LUCIANA WITOSLAWSKI PIRATELLO DE CASTRO

DESENVOLVIMENTO DE *Mentha aquatica* E *Mentha* x *piperita*, RENDIMENTO E QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL EM REPOSTA A NÍVEIS DE RADIAÇÃO E ADUBAÇÃO NITROGENADA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Deschamps

CURITIBA
2007

Dedico

Aos meus pais, Wenceslau (*in memorian*) e Alzira,
Ao meu marido Fabio e ao meu filho Matheus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida;

À Universidade Federal do Paraná pelo crescimento profissional, proporcionado com a realização deste curso;

Ao professor Dr. Cícero Deschamps por sua orientação, disposição para ajudar, paciência, amizade e compreensão;

À coordenadora do programa de Pós Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, da Universidade Federal do Paraná, Profª. Drª. Francine Lorena Cuquel e ao Vice-Coordenador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi;

A todos os professores, em especial ao professor Dr. Henrique Soares Koelher pela atenção;

À amiga Dra. Marisa Oliveira, pela ajuda, dedicação e paciência nos momentos em que mais precisei;

Aos colegas, Rodrigo, Caroline, Claudinei, Luciane, Lucimara, Allan, Magda e Cristina, do Laboratório de Ecofisiologia, pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de descontração.

Aos técnicos do laboratório de Ecofisiologia e laboratório de Fitotecnia, em especial à Maria Emília e ao Sr. Rainierio, pela ajuda nos experimentos realizados em casa de vegetação.

Ao Departamento de Engenharia Química, em especial à doutoranda Lílian Cristina Côcco do LACAUT (Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos) e aos professores Dra. Agnes de P. Scheer e Carlos Yamamoto.

À Lucimara Antunes, secretária do Programa de Pós Graduação em Agronomia, pela boa vontade e presteza para com todos.

E finalmente, porém não menos importante, agradeço a minha mãe, Alzira, pois sem a sua valorosa ajuda com o pequeno Matheus não seria possível a realização deste trabalho.

Ao meu esposo Fabio, pelo apoio incondicional, amor, ajuda e paciência em todos os momentos, principalmente nos de dificuldade.

Ao meu filho Matheus pela alegria que trouxe a minha casa.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Luciana Witoslaswski Piratello de Castro, filha de Wenceslau Witoslawski Filho e Alzira Witoslawski, nascida em Curitiba, Estado do Paraná, em 01 de setembro de 1976, casada com Fabio Augusto Piratello de Castro, tendo um filho de 1 ano, chamado Matheus Witoslawski Piratello de Castro.

Cursou o Ensino fundamental na Escola Estadual Dona Carola, e o Ensino médio no Colégio Estadual do Paraná, em Curitiba-Pr.

Em 2005 recebeu o diploma de Bacharelado e Licenciatura em Biologia, pelo Centro Universitário Positivo- UNICENP. Neste mesmo ano ingressou no curso de Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal, no departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS..... vi
LISTA DE FIGURAS..... vii
RESUMO..... viii
ABSTRACT..... ix
1 INTRODUÇÃO..... 1
2 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA..... 3
2.1 GÊNERO *Mentha*..... 3
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS..... 3
2.2.1 BIOSSÍNTESE DE MONOTERPENOS EM ESPÉCIES DE *Mentha*..... 4
2.3 PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL..... 5
2.3.1 DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E PRODUÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha*..... 6
2.3.1.1 Fotoperíodo, temperatura e umidade..... 6
2.3.1.2 Radiação..... 7
2.3.1.3 Adubação Nitrogenada e produção de óleos essenciais 7
REFERÊNCIAS..... 9
3 CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE *Mentha* x *piperita* e *M. aquatica*, RENDIMENTO E QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL COM E SEM ADUBAÇÃO NITROGENADA E SOB DIFERENTES NÍVEIS DE RADIAÇÃO 12
RESUMO..... 12
ABSTRACT..... 13
3.1 INTRODUÇÃO..... 14
3.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 15
3.2.1 MATERIAL VEGETAL..... 15
3.2.2 PREPARO DE MUDAS, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA..... 16
3.2.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA..... 18
3.2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... 19
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 20
3.3.1 DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO EM ESPÉCIES DE *Mentha aquatica* e *M.*x *piperita* 20
3.3.2 RENDIMENTO E QUALIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL NAS ESPÉCIES DE *Mentha aquatica* e *Mentha* x *piperita*..... 22
3.4 CONCLUSÕES..... 25
REFERÊNCIAS..... 26

4 CAPÍTULO III – METABOLISMO DE *Mentha* x *piperita* e *Mentha aquatica* EM RESPOSTA A RADIAÇÃO E NITROGÊNIO..... 29
RESUMO..... 29
ABSTRACT..... 30
4.1 INTRODUÇÃO..... 31
4.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 32
4.2.1 MATERIAL VEGETAL..... 32
4.2.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NOS TECIDOS FOLIARES..... 32
4.2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NITRATO REDUTASE 32
4.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILA *a*, CLOROFILA *b* E CLOROFILA TOTAL. 34
4.2.5 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES..... 34
4.2.6 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES .TOTAIS..... 35
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 36
4.3.1 OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA REDUTASE NITRATO EM *Mentha aquática*..... 36
4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILA *a, b* E TOTAL, AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES,PROTEÍNAS TOTAIS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NITRATO REDUTASE EM ESPÉCIES DE *Mentha aquatica* e *Mentha* x p*iperita*..... 38
4.4 CONCLUSÕES..... 43
REFERENCIAS..... 44
5 CAPÍTULO IV- CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 46
ANEXOS..... 48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Características químicas do solo utilizado no experimento de casa-de-vegetação, Curitiba–Pr, 2006..... 17

TABELA 2 Níveis de radiação (quantum µ mol.s^{-1}.m^{-2}) em condição de casa-de-vegetação em dias ensolarados e nublados, Curitiba–Pr, 2006..... 17

TABELA 3 Área foliar (cm^2/planta) em variedades de *Mentha* sob diferentes níveis de radiação, Curitiba–Pr, 2006..... 20

TABELA 4 Número de ramos e massa seca total (folhas e ramos) de variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada e sob diferentes níveis de radiação Curitiba–Pr, 2006..... 21

TABELA 5 Rendimento de óleo essencial (µl/g de massa seca) em variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada e sob diferentes níveis de radiação, Curitiba–Pr, 2006..... 23

TABELA 6 Composição do óleo essencial (%) em variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada e sob diferentes níveis de radiação, Curitiba–Pr, 2006..... 24

TABELA 7 Quantificação de clorofilas: total, *a* e *b* (mg/cm^2) em variedades de *Mentha* sob diferentes níveis de radiação, Curitiba–Pr, 2006..... 38

TABELA 8 Quantificação de clorofilas: total, *a* e *b* (mg/cm^2) em variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada e sob diferentes níveis de radiação, Curitiba–Pr, 2006..... 38

TABELA 9 Concentração de proteínas totais (µg/g) e atividade da enzima nitrato redutase em variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada e sob diferentes níveis de radiação, Curitiba–Pr, 2006..... 40

TABELA 10 Concentração de açúcares totais e redutores (µg/g) em variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada e sob diferentes níveis de radiação, Curitiba–Pr, 2006..... 41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Tricomas glandulares em tecidos foliares de *Mentha* x *piperita*..... 5

FIGURA 2 Componentes de tricoma glandular em *M* x *piperita*..... 5

FIGURA 3 Cromatograma representativo dos constituintes majoritários de *M. aquatica*, variedade "Lavander mint", Curitiba – Pr, 2006..... 15

FIGURA 4 Cromatograma representativo dos constituintes majoritários de *M.* x *piperita*, variedade "Grapefruit mint", Curitiba – Pr, 2006..... 16

FIGURA 5 Cromatograma representativo dos constituintes majoritários de *M.* x *piperita*, variedade "Peppermint". Curitiba – Pr, 2006..... 16

FIGURA 6 Tratamentos em casa-de-vegetação, Curitiba–Pr, 2006..... 18

FIGURA 7 Quantidade de nitrito formado em função da concentração de substrato No_3, Curitiba–Pr, 2006..... 36

FIGURA 8 Quantidade de nitrito formado em função da quantidade de material vegetal, Curitiba–Pr, 2006..... 37

