Foi possível definir que o sombreamento aumentou a expressão de seis entre os oito genes envolvidos com a rota de síntese do mentol, em plantas de *M. arvensis* e que as alterações na expressão podem estar relacionadas diretamente com a condição fisiológica das folhas, como por exemplo, a idade, o processo de expansão foliar e a disponibilidade de energia.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O procedimento para a extração e isolamento das células secretoras permitiu avaliar a expressão dos genes que codificam para as enzimas relacionadas com a síntese do mentol. Este foi o primeiro passo em direção ao desenvolvimento de novos procedimentos que possibilitarão compreender o funcionamento dessas vias de síntese.

A técnica de extração e isolamento é eficiente e permite o desenvolvimento de estudos bioquímicos e biomoleculares, do mais básico, como o estudo da expressão dos genes até os mais aplicados, como a construção de plantas melhoradas geneticamente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N.; PINTO, J.E.B.P.; FURTINI NETO, A.E.; BERTOLUCCI, S.K.V.; LADEIRA, A.GEROMEL, C. Nitrogênio e fósforo na produção vegetal e na indução de mucilagem em plantas de insulina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 536-540, dez. 2002.
- ACHNINE, L.; BLANCAFLOR, E. B.; RASMUSSEN, S.; DIXON, R. A. Colocalization of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase and Cinnamate 4-Hydroxylase for Metabolic Channeling in Phenylpropanoid Biosynthesis. **Plant Cell**, V.16, p. 3098, 2004.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy**. New York: Allured Publishing, 1995. 325p.
- ADAMS, S.; WEIDENBORNER, M. Mycelial deformations of *Cladosporium herbarum* due to the application of eugenol or carvacrol. **J. Essential Oil. Res.** v.8, p.535-540, 1996.
- ALMEIDA, E. R. **As plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, 1993. 339p.
- AMARAL, L. I. V., M. F. PEREIRA & A. L. CORTELAZZO. Formação das substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L. – *Bixaceae*). **Acta Botanica Brasilica**, v.15, p. 125-132, 2001.
- AMELUNXEN, F. Über den Nachweis des ätherischen Öls in isolierten Drüsenhaaren und Drüssenschuppen von *Mentha piperita* L. **Z. Pflanzen-physiol.** v. 61, p. 68-67, 1969.
- AMOROZO, M.C.M. A abordagem entobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C.(ed). **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. 1996. cap.5, p.47-68.
- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v.16, n.2, p.189-203, 2002
- ANELLI, A. et al . Quimioterapia versus melhor tratamento de suporte em câncer de pulmão estágio clínico IV não metastático para o sistema nervoso central. **Rev. Hosp. Clin.** v. 56, n. 2, 2001.
- ASCENÇÃO, L. e PAIS, M.S. The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastucture and secretion. **Ann. Bot.** v. 75, p. 263-271, 1998.
- AYRES, D.; LOIKE, J.D. **Lignans. Chemical, biological and clinical properties**. Cambridge: University of Cambridge, 1990. 402p.
- BACCHI, E.M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L.C.(ed). **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, cap.12, p.169-186, 1996.
- BARATA, L.E.S.; BAKER, P.M.; GOTILIEB, O.R; RUVEDA, E.A. *Neolignans from Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 783-786, 1978.
- BARBOSA FILHO, J.M. Lignanas, neolignanas e seus análogos. In: SIMÕES, C.M.O et al. (ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001. Cap.22, p. 481-498.
- BELKHODJA, R. et al. Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiol.**, v. 104, n. 2, p. 667-673, 1994.
- BETIOL, W. Resultado de pesquisa com métodos alternativos para o controle de Doenças de plantas. In: HEIN, M. (ed). **Resumo do 1º encontro de processos de proteção de plantas:**

- controle ecológico de pragas e doenças.** Botucatu, SP: Editora agroecológica, 2001. cap.13, p.125-135.
- BIGGS, D.R.; WELLE, R.; GRISEBACH, H. Intracellular localization of prenyltransferases of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis in bean and soybean. **Planta**. v. 181, p. 244-248, 1990.
- BIZZO, H.R. ; HOVELL, A.M.C. ;REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quím. Nova**. v.32, p. 588, 2009.
- BLANK, A.F.; COSTA, A.G.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; INNECCO, R.; EHLERT, P.A.D.; SOUZA, I.F. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Rev. bras. farmacogn.** v. 17, p. 557, 2007
- BLUMENTHAL, M. (Ed.) **The complete german Comission E monographs.** Austin/Boston: American Botanical Council/Integrative Medicine, 1998.
- BORGES, E.A. **Absorção, acúmulo e remobilização de nitrogênio em variedades de milho (Zea Mays L.).** 2004. 67p. Tese (PhD. em Agronomia, Ciência do Solo). Insytuto de Agronomia, Departamento de Solos, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2004.
- BORN, G. C. C. Plantas medicinais da Mata Atlântica (Vale do Ribeira – SP): extrativismo e sustentabilidade. **Tese de Doutorado.** São Paulo: Universidade de São Paulo. 2000.
- BOUDET, A.M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry** v.68, p. 2722, 2007.
- BOWYER, J.R.; LEEGOOD, R.C. Photosynthesis. **In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. Plant Biochemistry.** Acad. Press. 1997. cap.10, p.49-104.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAMLEY. P.M. Isoprenoid metabolism. **In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. Plant Biochemistry.** Acad. Press. 1997. cap.11, p.417-437.
- BRASIL. Decreto no. 5813 de 22.06.2006. Decreta a aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, 22.06.2006b. disponível na internet na página <http://www.barsil.gov.br> capturado em 13.07.2006.
- BRASIL. Estado de São Paulo. Projeto de Lei no 174 de 2005. Cria o Programa Estadual de Fitoterápicos, Plantas Medicinais e Aromáticas. Diário Oficial do Estado de São Paulo, 13.04.2005. Disponível na internet na página <<http://www.ibpm.org.br>> capturado em 13.07.2006.
- BRASIL. Estado do Rio de Janeiro. Secretaria Estadual de Saúde. Lei no 2.537 de 16.04.1996. Cria o Programa Estadual de Plantas Medicinais. Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro, 17.04.1997. Disponível na internet na página <<http://www.ibpm.org.br>> capturado em 13.07.2006.
- BRASIL. Estado do Rio de Janeiro. Secretaria Estadual de Saúde. Resolução no 1.590 de 12.02.2001 Aprova regulamento técnico para a prática da fitoterapia e funcionamento dos serviços de fitoterapia no âmbito do estado do rio de janeiro. Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro, 18.03.2004. Disponível na internet na página <<http://www.ibpm.org.br>> capturado em 13.07.2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa de Desenvolvimento das Plantas Medicinais – Flora Medicinal. Disponível na internet na página <<http://www.agricultura.gov>>, capturado em 07.10.2006a.

- BRUGNERA, A.; CARDOSO D.; BOUERI, M.A. e MALUF, W.R. **Cultivo e propriedades medicinais da hortelã**. Boletim Técnico de Hortaliças. n.34, Julho, 1999. Disponível em: <<http://www3.ufla.br/~wrmaluf/bth034/bth034.html>>. Acesso em 10 jan. 2006.
- BRUN, N.; VOIRIN, B. Chemical and morphological studies of the effects of ageing on monoterpenes composition in *Mentha x piperita* leaves. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.2271-2278, 1991.
- BUCHER, C. A. ; SOUZA, S.R ; FERNANDES, M.S . Effects of Fusicoccin and Vanadate on Proton Extrusion and Potassium Uptake by Rice. **Journal of Plant Nutrition**, v.70, p.533-539, 2004.
- BUCHER, C. A. MATIA, G. C. S. ; NICOMEDES JUNIOR, J; ARAÚJO; O. J. L.; STARK; E. M. L. M; FERNANDES, M. S.; SOUZA S. R. Frações nitrogenadas e açúcares solúveis nas partes de Pimenta longa cultivada sob duas doses de N-NO₃. In: Anais da Fertbio 2002, 2002. Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro:UFRRJ, 2002. 1 CD
- BUKATASCH, F.Bemerkungem zur doppel far burng Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v.6, p.255, 1972.
- BURBOTT, A.J; LOOMIS, W.D. Effects of Light and Temperature on the Monoterpenes of Peppermint. **Plant Physiol.** v. 42, p. 20, 1967.
- CASTELLANE, P.D.; ARAUJO, J.A.C. de. **Cultivo sem solo: hidroponia**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 43p.
- CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L. E. & YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, US, v.6, p.853-855, 1975.
- CECONI, DE. et al Exigência nutricional de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) à adubação fosfatada. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 1, p. 25-32, 2007.
- CHALFOUN, S. M. & CARVALHO, V. D. de. Efeito do extrato e óleo de alho (óleo industrial) sobre o desenvolvimento de fungos. **Fitopatol. bras.** v.12, p.230-231.1987a.
- CHALFOUN, S. M. & CARVALHO, V. D. Inibição do crescimento do miscelial de *Giberella zeae* (*Fusarium graminearum*) através de tratamentos com extrato de alho e fungicida captafol. **Fitopatol. Bras.** v.12, p.232-233. 1987b.
- CHENG A.X.; LOU Y.G.; MAO Y.B.; LU S.; WANG L.J.; CHEN X.Y. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. **J. Integr. Plant Biol.**, v. 49, p. 179, 2007.
- CLARK, R. J.; MENARY, R. C. Environmental effects on peppermint (*M. piperita* L.) effect of day length, photon flux density, night and day temperature on yield and composition of peppermint oil. **Aust. J. Plant. Physiology.** v.67, p.685-692, 1980.
- COMETTI, N.N. **Nutrição Mineral da Alface (*Lactuca sativa* L.) em Cultura Hidropônica - Sistema NFT**. 2003, 106p. Tese (PhD. em Agronomia, Ciência do Solo). Insytuto de Agronomia, Departamento de Solos, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2003
- CORRÊA JÚNIOR, C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2ª ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162 p.
- CORTELAZZO, A. L. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 15, p. 157-162, 1992.

- CORTELLAZO, A. L. & VIDAL, B. C. Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 14, p. 27-34, 1991.
- CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, v.4, n. 23, p. 54-63, 1986.
- CROTEAU, R. Biosynthesis and Catabolism of Monoterpenoids. **Chemical Reviews**. U.S.A., v.87, n.5 p.929-954, 1987.
- CROTEAU, R. Site of Monoterpene Biosynthesis in *Majorana hortensis* Leaves. **Plant Physiology**. v. 59, p. 519-520, 1977.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M. E LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (ed). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: American Society of Plant Biologists, 2000. Cap.24, p.1250-1318.
- CROTEAU, R.B.; DAVIS, E.M.; RINGER, K.L.; WILDUNG, E.M. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. **Naturwissenschaften**, v. 92, p. 562–577, 2005.
- CROTEAU, R.; WINTERS, J.N. Demonstration of the intercellular compartmentation of 1-menthone metabolism in peppermint (*Mentha piperita*) leaves. **Plant Physiol.** v. 69, p. 975-977, 1982.
- CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H., BATISTA, M.A. Plantas medicinais: plantas medicinais e alelopatia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.3, n.15, p.28-34, 2000.
- CUNHA, A.P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia**. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf> Acessado em 19 dez. 2005.
- CUTER, E.G. **Anatomia vegetal: Parte I, célula e tecidos**. 2ª.ed, São Paulo: Roca, 1986. 2v. 304p.
- CZEPAK, MP. Produção de óleo bruto e mentol cristalizável em oito frequências de colheita da menta (*Mentha arvensis* L.). In: MING, L.C. et al. (ed) **Plantas medicinais aromática e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. 2v. 238p.
- D'HARLINGUE, A.; CAMARA, I. Plastid enzymes of terpenoid biosynthesis purification and characterization of tocopherol methyltransferase from capsicum chromoplasts. v.260, n.28, p.15200-15203, 1985.
- DAVIS, E. D.; RINGER, K. L.; McCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. Monoterpene metabolism. Cloning, expression and characterization of menthone reductases from peppermint. **Plant physiology**, v.137, p.873-881, 2005.
- DEFFUNE, G. Fitoalexinas e resistência sistêmica vegetal: a explicação dos defensivos naturais. **Agroecologia Hoje**, v.1, n.06, p.6-8, 2001.
- DeMORAES, C.M.; MESCHEER, M.C.; TUMLINSON, J. H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. **Nature**. v.410, p.577–580, 2001.
- DESCHAMPS, C.; ZANATTA, J. L.; ROSWALKA, L.; OLIVEIRA, M. C.; BIZZO, H. R., ALQUINI, Y. Densidade de tricomas glandulares e produção de óleo essencial em *Mentha arvensis* L., *Mentha x piperita* L. e *Mentha cf. aquatica* L. **Ciência e Natura**, v. 28, p. 23. 2006.
- DESTRO, MWB, SPERANZINI, MB, DESTRO, C. Estudo da utilização no pré-operatório de medicamentos ou drogas fitoterápicas que alteram a coagulação sanguínea. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 33, n. 2, p.107-111, 2006.
- DEWICK, P.M. The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. **Nat. Prod. Rep.**, v. 16, p. 97, 1999.

- DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant Biochemistry**. Acad. Press. 1997. 554 p.
- DI STASI, L.C. Arte, ciência e magia. In: ---. **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. 1996. Cap.1, p.15-22.
- DI STASI, L.C. Conceitos Básicos na Pesquisa de Plantas medicinais. In: ---. **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. 1996. Cap. 2, p.23-28.
- DI STASI, L.C. **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. 323p.
- DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: ---. **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. 1996. Cap. 9, p.109-128.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica**. 2.ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. 604p
- DIAS, T.A. Medicinal plants in Brazil. In: **Newsletter-G-15 Gene Banks for Medicinal & Aromatic Plants**. n.7/8, 1995. p. 4.
- DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-Induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v.7, p. 1085-1097, 1995.
- DOHERTY, J.E.; KANE, J.J. Clinical pharmacology of digitalis glycosides. **Annual Review of Medicine**, v.26, p. 159-171, 1975.
- DRAGAR, V.A.; MENARY, R.C. Mineral nutrition of *Olearia phlogopappa*: effect on growth, essential oil yield, and composition. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.26, n.7/8, p.1299-1313, 1995.
- DREW, S.W.; DEMAIN, A.L. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 343-356, 1977.
- DURDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**. v. 135, p. 1893-1902, 2004.
- ECHEVERRIGARAY, E; ANDRADE, L.B; DELAMARE, A.P.L; ZENI, A.L.B; CARRER, R. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: **SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J;L. (ed.). Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. cap.7, p.257-278.
- EISENREICH, W.; SAGNER, S.; ZENK, M.H.; BACHER, A. Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. **Tetrahedron Letters**. v.38, p. 3889-3892, 1997.
- ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001.Cap. 6, p.91-104. 2001.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 2005. 400p.
- FACCHINI, P.J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 29-66, 2001.
- FALKENBERG, M.B. Quinonas. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001.Cap.25, p. 555-580.

- FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. In: BERGSEN, F. J. Ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**, 1980.
- FAROOQI, A.H.A.; SANGWAN, N.S. e SANGWAN, R.S. Effect of different photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in *Mentha* species. **Plant Growth Regulation**, v.29, p.181-187, 1999.
- FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49, 1980, 1977.
- FERNANDES, M. S. N carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v.33, n.3, p.297-301, 1984.
- FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Transporte no floema. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora GuanabaraKoogan. Cap.6, p.179-197. 2004.
- FERNANDES, P.C.; FACANALI, R.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; MARQUES, M.O.M. Cultivo de manjeriço em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.260-264, abril-junho 2004.
- FERNANDES, M.S. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio sobre a absorção e assimilação de N em arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, n.1, p.1-6, 1990.
- FERREIRA, S.H. (org.). Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**, 1998. 141p.
- FERRER, J.L; AUSTIN, M.B.; STEWART J., C.; NOEL, J.P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 356, 2008.
- FISCHER, K.; WEBER, A. Transport of carbon in non-green plastids. **Trends in Plant Science**, v.7, n.8, p. 345-351, 2002.
- FREIRE, MFI; SOUZA, SR; BERBARA, RLL; ABREU, HS. *Vernonia scorpioides* (lam.) Pers. Asteraceae - determinação de fatores nutricionais relacionados a produção de princípio ativo. **Floresta e Ambiente**. v.5, n.1, p.135-138, 1998.
- FREITAS, M.S.M; MARTINS, M.A. e VIEIRA, L.J.C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.9, p.887-894, set. 2004.
- FURLAN, M.R. Aspectos agronômicos em plantas medicinais. In: DI STASI, L.C.(ed). **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. 1996. Cap. 11, p.157-168.
- FURLAN, MARCOS ROBERTO. **Cultivo de Plantas Mediciniais**. Coleção Agroindústria, 13. Cuiabá, Mato Grosso: Edição SEBRAE, 1998. 137p.
- FURLANI, P.R. et al. Nutrição mineral de hortaliças, preparo e manejo de soluções nutritivas. **Inf. Agropec.**, Belo Horizonte, v.20, n.200/201, p.90-98, 1999.
- FURLANI, P.R.; SILVEIRA, L.C.P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIM, V. Cultivo hidropônico de plantas. Campinas: Instituto Agronômico. **Boletim técnico 180**. 1999. 52p.
- GABE, M. **Techniques Histologiques**. Masson & Cie, Paris, 1968.
- GABRIEL, A. J. A. ; LIMA, M. E. F. ; SOUZA, M. A. A. ; SOUZA, S. R. . Germinação de sementes de alface e de duas ervas invasoras com a aplicação de um novo análogo do estrigol, sintetizado a partir do safrol. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.20, n.4, p.544-546, 2002.