RESUMO

A produção de óleos essenciais em espécies aromáticas está diretamente relacionada as funções ecológicas da planta. A biossíntese pode ser regulada por vários fatores entre eles radiação e disponibilidade de nutrientes no solo. Este trabalho avaliou o desenvolvimento vegetativo, alterações bioquímicas, rendimento e a qualidade dos óleos essenciais, de espécies de mentha submetidas a diferentes níveis de radiação e fertilização com nitrogênio. Foi realizado um experimento com delineamento experimental inteiramente casualizado, com oito tratamentos, cada qual com três repetições, comparando o efeito de genótipos, adubação nitrogenada (presença e ausência) e níveis de radiação (100%, 70% e 30%). O experimento foi desenvolvido em condição de casa-de-vegetação. A extração dos óleos realizada por hidrodestilação, durante 3 horas sendo os constituintes desses óleos analisados por meio de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. O acúmulo de massa seca total para as espécies de *Mentha* foi superior em plantas expostas a 100% e 70% de radiação, sendo observado o efeito da adubação nitrogenada apenas em plantas expostas a 100% de radiação. A limitação de radiação resulta em diminuição no desenvolvimento foliar e número de ramos das variedades “Lavander Mint”, “Peppermint” e “Grapefruit Mint”, sendo que está ultima é mais sensível. A produtividade de óleos essenciais nas variedades de menta é superior quando expostas à maiores níveis de radiação. A adubação nitrogenada aumenta a produtividade de óleo da variedade “Lavander mint” em condições de 100% de radiação e em “Grapefruit mint” aumenta a produtividade em 70% de radiação. Em “Grapefruit mint” não foi verificada diferença significativa na concentração dos constituintes majoritários na ausência de nitrogênio. Para a variedade “Peppermint”, as mais altas concentrações de mentol e mentona ocorrem em plantas expostas as mais altas radiações sem utilização de adubação nitrogenada. Menores níveis de radiação aumentam a concentração de clorofilas totais, a e b nas espécies de mentha. A adubação nitrogenada eleva os níveis de proteínas totais em 100% de radiação para “Lavander mint”, no entanto não influencia o acúmulo de proteínas nas variedades “Grapefruit Mint” e “Peppermint” nos diferentes níveis de radiação. Adubação nitrogenada aumenta a atividade da enzima nitrato redutase sendo similar nos diferentes níveis de radiação. O acúmulo de açúcares totais e açúcares redutores em folhas das variedades de *Mentha* são superiores em plantas expostas aos mais altos níveis de radiação.

Palavras-chave: Proteínas, açúcar, clorofila, nitrato redutase, linalol, mentol.

ABSTRACT

The essential oil production on aromatic species is related with its ecological functions. The biosynthesis of these compounds regulated by many environmental factors including radiation and nutrient levels in the soil. The objectives of this work was to evaluate the vegetative development, biochemical changes in leaves and essential oil yield and quality of mint species under different levels of radiation and nitrogen fertilization. The experiment was carried out at greenhouse condition in complete randomized design comparing genotypes (*M. aquatica* chemiotype linalool and *M* x *piperita* chemiotype linalool e menthol), radiation levels (100, 70 and 30%) and nitrogen fertilization (presence and absence). The essential oil was obtained by hydrodestilation during 3 hours and the constituents analyzed by GC/MS. The total dry mass production of mint species was great in plants growing under 100 and 70% of radiation and the nitrogen fertilization showed effect on plant development whem 100% of radiation was provide. The decrease on radiation and nitrogen levels resulted on leaf development and stem number reduction on mint species, being the linalool chemeotype the most affected. The highest essential oil yield was obtained also from plants under 100% of radiation. The nitrogen fertilization resulted on great essential oil yield on linalool chemiotype of *M. aquatica* with 100% of radiation and linalool chemiotype of *M.* x *piperita* under 70% of radiation. The highest level of linalool in *M .aquatica* was observed under the 100% of radiation and with nitrogen fertilization. The chemiotype of *M. aquatica* showed no difference on linalool percentage under radiation levels and nitrogen fertilization. There chemiotype of *M.* x *piperita* showed great percentage of menthol and menthone with 100% of radiation but without nitrogen fertilization. The lowest level radiation result on greatest concentration of chlorophyll a, b and total and nitrogen fertilization showed no effect. The proteins concentration increased on leaves of the linalool chemiotype of *M. aquatica* with nitrogen fertilization and 100% of radiation. No changes on protein concentration however we observed on both *M.* x *piperita* chemiotypes. The nitrate reductase activity increased on leaves of plants growed with N fertilization, being similar among the different radiation levels. The sugar content on leaves of mint species was great when the highest level of radiation was supplied.

Key words: Proteins, sugar, chlorophyll, nitrate reductase, linalool, menthol.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Mentha* (Lamiacea) ocupa posição de destaque na produção de óleos essenciais. As espécies mais utilizadas comercialmente são *Mentha* x *piperita* e *M. arvensis*, que têm o mentol como constituinte majoritário, produto de grande interesse econômico nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de perfumaria. Outro composto de importância para a indústria da perfumaria é o linalol, o qual também é sintetizado por espécies do gênero *Mentha*.

Nos Estados Unidos, China e Índia as espécies do gênero *Mentha* são cultivadas em larga escala (LAWRENCE, 1985). Em 2005 a produção mundial de óleo essencial destas espécies foi de aproximadamente 22,2 mil toneladas, com faturamento de US$ 276 milhões e deste total 57% foi produzido na Índia. Para 2010, a expectativa é que a produção chegue a 29,7 mil toneladas de óleo essencial (SANT SANGANERIA, 2005).

No Estado do Paraná, a produção de *Mentha* teve início na década de 60. Neste período a variedade IAC-701, desenvolvida pelo programa de melhoramento genético do Instituto Agronômico de Campinas, ocupou a maior área de cultivo quando o Brasil apresentou posição de destaque na produção de mentol. Ao longo do tempo, devido principalmente ao surgimento do mentol sintético e problemas fitossanitários na espécie, como a ocorrência de ferrugem causada por *Puccinia menthae*, houve grande declínio na produção nacional (PASSOS *et al.*,1973). Na safra 2003/2004, a área de plantio no Estado do Paraná ficou em torno de 100 ha, sendo o município de Capitão Leônidas Marques o maior produtor com aproximadamente 97% da produção (SEAB, 2006).

Atualmente, a pequena produção estadual atende o mercado que utiliza a matéria seca para chá, não sendo utilizada comercialmente para a extração de óleo essencial.

A produção de óleos essenciais está diretamente relacionada com as funções ecológicas da planta, tais como inibidores de germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores e controle do aumento de temperatura foliar (SIMÕES & SPITZER, 2004).

A regulação da produção de óleo essencial em espécies aromáticas não só depende do estado metabólico da planta, mas também está relacionada a fatores ambientais que interagem com as características genéticas, influenciando na fisiologia e possibilitando que

dois indivíduos idênticos crescendo em ambientes diferentes produzam metabólitos secundários de acordo com as condições a que estão expostos (CASTRO *et al.*, 2004). Desta forma, um óleo volátil extraído da mesma espécie vegetal pode apresentar variações em suas características físico-químicas, dependendo das condições ambientais. O metabolismo vegetal está condicionado ao processo fotossintético e à disponibilidade de nutrientes no solo. Destes resultam as substâncias do metabolismo primário, como aminoácidos, nucleotídeos e açúcares, as quais irão originar os metabólitos secundários (TAIZ & ZEIGER, 2004). Assim os monoterpenos mentol e linalol podem ter suas rotas de síntese reguladas pela radiação e nitrogênio, tendo efeitos diferentes para cada um desses fatores.

Aplicações de nitrogênio e níveis de radiação afetam diretamente a produção de metabólitos secundários, pois estes são formados a partir das rotas bioquímicas originadas pelo metabolismo primário (ADLER *et al.* 1989, TAIZ & ZEIGER, 2004). Por este motivo tornam-se necessários estudos sobre assimilação de nitrogênio e a influência da radiação solar em plantas aromáticas a fim de maximizar o rendimento e a qualidade do óleo essencial.

Devido a importância comercial dos constituintes mentol e linalol, este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento, rendimento e qualidade dos óleos essenciais das espécies *Mentha* x *piperita* e *Mentha aquatica* em resposta a diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

Para atingir este objetivo foi realizado um experimento, cujos resultados estão apresentados em forma de capítulos nesta dissertação.

No capítulo I é apresentada a revisão bibliográfica com a descrição do gênero *Mentha*, a biossíntese e fatores que afetam a produção de óleos essenciais. O capítulo II refere-se à avaliação do desenvolvimento, rendimento e qualidade do óleo essencial em *Mentha aquatica* e *M.* x *piperita* em resposta a diferentes níveis de radiação e presença ou ausência de nitrogênio. O capítulo III refere-se às respostas bioquímicas relacionadas à biossíntese de óleo essencial em *M. aquatica* e *M.* x *piperita*. Finalmente, no capítulo IV são apresentadas as considerações finais deste trabalho.

2 CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GÊNERO *Mentha*

O gênero *Mentha* pertence à família Lamiacea e compreende cerca de 25 espécies. Em geral, inclui plantas aromáticas que apresentam difícil classificação taxonômica devido às suas diversidades morfológicas e grande capacidade de hibridização (LORENZO *et al*., 2002; CRONQUIST, 1988). As espécies de *Mentha* são plantas herbáceas originárias da Europa e Ásia, ocorrendo em baixas altitudes e em locais permanentemente úmidos e férteis. Possuem também grande capacidade de reter água, porém, caso as precipitações não sejam freqüentes, torna-se necessária à irrigação (ROBBERS *et. al*, 1997).