- GANG, D. R.; WANG, J.; DUDAREVA, N.; NAM, K. H.; SIMON, J. E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiology**, v.125, p. 539–555, 2001.
- GARCIA, E.S. et al. Fitoterápicos. In: CANHOS, V.P. (ed.). **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas**. Campinas: BDT, Cap.10. 1994. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/>>. Acesso em 21 set. 2005.
- GARLET, T.M.B; SANTOSI, O.S.; MEDEIROS, S.L.P.; MANFRON, P.A.; GARCIA, D.C.; BORCIONI, E.; FLEIG, V. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. **Ciência Rural**, v. 37, p. 956, 2007.
- GERSHENZON, J.; DUFFY, M.A.; KARP, F.; CROTEAU, R. Mechanized techniques for the selective extraction of enzymes from plant epidermal glands **Analytical Biochemistry**. 163:159-164, 1987.
- GERSHENZON, J.; MCCASKILL, D.; RAJAONARIVONY, J.I.M.; MIHALIAK, C.; KARP, F.; CROTEAU, R. Isolation of secretory cell from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and gland products. **Analytical biochemistry**, v. 200, p. 130-138, 1992.
- GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M.E. e CROTEAU, R.B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**. v. 122, p. 205-213, jan. 2000.
- GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. 1. ed. Jaguariúna-SP: **EMBRAPA Meio Ambiente**, 2000, 78 p.
- GOBBO-NETO, L. e LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, p. 374, 2007.
- GONZAGA, D.S.O.M. & RODRIGUES, V.G. **Hortelã-pimenta: Mentha piperita L.** Folder 09, Série Plantas Medicinais. Brasília: EMBRAPA. Disponível em: <http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/infotec/hortela_pim.PDF>. Acesso em 10 jan. 2006.
- GOTTLIEB, O. R. Evolução química vegetal. **Ciência e Cultura**, v.39, p.357-360, 1987.
- GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIN, M.R.M.B. **Biodiversidade: Um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1996. 268p.
- GOTTLIEB, OR AND BORIN, MRM. Quantitative Chemobiology: A Guide into the Understanding of Plant Bioactivity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.13, n.6, p.772-776, out. 2002.
- GUARIM NETO, G. A importância da flora amazônica para uso medicinal. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.15, p.159-161, suplemento, 1997.
- GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; ZACARONI, L.M.; LIMA, R.K.; PIMENTEL, F.A.; MORAIS, A.R. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Quím. Nova**, v. 31, o. 1476, 2008.
- HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y. Alkaloid biogenesis: Molecular Aspects. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 257-285, 1994.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins): as drugs and medicines: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, v.59, p. 205-215, 1996.
- HEIN, M. (ed). Resumo do 1º encontro de processos de proteção de plantas: controle ecológico de pragas e doenças. Botucatu, SP. **Editora agroecológica**. 2001. 196p.
- HELDT, H.W. **Plant Biochemistry**. 3a. ed. Elsevier: Amsterdam, 2005.

- HENRIQUES, T.A.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001. Cap.29, p. 651-666.
- HEZARI, M.; CROTEAU, R. Taxol: biosynthesis; a update. **Planta médica**, v.63, p. 291-295, 1997.
- HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canda Journal Botanic**. v.57, p.1332-1334, 1979.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental**. Stn. Bull, v.347, p.1-32, jan. 1950.
- INSTITUTO NACIONAL DE COLONIZAÇÃO E REFORMA AGRÁRIA. **Mercosul investe em fitoterápicos para Agricultura Familiar**. Notícias. Brasília, DF. Setembro de 2004. Disponível em: <<http://www.incra.gov.br/noticias/news/>>. Acesso em 19 set. 2005.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical Biophysical Research. Communication**, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. W. H. Freeman & Co, San Francisco. 1962.
- JHA, S.; SANYAL, D.; GHOSH, B.; JHA, T.B. improved taxol yield in cell suspension culture of *Taxus wallichiana* (Himalayan Yew). **Planta Medica**, v. 64, p. 270-272, 1998.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. MacGraw-Hill, New York.
- JUNIOR, WG; TEIXEIRA, NT; ALMEIDA, FD; JANINI, MJDM. Cultivo orgânico, mineral, organo-mineral e hidropônico do Manjeriço. In: Fertbio 2004. Lages. **Anais...** Santa Catarina: SBCS, Suplemento. 2004.
- KANEHISA, M., ARAKI, M., GOTO, S., HATTORI, M., HIRAKAWA, M., ITOH, M., KATAYAMA, T., KAWASHIMA, S., OKUDA, S., TOKIMATSU, T., AND YAMANISHI, Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. **Nucleic Acids Res**. v. 36, p. 480, 2008.
- KAROUSOU, R.; GRAMMATIKOPOULOS, G; LANARAS, T.; MANETAS, Y. e KOKKINI, S. Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oils. **Phytochemistry**. v. 49, n. 8, p. 2273-2277. 1998
- KEENE, C.K. and WAGNER, G.J. Direct Demonstration of Duvatrienediol Biosynthesis in Glandular Heads of Tobacco Trichomes. **Plant Physiology**. 79:1026-1032, 1985
- KELLY, R.A.; SMITH, W.T. tratamento farmacológico da insuficiência cardíaca. In: GILMAN, A.G. et al. (ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996. cap. 34, p. 595-615.
- KOKKINI, S.; HANLIDOU, E. e KAROUSOU, R. Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. **J. Essent. Oil Res.**, v.16, p.588-593. Nov./Dec., 2004.
- KOTHARI, R. The Indian Essential Oil Industry. **Perfumer & Flavorist**, v. 30, p. 46, 2005
- KOTHARI, S.K.; SINGH, V.; SINGH, K. Effect of rates and method of P application on herb and oil yields and nutrient concentrations in Japanese mint (*Mentha arvensis* L.). **Journal of Agricultural Science**, v.108, n.3, p.691-693, jun. 1987.
- KUSTER, R.M. & ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001.Cap.21, p. 461-480.