Este gênero produz alguns dos mais importantes compostos encontrados em óleos essenciais, utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica. As principais espécies com interesse comercial são *Mentha* x *piperita* e *M. arvensis* devido aos seus altos teores de mentol, mentona, linalol e carvona em seus óleos. O mentol é utilizado principalmente pelas indústrias de produtos farmacêuticos e de fumo, com aplicação também na aromatização de confeitos e gomas de mascar. O linalol é utilizado na manufatura de ésteres, principalmente o acetato de linalila, sendo empregado na indústria de perfumaria e sabões e a carvona, que como o mentol, é usada na aromatização e no sabor de produtos alimentícios e farmacêuticos, na formulação de preparações bucais e pastas dentais (KLOCK & MUNIZ, 2005).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos devido à solubilidade em éter, ou essências pelos seus aromas característicos. De acordo com a ISO (International Standard Organization), óleos voláteis são os produtos obtidos de partes de plantas através da destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos. São geralmente voláteis e lipofílicos. Diferem dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes. A designação de óleo se dá devido a algumas características físico-químicas

como a de serem líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Sua principal característica, contudo consiste na volatilidade (SIMÕES & SPITZER, 2004).

Os monoterpenos e os sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais, sendo estes últimos menos voláteis, porém podendo influenciar sensivelmente no odor dos óleos onde ocorrem. A maioria das espécies do gênero *Mentha*, como *M. spicata, M. arvensis, M. pulegium* e *M.* x *piperita*, possuem predominantemente monoterpenos na composição de seus óleos (MAHMOUD & CROTEAU, 2003; CASTRO *et al.*, 2004; SIMÕES & SPITZER, 2004).

Os terpenos ou isoprenos são formados a partir da união de unidades isoprênicas de 5 carbonos. Estes compostos podem ser formados por diferentes rotas biossintéticas, entre elas a rota do ácido mevalônico que ocorre no citoplasma das células secretoras dos tricomas peltados. Para formar ácido mevalônico, três moléculas de acetil CoA sofrem várias reações, passando por processos de fosforilação, descarboxilação e desidratação formando isopentenil difosfato (IPP), que é a unidade básica para a formação de isoprenos. Outros isoprenos (principalmente triterpenos e sesquiterpenos) podem também ser formados pela rota do metileritritol fosfato, que ocorre nos cloroplastos e/ou plastídeos e utiliza como precursores, intermediários da glicólise ou da redução do carbono por meio da fotossíntese (TAIZ & ZEIGER, 2004, CASTRO *et al.*, 2004).

As unidades de IPP são encontradas principalmente nas plantas superiores, embora possam estar presentes em outros organismos. Muitas destas unidades ocorrem livres nos tecidos vegetais em forma de glicosídeos, éster de ácidos orgânicos ou então combinados com proteínas. Alguns terpenos podem funcionar como metabólitos primários, atuando no desenvolvimento do vegetal, porém, a maioria atua como metabólito secundário com função repelente contra herbívoros (CASTRO *et al.*, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2004).

2.2.1 Biossíntese de monoterpenos em espécies de *Mentha*.

A espécie *Mentha* x *piperita* vêm sendo muita estudada em relação à biossíntese de monoterpenos, sendo considerada um modelo para o estudo das rotas biossintéticas dos compostos terpênicos (TURNER & CROTEAU, 2004).

Através de métodos de imunofluorescência, TURNER & CROTEAU (2004) identificaram as enzimas que participam da biossíntese de monoterpenos em tricomas de *M.* x *piperita* e *M. spicata.* A principal enzima é a geranil difosfato síntase (GPPS), sintetizada nos plastídeos e contendo uma unidade -N terminal que permite seu trânsito até a chegada nos leucoplastos dos tricomas glandulares, não estando presente em outros tipos de células

ou organelas. O geranil difosfato (GPP), que é formado por duas unidades de IPP é quase todo convertido em limoneno, composto este que dá origem à maioria dos terpenos do óleo essencial de *Mentha*. No entanto, na rota biossintética dos terpenos, a síntese de linalol pela enzima linalol sintase ocorre anteriormente à do mentol (MCGARVEY & CROTEAU, 1995).

A organização da biossíntese do mentol e do linalol é um processo complexo que envolve compartimentalização sub-celular, sendo que a regulação das rotas biossintéticas está intimamente ligada com o nível de expressão gênica (MCGARVEY & CROTEAU, 1995).

2.3 PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos voláteis extraídos de plantas são sintetizados e armazenados em diferentes estruturas localizadas na epiderme ou mesófilo. Em *Mentha* estes óleos são produzidos e armazenados em tricomas glandulares peltados que estão distribuídos preferencialmente na face abaxial das folhas, podendo ocorrer também na adaxial com menor densidade (DESCHAMPS *et al.*, 2006). Estes são constituídos por uma célula basal, uma célula haste e por um conjunto de células secretoras envoltas por uma cutícula que dá origem ao reservatório (Figuras 1 e 2). Com a expansão foliar a densidade dos tricomas diminui em ambas as faces das folhas (TURNER *et al.*, 2000).

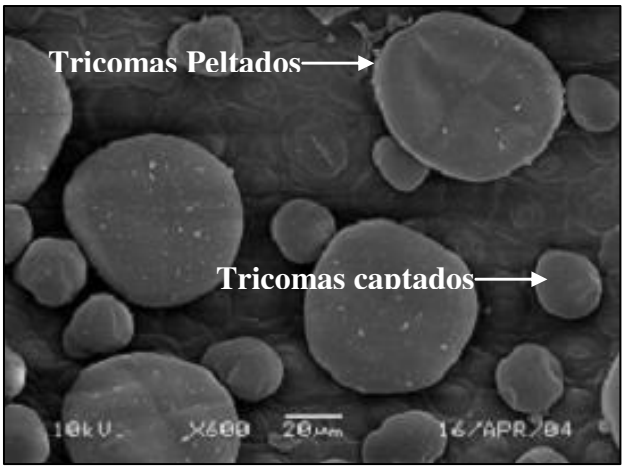

FIGURA 1. Tricomas glandulares em tecidos foliares de *Mentha* x *piperita* (Fonte: DESCHAMPS *et al.*, 2006).

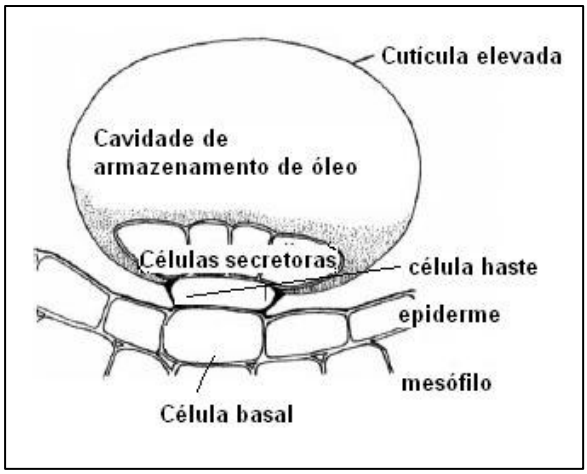

FIGURA 2. Componentes de tricoma glandular em *Mentha* x *piperita* (Fonte: TURNER & CROTEAU, 2004).

2.3.1 Desenvolvimento vegetativo e produção de óleos essenciais em *Mentha*

Os solos orgânicos são ideais para o cultivo das espécies do gênero *Mentha*, já os solos argilosos, compactados, somente serão apropriados para o cultivo desde que tenham suas propriedades físicas melhoradas mediante a incorporação de material orgânico. Quanto à acidez do solo, o pH ideal está em torno de 5,5 a 6.5 (WELLER *et al*., 2000).

A disponibilidade de água é outro fator importante, pois afeta o desenvolvimento de espécies de *Mentha* tanto em condições de déficit hídrico como excesso (WELLER *et al*., 2000).

Quanto à temperatura, o gênero tolera bem variações suas variações, sendo as ideais para cultivo estão entre 14° a 18°C, não suportando períodos prolongados de temperaturas extremas (WELLER *et al*., 2000).

A ontogênese da planta também interfere na produção de óleo essencial. Estudos realizados por DURYAPAN *et al.* (1986) mostram que a produção de mentol em *M. arvensis* é superior no florescimento, porém, decresce com a idade do tecido foliar. Segundo SERGEEVA & SOLENOVA (1979) e SÁGATA & MITUSUI (1980), citados por SANGWAN *et al.* (2001), o teor de mentona é mais alto nas folhas jovens e o de mentol nas folhas maduras de *M.* x *piperita* e *M. arvensis*. MAFFEI & CODIGNOLA (1990) também registraram um aumento de monoterpenos com o aumento da idade da folha. Estes trabalhos indicam o período de desenvolvimento da planta ideal para a colheita conforme a presença do constituinte na fração do óleo essencial de maior interesse.

2.3.1.1 Fotoperíodo, temperatura e umidade.

Plantas de *Mentha* expostas a 24 horas de iluminação tiveram seu florescimento induzido, tendo o fotoperíodo também alterado a composição do óleo essencial, sendo que expostas a tratamentos de plantas de dias curtos apesar de possuírem menor biomassa, acumularam uma maior quantidade de óleo essencial por unidade de massa foliar. As plantas expostas a tratamentos de dias longos ou normais embora apresentassem diferença na biomassa, acumularam quantidades similares de óleo essencial (FAROOQI *et al*., 1999).