- KUTCHAN, T.M. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 292, 2005
- LA WRENCE, B.M. Chemical components of labiatae oils and their exploitation. In: HARLEY, R.M.; REYNOLDS, T. (ed.). **Advances in Labiatae science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 399-436.
- LANGE, B.M., KETCHUM, R.E.B.; CROTEAU, R.B. Isoprenoid biosynthesis. Metabolite profiling of peppermint oil gland secretory cells and application to herbicide target analysis. **Plant Physiol**, v. 127, n. 1, p. 305–314, 2001.
- LANGE, B.M.; WILDUNG, M.R.; STAUBER, E.J.; SANCHEZ, C.; POUCHNIK, D.; CROTEAU, R. Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. **PNAS**, v. 97, p. 2934, 2000.
- LAULE, O.; FÜRHOHL, A.; CHANG, H.S; ZHU, T.; WANG, X.; HEIFETZ, P.B.; GRUISSEM, W.; LANGE, M. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **PNAS**, v. 100, p. 6866, 2003.
- LEÃO, M.G.; RIBEIRO, K.L.M.S. **Plano municipal de desenvolvimento rural comodoro: Sub-projeto de plantas medicinais**. Cuiabá, MT. Brasil. 1999. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/finalcomodoro.pdf>>. Acesso em 15 set. 2005.
- LEITE, S. N. **Além da medicação: A contribuição da fitoterapia para a saúde pública**. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. 2000.
- LICHTENTHALER, H.K. The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 50, p. 47–65, 1999.
- LICHTENTHALER, H.K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, suplement 1, p. 1-8, 2001.
- LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C. e CRUZ, A.V.M. Influencia dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**. v.10, n.2, p.71-77, ago./dez. 2003.
- LIMA, L. D. A produção de insulina humana por engenharia genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 28, 2001.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods.**, v. 25, p. 402, 2001.
- LORETO, F.; PINELLI, P.; MANES, F.; KOLLIST, H. Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. **Tree Physiol.** v.24, p.361–367, 2004.
- LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiol.** v.127, p.781–1787, 2001.
- LOURENZO, D. et al. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Brazilian Archives of biology and technology**. v.45, n.4, p.519-524. dez. 2002.
- LUCAS, W. J. Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 7; p. 673-680, 1995.
- MACRAE, W.D.; TOWERS, G.H.N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v. 23, n. 6, p. 1207-1220, 1984.

- MAFFEI, M. ; CODIGNOLA, A. Photosynthesis, photorespiration and herbicide effect on terpene production in peppermint (*Mentha piperita* L.). **J. Essential. Oil. Res.** v.2, p275-286, 1990.
- MAGALHÃES, P. M. de. **O caminho medicinal das plantas: aspectos sobre o cultivo.** São Paulo: CPQBA-UNICAMP, 1997. 127p.
- MAHMOUD, S. S. and CROTEAU, R. B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 100, p. 14481, 2003.
- MAHMOUD, S. S. and CROTEAU, R. B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 98, p. 8915, 2001.
- MAHMOUD, S. S.; WILLIAMS, M. and CROTEAU, R. B. Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. **Phytochemistry**, v. 65, p. 547, 2004.
- MAIA, NB. Efeito da nutrição mineral na qualidade do óleo essencial da menta (*Mentha arvensis*) Cultivada em solução nutritiva. In: MING, L.C. et al. (ed.) et **Plantas medicinais aromática e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica.** Botucatu: UNESP, 1998. 2v. 238p
- MAIA, NB; CARMELLO, QAC; MARQUES, MOM. Sistema automático de fornecimento de solução nutritiva para cultivo hidropônico de plantas em vasos. **Sci. agric.** Piracicaba. v.56, n.1, p.00-00, jan. 1999.
- MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário: otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.2, n.10, p.24-28, 1999.
- MARQUES, L.C., **Produção e comercialização de fitoterápicos no Paraná: Uma abordagem de vigilância sanitária.** 1992. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1992.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELELLANI, D.C. **Plantas medicinais.** Viçosa, MG: Edição Imprensa Universitária/UFV, 1995. 220 p.
- MARTINS, M.B.G. Estudos de Microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata* x *Suaveolens* (Lamiaceae). **Bragantia**. Campinas, v.61, n.3, p.205-218, 2002.
- MARTINS, P.M. **Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão.** 2000. 77p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- MATOS, F.J. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades.** 3. ed. Fortaleza, CE: Editora da UFCE. 1998. 220p.
- MATTOS, J.K. de A. Tendências fitotécnicas e econômicas de espécies vegetais utilizadas na medicina popular. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.15, p.161-162, Palestra. Suplemento. 1997.
- MAU, C.J.D., CROTEAU, R. Cytochrome P450 oxygenases of monoterpene metabolism **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2, pp. 373-383, 2006.
- MAZUTTI, M.; BELEDELLI, B.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. Caracterização química de extratos de *Ocimum basilicum* L. obtidos através de extração com CO₂ a altas pressões. **Quim. Nova**, v. 29, p. 1198, 2006.

- MAZZA, C. A. et al. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. **Plant Physiol.**, v. 122, n. 1, p. 117-126, 2000.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**. Brasília, v.26, n.2, p.231-238, jun. 2003
- MCCASKILL, D. AND CROTEAU, R. Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 653, 1999.
- MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. **Planta**, v. 197, p. 49, 1995.
- MCCASKILL, D.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). **Planta**. v.187, n.4, p.445-454, 1992.
- MCCONKEY, M.E.; GERSHENZON, J. e CROTEAU, R.B. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. **Plant Physiology**. v.122, p.215-223, Jan. 2000.
- MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, v.7, p. 1015-1026, 1995.
- MELLO, J.C.P. & SANTOS, C.S. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001.Cap.24, p. 527-554.
- MING, L.C., FIGUEIREDO, R.O., MACHADO, S.R., ANDRADE, R.M.C. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.) Poaceae. **Acta Horticulturae**, n.426, p.555-559, 1996.
- MOTA, J.H. et al. Produção de alface americana em função da aplicação de doses e fontes de fósforo. **Hort. Bras.**, v. 21, n. 4, p. 620-622, 2003.
- MOYNA, P & MENÉNDEZ, P. Biotransformação de produtos naturais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J;L. (ed.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. Cap.5, p.201-226.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 02 setembro 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: Worth publishers. 3ed. 2000.
- NEVES, M.C.M. **Plantas medicinais: diagnóstico e gestão**. Série meio ambiente em debate. v.35. Brasília: Ed. IBAMA, 2001. 52p.
- OCAMPOS, R.K.; LAURA, V.A.; CHAVES, F.C.M. Efeito de diferentes formas de adubação em hortelã rasteira: biomassa e teor de óleo essencial. In: Congresso Brasileiro de Olericultura. 2002. Uberlândia. **Resumos...** Minas Gerais: SOB/Horticultura Brasileira, v.20, n.2, Suplemento 2, jul. 2002. 1 CD.
- OKUDA, T; YOSHIDA, T; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plant. **Phytochemistry**, v.32, p. 507-521, 1993.
- OLIVEIRA, A.P. et al. Rendimento de coentro cultivado com doses crescentes de N. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.1, p.81-83, mar. 2003.

- OLIVEIRA, J. G.; ALVES, P. L. C. A.; MAGALHÃES, A. C. The effect of chilling on the photosynthetic activith in coffe (*Coffea arabica* L.) seedlings. The protective action of chloroplastid pigments. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 14, n. 2, p. 95-104, 2002.
- OLIVEIRA, JEZ; AMARAL, CLF E CASALI, VWD. **Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas medicinais.** Disponível em: <http://www.cpatna.embrapa.br/livrorg/medicinasmelhoramento.doc>. Acesso em 12 set. 2004.
- OLIVEIRA, V.A. et al. Efeito da adubação mineral e orgânica sobre a produção de biomassa e óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* Stapf). **Pro Homine.** Lavras/UNILAVRAS, v.1, n.1, p.24-27, 2002.
- OPARKA, K. J.; CRUZ, S.S. The great escape: phloem transport and unloadin of macromolecules. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.**, v.51; p.323-347, 2000.
- PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology** v. 100, n. 1-2 p. 50-52, 2005.
- PAULUS, D.; SANTOS, O.S.; MEDEIROS, S.L.P.; RIFFEL, C.; BORCIONI, E.; FABBRIN, E.G. Teor e qualidade de óleo essencial de menta em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n2, junho 2004 – Suplemento CD-ROM.
- PEARSE, A. G. E. 1980. **Histochemistry theoretical and applied**, v.2, 4th ed. London: Longman Press.
- PENONI, S. A. **Modificações na Composição Química e Atividade Antibacteriana de Duas Cultivares de Alho (*Allium sativum* L.) Durante o Armazenamento Pós-Colheita em Condições Ambientais.** 1993. 111p. Dissertação (Mestrado em agronomia). Escola Superior de Agricultura de Lavras, MG, 1993.
- PENTEADO, S.R. A utilização dos defensivos alternativos na agricultura: histórico e perspectivas. In: HEIN, M. (ed). **Resumo do 1º encontro de processos de proteção de plantas: controle ecológico de pragas e doenças.** Botucatu, SP.: Editora agroecológica. 2001. cap. 2, p.13-21.
- PETROVICK, P.R; MARQUESB, L.C.; PAULA, I. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. **J. Ethnopharmacology.** v.66, p.51-55, 1999.
- PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001
- PHILLIPSON, J.D., 1999. New drugs from nature – it could be yew. **Phytotherapy Research**, v.13, n.1, p. 2-8, 1999.
- PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology.** v.5, n.3, p. 237-243, 2002.
- PICHERSKY, E.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p.808-811, 2006.
- PIÑA-RODRIGUES, F.C.M; LOPES, B.M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v.8, n.1, p.130-136, 2001.
- PIRES, N.M. et al. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Scientia Agrícola.** São Paulo, v.58, n.1, p.61-65, 2001.
- PLETSCH, M. Compostos Naturais Biologicamente Ativos: Aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.1, n. 04, p.12-15, 1998.

POLANCZYK et al., 2004 revista biotecnologia

PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A.; KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.975, p. 384-394, 1989.

PRASZNA, L. & BERNÁTH, J. Correlations between the limited level of nutrition and essential oil production of peppermint. **Acta Horticulture**, n.344, p.278-289, 1993.

PRATES, H.T.; PAES, J.M.V.; PIRES, N.M.; PEREIRA FILHO, I.A.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 909-914, 2000.

RAJESWARA RAO, B.R. Biomass and essential oil yields of cornmint (*Mentha arvensis* L. f. *piperascens* Malinvaud ex Holmes) planted in different months in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, v. 10, p. 107, 1999.

RATES, S.M.K. & BIRIDI, R. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001.Cap.26, p. 581-606.

RECH, E. Biotecnologia: modernas técnicas de engenharia genética unem setores em prol do desenvolvimento nacional. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.37, p. 02, 2007/08.

REINHARD, J.; SRIVIVASAN, M. V.; ZHANG, S. Scent-triggered navigation in honeybees. **Nature**, v.427, p.411, 2004.

REIS, M.S. & MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001.Cap.4, p. 41-62.

RIBEIRO, L.F.; BEDENDO, I.P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1267-1271, out./dez. 1999. Suplemento.

RODEN, J. S.; BALL, M. C. The effect of elevated [CO₂] on growth and photosynthesis of two eucalyptus species exposed to high temperatures and water deficits. **Plant Physiol.**, v. 111, n. 3, p. 909-919, 1996.

RODRIGUES, C.R.; FAQUIN, V.; PINTO, J.E.B.P.; NEVES, O.S.C. Efeito de concentrações de P na solução nutritiva sobre o crescimento da menta (*Mentha piperita* L.). **Horticultura Brasileira**, v.20, n. 2, julho 2002a. Suplemento 2.

RODRIGUES, C.R.; FAQUIN, V.; TREVISAN, D.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; RODRIGUES, T.M. Nutrição mineral, crescimento e teor de óleo essencial da menta em solução nutritiva sob diferentes concentrações de fósforo e épocas de coleta **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.573-578, jul-set 2004.

RODRIGUES, C.R. et al. Efeito da relação NO₃⁻:NH₄⁺ e concentrações de K na solução nutritiva sobre o crescimento da menta (*Mentha piperita* L.). **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, Suplemento 2. jul. 2002b.

RODRÍGUEZ, F.J.M & MÉNDEZ, J.B.J. La medicina tradicional en las universidades médicas. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v.2, n.1, p.35-41, jan. 1997

RUIZ DEL CASTILLO, M.L.; BLANCH, G.P. e HERRAIZ, M. Natural variability of the enantiomeric composition of bioactive chiral terpenes in *Mentha piperita*. **Journal of Chromatography**, v.1054, p.87-93, dez. 2004.