Níveis de precipitação e temperatura também são fatores importantes que influenciam na produção de óleos essenciais. Observou-se o efeito da temperatura em *M. arvensis* em condições controladas. Com temperaturas de 30°C obteve-se uma maior produção de biomassa (folhas, caules e raízes), entretanto, a 20°C ocorreu um crescimento

superior de estolões. Os tratamentos com temperatura não alteraram o percentual de mentol encontrado no óleo (FAROOQI *et al*., 1999, SANGWAN *et al*., 2001).

2.3.1.2 Radiação

A radiação é de extrema importância no desenvolvimento dos vegetais, pois está ligada diretamente aos principais processos fisiológicos como fotossíntese, floração, fotoperiodismo, amadurecimento de frutos, entre outros (SCHEFFER, 2002; WACHOWICZ, 2002). No acúmulo de biomassa, a radiação atua diretamente na etapa fotoquímica da fotossíntese fornecendo poder redutor na forma de ATP e NADPH para as reações de fixação do CO_2 atmosférico (TAIZ & ZEIGER, 2004). Tratamentos com diferentes tipos de luz podem aumentar ou diminuir a biomassa, até mesmo induzir a produção de alguns compostos de interesse específico. Em experimentos com *Anethum graveoleans*, realizados por HÄLVÄ *et al* (1992), verificou-se que a exposição à luz vermelha, durante 4 horas, promoveu um acréscimo na concentração de felandreno e diminuiu a concentração de miristicina. Plantas de sálvia e tomilho, expostas a 45% de radiação apresentaram óleos ricos em tujona e pouco em cânfora (SANGWAN *et al*., 2001).

2.3.1.3 Adubação nitrogenada e produção de óleos essenciais

O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para o metabolismo vegetal, pois constitui componentes fundamentais como ácidos nucléicos e proteínas, participando direta ou indiretamente de processos bioquímicos. Este macronutriente está presente em diversas formas na natureza, porém, a maior quantidade está indisponível como nitrogênio molecular. A principal forma de nitrogênio inorgânico disponível para as plantas é o nitrato, sendo a enzima nitrato redutase responsável por catalizar à primeira reação de assimilação do N-inorgânico, reduzindo o nitrato a nitrito no citoplasma, conforme a seguinte reação (TAIZ & ZEIGER, 2004):

$$\mathbf{NO_3^- + NAD(P)H + H^+ \rightarrow 2\ e^-\ NO_2^- + NAD(P)^+ + H_20}$$

Em plantas superiores e algas verdes o doador de elétrons para a redução de nitrato a nitrito é a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH). Outra forma da enzima é encontrada em tecidos não clorofilados, principalmente raízes, a qual pode utilizar tanto NADH quanto NADPH. A atividade da enzima nitrato redutase no tecido foliar é induzida

pela luz e varia em função do estágio de expansão foliar, sendo máxima quando a folha atinge sua expansão total, declinando com a idade. As condições ótimas para a atividade da enzima podem variar de acordo com a espécie vegetal, concentração de nitrato exógeno, pH e temperatura (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Os resultados obtidos até o momento ainda não são conclusivos no que diz respeito à adubação nitrogenada, em relação ao rendimento e qualidade dos óleos essenciais. Estudos realizados por BASSO *et al*. (1998) sugerem que o teor de óleos essenciais em espécies dos gêneros *Mentha*, *Datura e Lavandula* é inversamente proporcional à disponibilidade de nitrogênio no solo, porém estudos realizados recentemente com *Mentha* vêm demonstrando aumento significativo na quantidade de óleo essencial com o aumento da adubação nitrogenada (RAM *et al.*, 2006; KIRAM & PATRA 2003a, 2003b). Em camomila, observou-se que a adubação nitrogenada proporcionou aumento na produção de capítulos, no rendimento de óleo essencial e alterações na sua composição (CASTRO *et al,* 2004).

REFERÊNCIAS

.

1. ADLER, P. R.; SIMON, J. E.; WILCOX, G. E. Nitrogen form alters sweet basil growth and essential oil content and composition. **Hortscience**, v. 24, n.5, p. 789–790, 1989.
2. BASSO, F.; PISANTE, M.; BASSO, B. Agronomical aspects of officinal plant cultivation. **Phytoterapy Research**, v.12, p. 5131-5134, 1998.
3. CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**, 2. ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004. p. 48-66.
4. CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants.** 2. ed. New York: New York Botanical Garden, 1988. 555 p.
5. DESCHAMPS, C.; ZANATTA, J. L.; ROSWALKA, L.; OLIVEIRA, M. de C.; BIZZO, 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, n. 1, p. 23-34, 2006.
6. DURIYAPAN S.; BRITTEN E. J.; BASFORD K. E. The effect of temperature on growth, oil yield and oil quality of Japanese mint. **Annals of Botany**, v. 58, p.729–736, 1986.
7. FAROOQI, A. H. A.; SANGWAN, N. S.; 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.
8. HÄLVÄ, S.; CRAKER, L. E.; SIMON, J. E.; CHARLES, D. J. Light levels, growth and essential oil in dill (*Anethum graveolem* L.). **Journal of Herbs, Spices and Medicinals plants**, n. 1 p. 47-58, 1992.
9. KIRAN, U.; PATRA D. D. Medicinal and aromatic plant materials as nitrification inhibitors for augmenting yield and nitrogen uptake of Japanese mint (*Mentha arvensis* L. var. Piperascens). **Bioresource Technology**, v. 86, p. 267–276, 2003 a.
10. KIRAN, U.; PATRA D. D. Influence of natural essential oils and their by-products as nitrification retarders in regulating nitrogen utilization for Japanese mint in sandy loam

soils of subtropical central India Agriculture. **Ecosystems and Environment** v. 94, p. 237–245, 2003 b.

11. KLOCK, U.; MUNIZ, G .I. B. Propriedades e potencialidades da produção de óleos essenciais de espécies florestais. Disponível em: http://www.oficinadaservas.com.br/estoleos4.htm. Acesso em agosto de 2005.
12. LAWRENCE B. M. A review of the world production of essential oil. **Perfumer & flavorist**, v. 10, p. 2–16, 1985.
13. LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; VILA, R.; CANIGUERAL, S. Essential oil of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguai. **Brazilian Archives of Biology Technology** v. 45, n. 4, p. 519-524, 2002.
14. MAFFEI, M.; CODIGNOLA, A. Photosyntesis, photorespiration and herbicid effects on terpene production in peppermint (*Mentha* x *piperita* L.). **Journal Essential Oil Research**, n. 2, p. 275-286, 1990.
15. MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. **PNAS**, v. 24, p. 14481-14486, 2003.
16. MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid Metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, p.1015-1026, 1995.
17. PASSOS, S. M. G. *et al*, **Principais culturas, vol 2**. 2ª ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973.
18. RAM, D.; RAM, M., SINGH, R. Optimization of water and nitrogen application to menthol mint (*Mentha arvensis* L.) through sugarcane trash mulch in a sandy loam soil of semi-arid subtropical climate. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 886–893, 2006.
19. ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYEER, V .E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. p. 111-113.
20. 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.
21. SANT SANGANERIA, ULTRA INTERNATIONAL LIMITED. Vibrant India. Opportunities for the flavor and fragrance industry. **Perfumer & Flavorist**, v. 30, n. 7, p. 24-34, 2005

22. SCHEFFER, M.C. Fisiologia de produção de espécies medicinais, condimentares e aromáticas. In: WACHOWICZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N. **Fisiologia Vegetal Produção e Pós Colheita.** Curitiba: Ed. Champagnat, 2002.

23. SEAB, Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná, Departamento de Economia Rural. (Comunicação pessoal Eng. Agr. Gilka Cardoso Andretta) 2006.

24. SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES C. M. O *et al***. Farmacognosia da planta ao medicamento,** 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. p. 468-495.

25. TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.719

26. TURNER, G. W ; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. Development of peltate glandular trichomes of peppermint. **Plant Physiology,** v. 124, p. 675-679, 2000.

27. TURNER, G. W ; CROTEAU, R. Organization of monoterpene biosynthesis in Mentha. Immunocytochemical localization of geranyl diphosphate syntase, limonene-6-hidroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. **Plant Physiology**, v.136, p. 4215- 4227, 2004.

28. WACHOWICZ, C. M. Fisisologia de produção de espécies Ornamentais In: WACHOWICZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N. **Fisiologia Vegetal Produção e Pós Colheita**, Curitiba: Ed. Champagnat, 2002. p. 205-224

29. WELLER, S. C; GREEN, R. J.; JANSSEN, C.; WHITFORD, F. **Mint production and pest management in Indiana**. Purdue Pesticide Programs PPP-103, 2000. Disponível em http\\www.btny.purdue.edu/Pubs/PPP/PPP-103.pdf. acesso agosto de 2005.

3 CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE *Mentha* x *piperita* e *Mentha aquatica*, RENDIMENTO E QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL SOB DIFERENTES NÍVEIS DE RADIAÇÃO E NITROGÊNIO.

RESUMO

A produção de óleos essenciais em espécies aromáticas está relacionada a fatores ambientais, como níveis de radiação e de nutrientes no solo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento vegetativo, rendimento e qualidade do óleo essencial de *Mentha aquatica*, variedade "Lavander Mint", que possui como constituinte majoritário o linalol, e *Mentha* x *piperita*, variedades "Grapefruit Mint" e "Peppermint" cujos constituintes majoritários são linalol e mentol, respectivamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, comparando o efeito de genótipos, adubação nitrogenada (presença e ausência) e níveis de radiação (100%, 70% e 30%), cada qual com três repetições. O experimento foi desenvolvido em condições de casa-de-vegetação, sendo a extração dos óleos essenciais realizada por hidrodestilação durante 3 horas. Os constituintes foram analisados por meio de CG/MS. O acúmulo de massa seca total para as variedades de *Mentha* foi superior em plantas expostas a 100% e 70% de radiação, sendo que a adubação nitrogenada influência apenas o desenvolvimento das plantas expostas a 100% de radiação. O desenvolvimento foliar de todas as variedades de mentha é reduzido em condições de baixa radiação. As variedades "Lavander mint" e "Peppermint", apresentam menor exigência de nitrogênio e radiação para número de ramos, já "Grapefruit mint" é mais sensível a limitação de radiação, mais exigente quanto adubação nitrogenada. A produtividade de óleos essenciais nas variedades de menta foi superior em plantas expostas à maiores níveis de radiação, sendo que a adubação nitrogenada aumentou a produtividade de óleo de variedade "Lavander mint " em condições de 100% de radiação e em "Grapefruit mint" aumentou a produtividade em 70% de radiação. A concentração de linalol para a variedade "Lavander Mint" diminuiu com a redução da radiação sem nitrogênio. Em "Grapefruit Mint" não foi verificada diferença significativa na concentração de linalol nos diferentes níveis de radiação, presença e ausência de nitrogênio. Para a variedade "Peppermint", as mais altas concentrações de mentol e mentona ocorreram em plantas expostas as mais altas radiações sem utilização da adubação nitrogenada.

Palavras-chave: Mentol, linalol, menta.

ABSTRACT

The essential oil production on aromatic plants is regulated by environmental conditions as radiation and nutrient levels in the soil. This work had as main objective to evaluate the plant development, essential oil yield and quality of mint species under different radiation levels and nitrogen fertilization. The experiment included the mint species *Mentha aquatica*, linalool chemotype, and *M.* x *piperita*, linalool and menthol chemotypes and was carried out at greenhouse conditions in a completed randomized design. The development of each plant species was compared after treatment with nitrogen fertilization (presence and absence) and 100, 70 and 30 % of radiation. The essential oil samples were obtained by hydrodestilation during 3 hours and analyzed by GC/MS. The dry mass accumulation was great on mint species growing at 100 and 70% of radiation, being the effect of nitrogen fertilization observed only on plants with 100% of radiation. Leaf development of all mint chemotypes was reduced at the lowest level of radiation but the stems number was not affected by both evaluated factors. The essential oil yield was great when plants were exposed to high level of radiation and nitrogen fertilization on *M. aquatica* chemotype linalool and at 70% of radiation on *M.* x *piperita* linalool chemotype. The linalool concentration on *M. aquatica* decreased with radiation reduction and without nitrogen fertilization, however, no differences were found on *M.* x *piperita* linalool chemotype. The highest level of radiation without nitrogen supply resulted on increase of menthol and menthone.

Keywords: menthol, linalool, mint.

3.1 INTRODUÇÃO

Entre as plantas aromáticas, as espécies de *Mentha* ocupam uma posição de destaque na economia mundial. Este gênero compreende cerca de 25 espécies, dentre elas as mais utilizadas são *Mentha* x *piperita* e *M. arvensis* que têm em seus óleos essenciais altos teores de mentol, composto de maior interesse econômico no gênero (LAWRENCE, 1985).

Em *Mentha*, a síntese e armazenamento de óleos essenciais se encontram em tricomas glandulares peltados que estão distribuídos predominantemente na face abaxial das folhas, podendo ocorrer também na adaxial com menor densidade (TURNER *et al.,* 2000a, 2000 b; DESCHAMPS *et al*., 2006).

A produção de óleo essencial não só depende do estado metabólico da planta, mas está também relacionada ao crescimento vegetativo, idade foliar e a fatores ambientais como: temperatura, estação do ano, intensidade e duração da radiação solar (FAROOQI *et al*., 1999). Assim estes fatores extrínsecos interagem com as características genéticas influenciando a fisiologia da planta (CASTRO *et al*., 2004).

O nitrogênio é um elemento de extrema importância no metabolismo vegetal, pois participa de inúmeros processos bioquímicos e na formação de componentes como ácidos nucléicos e proteínas. Diversos estudos têm demonstrado que tratamentos com adubação nitrogenada melhoram o desenvolvimento vegetativo influenciando o aumento de biomassa, taxa fotossintética e desenvolvimento foliar, afetando tanto o rendimento quanto a qualidade do óleo essencial (CASTRO *et al*., 2004; SIFOLA & BARBIERI 2006).

Os níveis de radiação afetam diretamente a produção de metabólitos secundários, pois estes são formados a partir das rotas bioquímicas originadas pelo metabolismo primário (TAIZ & ZEIGER, 2004). Os monoterpenos são compostos de 10 átomos de carbonos e constituem a maior parte dos compostos dos óleos essenciais derivados de plantas (CROWELL *et al*., 2002; TURNER & CROTEAU, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2004). Estudos demonstraram que diferenças nos níveis de radiação podem interferir na formação destes compostos predominantes dos óleos essenciais no gênero *Mentha*, sendo que a baixa intensidade luminosa tende a diminuir a concentração enquanto a alta luminosidade tende a aumentá-la (LIMA *et al*., 2003). No gênero *Mentha*, o terpeno mentol é comumente encontrado, sendo utilizado extensivamente na indústria farmacêutica, alimentícia e da

perfumaria (FAROOQI *et al.*, 1999). Outro composto de grande interesse econômico é o linalol, que também pode ser sintetizado por espécies do gênero *Mentha*. A biossíntese destes terpenos ocorre principalmente a partir da rota do ácido mevalônico, tendo como principal composto o geranil difosfato, um monoterpeno, que por meio da ação de diferentes enzimas resulta em uma grande variedade de compostos tais como o mentol e o linalol (TURNER & CROTEAU, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da adubação nitrogenada e radiação, no desenvolvimento, na quantidade e qualidade do óleo essencial em *Mentha aquatica* e *Mentha* x *piperita.*

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa-de-vegetação no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo - UFPR (Curitiba, PR), de setembro a dezembro de 2005.

3.2.1 MATERIAL VEGETAL

As espécies *Mentha aquatica*, variedade "Lavander Mint", que possui como constituinte majoritário o linalol, e *Mentha* x *piperita*, variedades "Grapefruit Mint" e "Peppermint" cujos constituintes majoritários são linalol e mentol, respectivamente (Fig. 1, 2 e 3), foram obtidas junto ao Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), EMBRAPA, Brasília, DF. As exsicatas do material vegetal encontram-se depositadas no herbário desta Instituição.

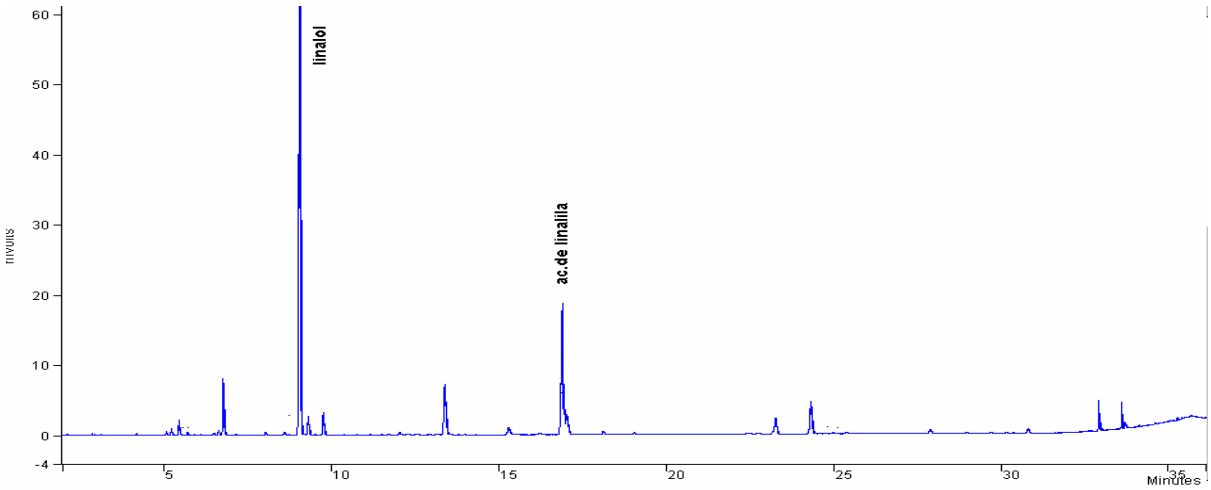

FIGURA 3 – Cromatograma representativo dos constituintes majoritários de *M. aquatica*, variedade "Lavander mint", Curitiba – Pr, 2006.