- RUIZ-MEDRANO, R.; XOCONOSTLE-CÁZARES; B.; LUCAS, W. J. The phloem as a conduit for inter-organ communication. **Current Opinion in Plant Biology**. v.4, p.202–209, 2001.
- SACRAMENTO, L.V.S. & CAMPOS, M.J.B. Cultivo de hortelã: produção de matéria seca e marcha de absorção de cálcio. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, Suplemento 2, jul. 2002.
- SAITO, M. L; LUCHINI, F. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, 46p.
- SANDES, A.R.R. & DI BLASI, R. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética: Aspectos Relacionados com a Propriedade Intelectual no Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.13, p.28, mar./abr. 2000.
- SANGANERIA, S. Vibrant India. **Perfumer & Flavorist.**, v. 30, p. 24, 2005.
- SANGWAN, N.; VERMAN, B.; VERMA, K.; DHINDSA, K. Nematicidal activity of some essential plant oils. **Pest. Sci**. v.28, p.331-335, 1990.
- SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.
- SANT SANGANERIA. **Perfumer and flavorist** v.30, p. 24, 2005.
- SANTOS, A.S.; ALVES, S.M; FIGUEREDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. Embrapa 2004. disponível em: <http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online/comunicado-tecnico/2004/descricao-de-sistema-e-de-metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais-e-determinacao-de-umidade-de-biomassa-em-laboratorio-com-tec-99>. Acesso em: 2 de dezembro de 2009.
- SANTOS, L.A . **Efeito da superexpressão dos fatores de transcrição ZmDof1 e OsDof25 sobre a eficiência de uso de nitrogênio em Arabidopsis**. 2009. 81f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.
- SANTOS, M.M.F.B. Efeito do extrato de duas formas de Lippia allba sobre o fungo Colletotrichum gloeosporioides (penz.), isolados de Citrus. In: MING, L.C. et al. **Plantas medicinais e aromáticas: avanços na pesquisa agronômica**. Botucatu: UNESP, 1998, p.193-217.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001.Cap.16, p.333-364.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.35, p.275-280. mai. 2004.
- SAVASTANO, M.A.P. & DI STASI, L.C. Folclore: conceitos e metodologia. In: DI STASI, L.C.(ed). **Plantas Medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. 1996. cap.4, p.37-46.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p. 3875-3883, 1991.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P.R. produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC. cap. 15, p.301-332. 2001.
- SERAFINI, L.A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (ed.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. Cap.9, p.333-378.

- SHAH, S.P.J.; ROGERS, L.J. Compartmentation of terpenoid biosynthesis in green plants: a proposed route of acetyl-coenzyme a synthesis in maize chloroplasts. **Biochem. J.**, v. 114, p. 395-395, 1969.
- SHANKER, S.; AJAYKUMAR, P. V.; SANGWAN, N. S.; KUMAR, S.; SANGWAN, R. S. Essential Oil Gland Number and Ultrastructure During *Mentha arvensis* Leaf Ontogeny. **Biol. Plant.**, v. 42, p. 379, 1999.
- SHARKEY, T. D.; CHEN, X. Y.; YEH, S. Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 2001–2006, 2001
- SHARMA, S.; SANGWAN, N.S. AND SANGWAN, R.S. Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. **Current Science**, v. 84, p. 544, 2003.
- SILVA, E. B. **Uso das plantas medicinais pelos moradores do Engenho Uchôa**. Recife, 1997. 49p.
- SIMÕES, C.M.O. & SCHENKEL, E.P. **A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia**. Ministério do desenvolvimento Ind. e Com: Brasil/Brasília. 2001. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011219_08.pdf>. Acesso em 19 set. 2005.
- SIMÕES, C.M.O. & SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001. Cap.18, p. 397-425.
- SINGH J.N.; SINGH, D.P. Effect of phosphorus deficiency on carbohydrate metabolism of *Mentha arvensis*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.21, p.1341-1347, dez. 1968.
- SINGH, A.K.; RAINA, V.K.; NAQVI, A.A.; PATRA, N.K. ; BIRENDRA KUMAR; RAM, P. ; KHANUJA, S.P.S. Essential oil composition and chemoarrays of menthol mint (*Mentha arvensis* L. f. *piperascens* Malinvaud ex. Holmes) cultivars. **Flavour and Fragr.J.** **2005**, 20, 302.
- SLONE, J.H. and KELSEY, R.G. Isolation and Purification of Glandular Secretory Cells from *Artemisia Tridentata* (ssp. *Vaseyana*) by Percoll Density Gradient Centrifugation. **American Journal of Botany**. v. 72, p. 1445-1451, 1985.
- SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v.132, p.1-45, jan. 1996.
- SOARES, G.L.G; VIEIRA, T.R. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. “Grand Rapids”) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v.7, n.1, p.180-197, abr. 2000.
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC. cap. 13, p. 223-259. 2001.
- SOUSA, J.A.; MIRANDA, E.M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis**. Artigos da Embrapa Acre, Rio Branco, Acre, Brasil. 2003. Disponível em: <<http://www.cpfac.embrapa.br/chefias/cna/artigos/planmed.htm>>. Acesso em 21 set. 2005.
- SOUZA, C.L.M. **Potencial alelopático das palhas de capim-colonião (*P. maximum*), capim-jaraguá (*H. rufa*), capim gordura (*M. minutiplora*), mucuna (*S. aterrinum*) e bambú (*Bambusa spp*) nas culturas de cenoura e alface**. 1997. 93p. Dissertação (Mestrado em agronomia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 1997.

SOUZA, M. A. A. **Produção de biomassa e rendimento de óleos essenciais de plantas de hortelã (*Mentha piperita*) em cultivo hidropônico com diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.** UFRRJ: Seropédica. Dissertação, p.87, 2006.

SOUZA, M.A.A.; BORGES, S.O.S.; STARK, M.L.M e SOUZA, S.R. Efeito de extratos aquosos, metanólicos e etanólicos de plantas medicinais sobre a germinação de sementes de alface e sobre o desenvolvimento miscelial de fungos fitopatogênicos de interesse agrícola. **Revista Universidade Rural**, Serie Ciências da Vida, Seropédica. v. 22, n. 2, p. 181-185, 2002. Suplemento.

SOUZA, M.A.A.; ARAÚJO, O.J.L.; FERREIRA, M.A.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Produção de biomassa e óleo essencial de hortelã em hidroponia em função de nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 41-48, 2007.

SOUZA, M.A.A.; SOUZA, S.R. Determinação das propriedades fungicidas do extrato metanólico de arruda (*Ruta graveolens* L.) em ensaio in vitro com fungos de solo. In: Anais da Fertbio 2000, 2000, Santa Maria. **Anais...** Rio Grande do Sul: SBCS, Resumo 928. 2000.