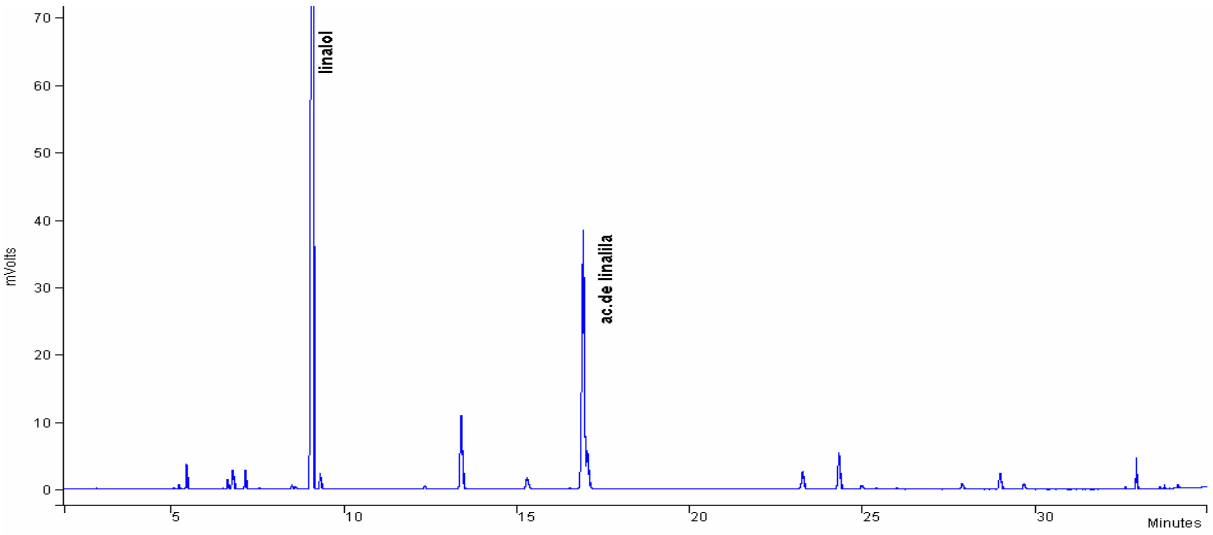

FIGURA 4 – Cromatograma representativo dos constituintes majoritários de *M.* x *piperita*, variedade "Grapefruit mint", Curitiba – Pr, 2006.

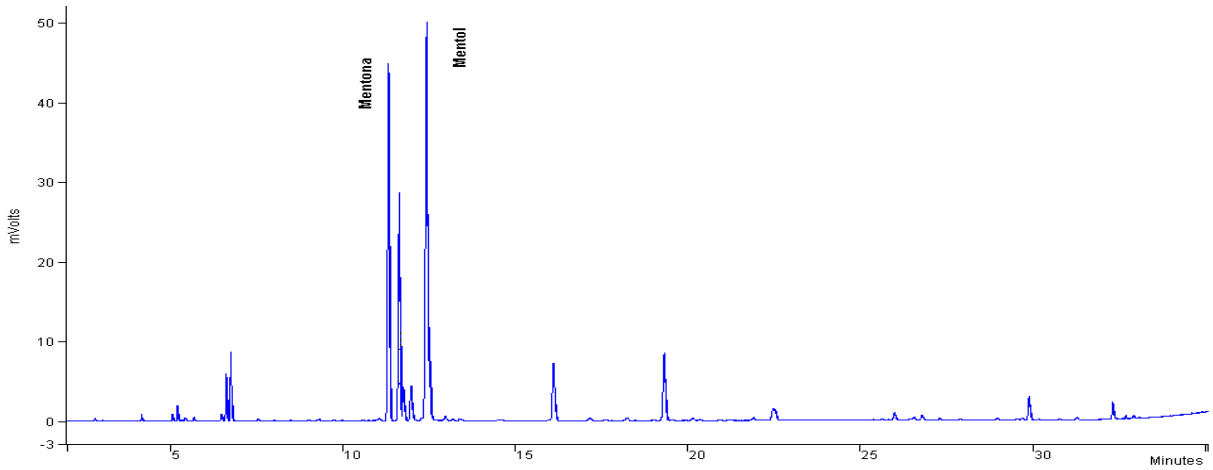

FIGURA 5 – Cromatograma representativo dos constituintes majoritários de *M.* x *piperita*, variedade "Peppermint". Curitiba – Pr, 2006.

3.2.2 PREPARO DE MUDAS, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA.

As mudas foram obtidas por mini-estacas cultivadas em bandejas em condições de casa-de-vegetação no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo - UFPR. Segmentos apicais de aproximadamente 5 centímetros foram separados da planta mãe e mantidos em água destilada até o plantio em substrato contendo areia. Após um período de aproximadamente 30 dias, as mudas que apresentaram satisfatório desenvolvimento vegetativo, bem como boas condições fitossanitárias, foram selecionadas para transplante em vasos. O delineamento experimental foi de blocos inteiramente casualizados, sendo 18

tratamentos com 3 repetições, cada qual com 3 vasos e 2 plantas por vaso. Os vasos continham aproximadamente 4 kg de solo. Na implantação do experimento, amostras de solo foram coletadas para análise química no Laboratório de Fertilidade do Departamento de Solos da UFPR e os resultados encontram-se na Tabela 1.

Para correção do pH do solo foi incorporado 6.170 kg/ha de calcário tipo filler (100% PRNT), para elevar o V a 70% conforme recomendação de RAIJ *et al*. (1996). Ainda de acordo com os mesmos autores, foi incorporado ao solo 40 kg/ha de P_2O_5 e 30 kg/ha de K_2O. Nos tratamentos aonde houve aplicação de nitrogênio, foi incorporada dosagem de 20 kg/ha de N.

TABELA1 – Características químicas do solo utilizado no experimento de casa-de-vegetação, Curitiba-Pr, 2006.

PH	Al^{+3}	$H^{+} + Al^{+3}$	Ca^{+2}	Mg^{+2}	K^{+}	SB	T	P	C	V	m	Ca/Mg
$CaCl_2$			$cmol_c/dm_3$					mg/dm_3	dm_3	%	%	
4,20	1,90	10,50	2,10	1,40	0,34	3,84	14,34	19,60	31,7	27	33	1,5

O material vegetal foi então submetido a diferentes níveis de radiação (100%, 70% e 30% em presença e ausência de N. Nos tratamentos com radiação, utilizou-se sombrite com 30% e 70% de limitação, conforme descrição do fabricante (Figura 3). No entanto, para monitorar com maior precisão os níveis de radiação, foram determinadas com o auxílio do aparelho porômetro (modelo LI-COR 1600) as condições no experimento em dias nublados e ensolarados, sendo obtido os valores apresentados na Tabela 2.

TABELA 2: Níveis de radiação (quantum µ $mol.s^{-1}.m^{-2}$) em condição de casa-de- vegetação em dias ensolarados e nublados, Curitiba-Pr, 2006.

Ambiente	Sol (% de radiação)	Nublado (% de radiação)
Externo	1770	330
Interno	869 (100%)	144 (100%)
Sombrite 30% (radiação 70%)	400 (46,29%)	69 (47,91%)
Sombrite 70% (radiação 30%)	200 (23,01%)	38 (26,38%)

* Os valores em porcentagem estão relacionados as condições internas de radiação

Após 60 dias da implantação do experimento, foi avaliado o desenvolvimento vegetativo de cada espécie a partir da determinação de área foliar, número de ramos e

massa total. A extração e a quantificação de óleos essenciais totais foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias (UFPR), em dezembro de 2005. Utilizaram-se amostras de 100 g de massa verde de tecidos foliares para a extração de óleos essenciais, por hidrodestilação durante 3 horas em aparelho graduado Clevenger. O rendimento de óleo essencial obtido em µl/g de massa verde foi então corrigido para base seca após secagem de amostras de 20 g de massa verde em estufa (FANEM - Mod. 320 SE) com circulação de ar a uma temperatura de 65º C, por 10 horas.