SOUZA, M. P; MATOS, M. E. O; MATOS, F. J. A; MACHADO, M. I. L; CRAVEIRO, A. A. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras, **EUFC**. Laboratório de produtos naturais, fortaleza.1991.

SOUZA, S.R. **Efeitos da aplicação foliar de nitrogênio pós-antese sobre as enzimas de assimilação de N e acúmulo de proteína em grãos de arroz.** Tese (PhD. em Agronomia, Ciência do Solo) UFRRJ, Seropédica, RJ, 1995. 152p.

SRIVASTAVA, R. K.; SINGH, A. K.; KALRA, A. V.; TOMAR, K. S.; R. BANSAL, P.; PATRA, D. D.; CHAND, S.; NAQVI, A. A.; SHARMA ; S. AND KUMAR, S. Characteristics of menthol mint *Mentha arvensis* cultivated on industrial scale in the Indo-Gangetic plains. **Industrial Crops and Products**, v. 15, p. 189, 2002.

SRIVASTAVA, R.K. Characteristics of menthol mint *Mentha arvensis* cultivated on industrial scale in the Indo-Gangetic plains. **Industrial Crops and Products**, v. 5, p. 189-98, 2002.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA; K.R. F.; CRUZ, M.E.S. E NOZAKI, M.H. – Plantas Mais: Plantas Medicinais e controle alternativo de fitopatogênicos. **Biociência – Ciência e Desenvolvimento**. n11, p.16-21, 1999.

STOESSL, A. Secondary plant metabolites in plant disease resistance. Part I: preformed resistance factors. **Fitopatologia Brasileira**. v.10, p.391-416, out. 1985.

STOESSL, A. Secondary plant metabolites in plant disease resistance. Part II: phytoalexins. **Fitopatologia Brasileira**. v.11, p.25-53, mar. 1986.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant Biochemistry**. Acad. Press. 1997. cap.10, p.388-416.

STRASBURGER, E. 1924. **Handbook of practical botany**. 8th ed. George Allen e Nonviim, Ltd., London.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996. 1000p.

TABOGA, S. R. & P. S. L. VILAMAIOR. Citoquímica. In H. F. Carvalho & S. M. Recco-Pimentel (eds.). **A célula**. Manoli Ltda, Barueri, 2001, p.19-27.

TEDESCO, M. J. **Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com H₂O₂-H₂SO₄**. Rio Grande do Sul: Editora UFRGS, 1982. 23p.

TEIXEIRA, N.T. **Hidroponia: uma alternativa para pequenas áreas**. Rio Grande do Sul: Ed. Guaíba, 1996. 86 p.

- THOMPSON, G. A.; SCHULZ, A. Macromolecular trafficking in the phloem. **Trends in Plant Science**. v.4, n.9, p.354-360, 1999.
- TOBIN, A. K.; BOWSER, C.G. Nitrogen and carbon metabolism in plastids: evolution, integration, and coordination with reactions in the cytosol. **Advances in botanical research**, v. 42, p.114-165, 2005.
- TURANO, F. J.; DASHNER, R.; UPADHYAYA, A.; CALDWELL, C. R. Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. **Plant Physiology**, v.112, p.1357-1364, 1996.
- TURNER, G.; CROTEAU, R. Organization of monoterpene biosynthesis in mentha. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. **Plant Physiology**. v.136, p. 4215-4227, 2004.
- TURNER, G.; GERSHENZON, J.; NIELSON, E.E.; FROEHLICH, J.E.; CROTEAU, R. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. **Plant Physiology**, 1999, v. 120, p. 879-886.
- TURNER, G.W.; GERSHENZON, J. e CROTEAU, R.B. Development of Peltate Glandular Trichomes of Peppermint. **Plant Physiology**, v. 124, p. 665-679, 2000b.
- TURNER, G.W.; GERSHENZON, J. e CROTEAU, R.B. Distribution of Peltate Glandular Trichomes on Developing Leaves of Peppermint. **Plant Physiology**, v. 124, p. 655-663, Oct. 2000a.
- TYLER, V.E. **Herbs of choice: the therapeutic use of phytomedicinals**. New York: pharmaceutical products, 1994.
- VAN DEN DOOL, H., KRATZ, P.D., **J. Chromatography**, 1963, 11, 463-471.
- VAZ, R. S.; PRADO, M. R. M.; CARVALHO, F. Biotecnologia na indústria farmacêutica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**., v. 37, p. 36, 2007/08.
- VIEGAS, M.C.; BASSOLI, D.G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Quim. Nova**, v. 30, n.8, p. 2031-2034, 2007
- VIEIRA, R.C.; 2 DELPRETE, P.G. Anatomical and chemical analyses of leaf secretory cavities of *Rustia formosa* (rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 12, p. 2151-2156, 2001.
- VINING, L.C. Functions of secondary metabolites. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 395-427, 1990.
- VITAL, W. M.; N.T.TEIXEIRA e R. SIGHIHARA. Soluções nutritivas para o cultivo hidropônico, sistema NFT, de calêndula. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. 2001, Londrina. **Anais...** Paraná: SBCS, 2001.
- WAGNER, G.J.; HRAZDINA, G. Endoplasmic reticulum as a site of phenylpropanoid and flavonoid metabolism in *hippeastrum*. **Plant Physiology**, v. 74, p. 901-906, 1984.
- WEBER, A. P. M. Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. **Current Opinion in Plant Biology**. v.7, p.247-253, 2004
- WEKER, E.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E. Structure of glandular hairs and identification of the main component of their secreted material in some species of the Labiatae. **Isr. J. Bot.** v. 34, p. 31-45, 1985.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiol.**, v.144, p. 307-313, 1994.

WILDUNG, M.R., CROTEAU, R.B. Genetic engineering of peppermint for improved essential oil composition and yield. **Transgenic Research**, v.14, n.4, p. 365-372, 2005.

YEMM, E. W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry.**, v.80, p.209-213, nov. 1955.

YEMM, E. W. e WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry**, v.57, p.508-514, mar.1954.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O *et al.*(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001. Cap.23, p. 499-526.