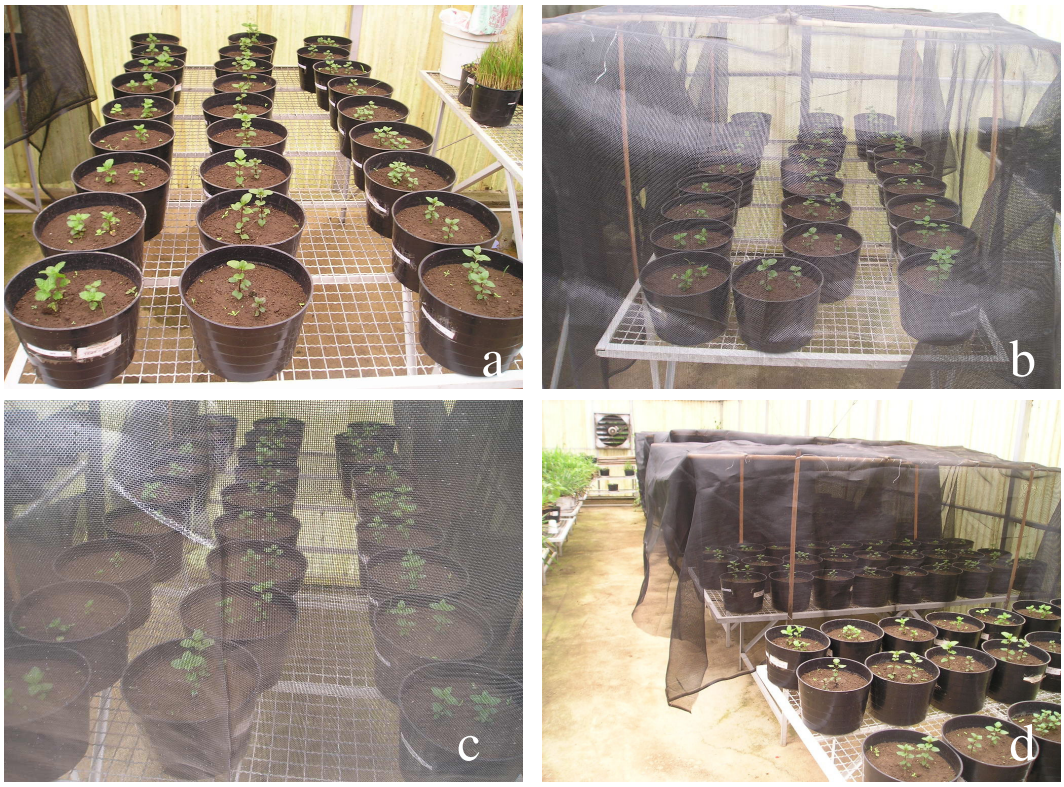

FIGURA 6. Tratamentos em casa-de-vegetação a) plantas expostas a 100% de radiação; b) plantas expostas a 70% de radiação; c) plantas expostas a 30% de radiação; d) todos os tratamentos, Curitiba-Pr, 2006.

3.2.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

As amostras de óleo foram analisadas qualitativamente mediante cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) pelo LACAUT (Laboratório de Análise Química de Combustíveis Automotivos - Departamento de Engenharia Química da UFPR). O cromatógrafo à gás utilizado foi da marca Varian, modelo CP-3800, com detector FID (CG_FID); coluna capilar Chrompack de sílica fundida CP-SIL 8 CB com 0,25mm de

diâmetro interno, 30m de comprimento e 0,25 μm de filme líquido. As condições de análise foram as seguintes: a) temperatura do injetor: 250ºC, split 1:30; b) quantidade de amostra injetada: 1,0 μL; c) pressão da coluna: 30,0 psi; d) gás de arraste: hélio a 1,0 mL/min na temperatura de 60 ºC; e) gás de make up: ar sintético, nitrogênio e hidrogênio; f) temperatura do detector FID: 300 ºC; g) programação da temperatura do forno: inicial 60 ºC, elevação da temperatura a 90 ºC na razão de 3 ºC permanecendo por 5 minutos, elevação da temperatura a 140 ºC na razão de 3 ºC, elevação da temperatura a 240 ºC na razão de 30 ºC permanecendo por 5 minutos; h) tempo total de análise/desenvolvimento: 40 minutos.

3.2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises de variância foram realizadas utilizando o programa MSTAT-C (NISSEN, 1993). As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO *M. aquatica* E *M.* x *piperita*.

Na avaliação do desenvolvimento vegetativo das espécies de *Mentha* houve interação entre os fatores radiação e genótipo para variável área foliar, as variedades "Lavander Mint" e "Peppermint" apresentaram médias superiores quando expostas a 100 e 70% de radiação, sendo que a variedade "Grapefruit Mint" mostrou-se mais sensível à diminuição da radiação, reduzindo significativamente sua área foliar a partir 70% (Tabela 3).

TABELA 3: Área foliar (cm2/planta) em variedades de *Mentha* sob diferentes níveis de radiação, Curitiba-Pr, 2006.

Espécie/variedade	**Radiação (%)**		
	100	**70**	**30**
M. aquatica / Lavander mint	796,33 Aa	681,35 Aa	225,74 Ba
M. x *piperita* / Grapefruit mint	711,74 Aa	180,78 Bb	208,81 Ba
M. x *piperita* / Peppermint	803,42 Aa	803,98 Aa	389,45 Ba

* Médias com as mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatísticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A análise estatística demonstrou interação também entre os fatores genótipo, radiação e nitrogênio para as variáveis massa seca e número de ramos, no entanto, para melhor apresentação dos resultados, os dados serão discutidos a partir da dupla interação dos fatores radiação/nitrogênio por genótipo avaliado.

O acúmulo de massa seca na variedade "Lavander Mint" diminuiu quando as plantas se desenvolveram em condições de 30% de radiação (Tabela 4). Não foi observado, no entanto, efeito da aplicação de nitrogênio o que talvez esteja relacionado com as menores exigências desta variedade as quais podem ter sido atendidas pelo nível de matéria orgânica do solo (Tabela. 1). Com relação ao número de ramos, observou-se redução das médias apenas na ausência de nitrogênio, pois quando o elemento estava presente, não houve efeito dos diferentes níveis de radiação.

A variedade "Grapefruit Mint" apresentou diminuição significativa no acúmulo de massa seca total em ambiente com limitação de radiação (Tabela 4). As médias observadas

em ambiente com 30% de radiação foram correspondentes a aproximadamente 10% das médias obtidas com radiação plena. Este efeito foi também acentuado na ausência de nitrogênio quando a redução de massa seca observada foi superior a 50%. Resultados semelhantes foram obtidos para número de ramos, onde houve efeito da radiação em solo adubado ou não com nitrogênio, de forma, diferenciada da variedade "Lavander Mint", cuja redução das médias de número de ramos foi observada apenas na ausência do elemento (tabela 4). A variedade "Peppermint" apresentou comportamento semelhante às demais variedades em relação à radiação. Embora a diminuição nas médias de massa seca tenha ocorrido a partir de 70% de radiação em solo adubado com N, e não apenas a 30% como observado em plantas que se desenvolveram em solo sem adubação nitrogenada, não houve efeito significativo da aplicação do elemento em cada um dos níveis de radiação. Assim como na variedade "Lavander Mint", o número de ramos foi afetado pelos níveis de radiação apenas na ausência de nitrogênio no solo (Tabela 4).

TABELA 4: Número de ramos e massa seca total (folhas e ramos) de variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada sob diferentes níveis de radiação, Curitiba-Pr, 2006.

Desenvolvimento vegetativo	**Radiação (%)**		
	100	**70**	**30**
***M. aquatica/* Lavander mint**			
Número de ramos			
Com adubação nitrogenada	13,83 Aa	15,22 Aa	13,78 Aa
Sem adubação nitrogenada	15,11 Aa	9,88 Bb	12,11 ABa
Massa seca total			
Com adubação nitrogenda	14,09 Aa	10,36 Aa	4,35 Ba
Sem adubação nitrogenada	12,76 Aa	10,89 Aa	5,13 Ba
***M.* x *piperita/* Grapefruit mint**			
Número de ramos			
Com adubação nitrogenada	7,44 Aa	2,83 Ba	1,05 Ba
Sem adubação nitrogenada	2,88 Ab	1,77 Aa	0,50 Aa
Massa seca total			
Com adubação nitrogenda	20,57 Aa	3,00 Ba	1,70 Ba
Sem adubação nitrogenada	8,53 Ab	4,83 ABa	1,82 Ba
***M. x piperita/* Peppermint**			
Número de ramos			
Com adubação nitrogenada	15,11 Aa	18,22 Aa	15,44 Aa
Sem adubação nitrogenada	16,66 Aa	15,27 ABa	11,66 Bb
Massa seca total			
Com adubação nitrogenada	14,81 Aa	10,04 Ba	4,43 Ca
Sem adubação nitrogenada	13,56 Aa	11,86 Aa	5,69 Ba

* Nas variedades médias com as mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatísticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Os resultados obtidos demonstram diferentes respostas das variedades de *Mentha* em relação a níveis de radiação e nitrogênio. Embora tenha sido observada redução no acúmulo de biomassa em ambiente com limitação de radiação em todos os materiais genéticos, esta redução foi mais acentuada na variedade “Grapefruit Mint”. A adubação com nitrogênio afetou o acúmulo de biomassa apenas desta variedade, indicando que as variedades “Lavander Mint” e “Peppermint” apresentam menor exigência do macronutriente. A recomendação de adubação nitrogenada utilizada neste experimento está considerando maiores níveis de exigência entre os materiais genéticos de menta. A ausência de resultados significativos no desenvolvimento em solo com adubação nitrogenada, pode estar relacionada com a quantidade de matéria orgânica no solo. POCA (2005) em estudos realizados com carqueja, não encontrou diferenças significativas para rendimento de massa e óleo essencial em diferentes níveis de matéria orgânica.

Com relação ao número de ramos, observou-se também efeito da radiação na variedade “Grapefruit Mint”, independente da adubação ou não com nitrogênio. Nas demais variedades, houve redução do número de ramos apenas em solo sem adubação nitrogenada. De forma semelhante, LI *et al*. (1996) observaram maiores médias de número de ramos, número de folhas e tricomas glandulares em 100% de radiação em *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris*.

3.3.2 RENDIMENTO E QUALIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL NAS ESPÉCIES DE *Mentha aquatica* E *Mentha* x *piperita*.

A análise estatística demonstrou interação tripla para a variável rendimento de óleo essencial, no entanto, para melhor apresentação dos resultados, os dados serão discutidos a partir da dupla interação dos fatores radiação/nitrogênio por genótipo avaliado.

As variedades “Lavander Mint” e “Peppermint” quando expostas às condições de limitação de radiação de 70 e 30% apresentaram redução no rendimento de óleo essencial, resposta observada tanto em solos que receberam a adubação nitrogenada como em solos sem adubação com este elemento. No caso específico da variedade “Lavander Mint”, houve efeito da adubação nitrogenada apenas em condição de radiação plena, quando as plantas adubadas apresentaram rendimentos de óleos essenciais superiores, resposta, no entanto, não observada na variedade “Peppermint”. Um comportamento diferenciado foi observado na variedade “Grapefruit Mint”, porém, não foi possível observar o rendimento bem como a qualidade do óleo essencial devido à falta de material vegetal para esta análise. Quando comparada com os demais materiais genéticos, esta variedade apresentou maior resposta

do desenvolvimento vegetativo em níveis crescentes de radiação, sendo as médias de massa seca e número de ramos reduzidas significativamente quando expostas às condições de limitação de radiação. Esta resposta foi ainda maior quando as plantas receberam a adubação nitrogenada (Tabela 5). A densidade de tricomas glandulares, local de síntese e armazenamento de óleo essencial, também pode diminuir com a expansão foliar, contribuindo para a redução do rendimento óleo essencial. Em *Mentha* x *piperita*, tem sido observado que a densidade de tricomas glandulares diminui com a expansão foliar (TURNER *et al.*, 2000a, 2000b).

TABELA 5: Rendimento de óleo essencial (µl/gr de massa seca) em variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada e sob diferentes níveis de radiação, Curitiba-Pr 2006.

Espécie / variedade	**Radiação (%)**		
	100	**70**	**30**
***Mentha aquatica* / Lavander mint**			
Com adubação nitrogenada	3,99 Aa	1,27Ba	0,56Ca
Sem adubação nitrogenada	1,46 Ab	0,93Ba	0,57Ca
***Mentha* x *piperita* / Grapefruit mint**			
Com adubação nitrogenada	2,76 Bb	3,79 Aa	-
Sem adubação nitrogenada	3,64 Aa	2,09 Bb	-
***Mentha* x *piperita* / Peppermint**			
Com adubação nitrogenada	2,63 Aa	2,21 Ba	1,42 Ca
Sem adubação nitrogenada	2,50 Aa	1,93 Ba	1,56 Ca

* Médias com as mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas clounas não diferem estatísticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Os resultados encontrados para rendimento de óleo essencial em relação à adubação nitrogenada para espécies de *Mentha* concordam com os estudos realizados por RAM *et al.*, (2006) e KIRAM & PATRA (2003a e 2003b) com *Mentha arvensis* e *Mentha spicata*, respectivamente, onde observaram aumento significativo de acúmulo de biomassa e rendimento de óleo essencial com doses crescentes de adubação nitrogenada. SIFOLA & BARBIERI (2006), em estudos realizados com manjericão utilizando as doses de 100 e 300 kg/ha de nitrogênio também obtiveram aumento significativo de médias de biomassa e produção de óleo essencial. Da mesma forma, AMARAL (2006), utilizando fonte mineral e orgânica de adubação nitrogenada, observou maior acúmulo de biomassa e produção de óleo essencial de camomila com aumento no fornecimento de N. Para níveis de radiação LI *et al.,* (1996) obtiveram resultados semelhantes para *Salvia e Thymus,* utilizando diferentes níveis de radiação: 45, 27 e 15% comparados à radiação plena. Os autores observaram que

o número de tricomas glandulares diminuiu de acordo com o decréscimo da radiação e que as plantas expostas a 100% de radiação acumularam maiores quantidades de óleo essencial, o que não está diretamente relacionado ao crescimento, pois plantas com o mesmo tamanho apresentaram diferenças na composição e rendimento do óleo essencial. SILVA *et al.*, (2006), observaram em carqueja submetida a diferentes níveis de radiação (20, 50, 60 e 100%), aumentos no acúmulo de biomassa e no rendimento de óleo essencial nas plantas expostas aos maiores níveis de radiação.

A variedade "Lavander Mint" apresentou em seu óleo essencial maior concentração dos constituintes majoritários de interesse em 100% de radiação, independente da presença ou ausência de adubação nitrogenada. A variedade "Grapefruit Mint" apesar de sensível as limitações de radiação e nitrogênio em relação ao seu desenvolvimento vegetativo não demonstrou diferenças na qualidade do seu óleo essencial nos diferentes níveis de radiação e nitrogênio. A variedade "Peppermint" obteve maior concentração dos constituintes, mentol e mentona, em 100% de radiação sem adubação nitrogenada (Tabela 6).

TABELA 6: Composição do óleo essencial (%) de variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada sob diferentes níveis de radiação, Curitiba-Pr, 2006.

Espécie/variedade	**Constituinte majoritário**	**Com adubação nitrogenada**			**Sem adubação nitrogenada**		
		100%	**70%**	**30%**	**100%**	**70%**	**30%**
M.aquatica / Lavander mint	Linalol	54,84	54,76	19,60	56,30	29,82	30,51
	Ac.de linalila	16,75	13,36	0,00	14,69	8,18	5,78
	*Total	71,59	68,12	19,60	70,99	38,00	36,29
M. x piperita /Grapefruit mint	Linalol	59,06	61,64	-	56,23	63,48	-
	Ac.de linalila	18,84	21,30	-	15,84	16,50	-
	Total	77,90	82,94	-	72,07	79,98	-
M. x piperita / Peppermint	Mentol	35,18	25,77	40,61	33,86	22,76	29,63
	Mentona	23,36	19,65	1,43	38,39	31,15	28,04
	Total	58,54	45,42	42,04	72,25	53,91	57,67

-: quantidade de material insuficiente para análise
* Porcentagem de constituintes majoritários no óleo essencial

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que plantas expostas as mais altas radiações aumentam seu desenvolvimento, bem como o rendimento e a qualidade de seus óleos essenciais, e que a adubação nitrogenada influencia a qualidade dos óleos essenciais da variedade "Lavander Mint".

3.4 CONCLUSÕES

O acúmulo de massa seca total para as variedades de *Mentha* foi superior em plantas expostas a 100% e 70% de radiação, sendo que a adubação nitrogenada influência apenas o desenvolvimento das plantas expostas a 100% de radiação. A limitação resulta em diminuição no desenvolvimento foliar das variedades “Lavander Mint”, “Peppermint” e “Grapefruit Mint”, sendo que está última é mais sensível.

Quanto ao número de ramos as variedades “Lavander mint” e “Peppermint”, apresentam menor exigência de nitrogênio e radiação, já “Grapefruit mint” é mais sensível a limitação de radiação, mais exigente quanto adubação nitrogenada.

A produtividade de óleos essenciais nas variedades de menta é superior quando expostas à maiores níveis de radiação, sendo que a adubação nitrogenada aumenta a produtividade de óleo de variedade “Lavander mint ” em condições de 100% de radiação e em “Grapefruit mint” aumenta a produtividade em 70% de radiação.

A maior concentração do constituinte majoritário, linalol para a variedade “Lavander Mint” ocorre em plantas expostas aos maiores níveis de radiação na presença de nitrogênio, a ausência deste elemento juntamente com a limitação de radiação afetou negativamente a concentração dos constituintes majoritários nesta variedade. Em “Grapefruit Mint” não foi verificada diferença significativa, na concentração dos constituintes majoritários, entre os níveis de radiação, presença e ausência de nitrogênio. Para a variedade “Peppermint”, as mais altas concentrações de mentol e mentona ocorrem em plantas expostas as mais altas radiações sem utilização da adubação nitrogenada.

REFERÊNCIAS

1. AMARAL, W. **Desenvolvimento de camomila e produção de óleo essencial sob diferentes condições de manejo**. 2006, Curitiba. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia) Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná.
2. CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**, 2. ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004. p. 48-66.
3. CROWELL, A. L. ; WILLIAMS, D. C.; DAVIS, E. M.; WILDUNG M. R.; CROTEAU, R. Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 405, p. 112-121, 2002.
4. DESCHAMPS, C.; ZANATTA, J. L.; ROSWALKA, L.; OLIVEIRA, M. de C.; BIZZO, 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, n. 1, p. 23-34, 2006.
5. FAROOQI, A. H. A.; SANGWAN, N. S.; 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.
6. KIRAN, U.; PATRA D. D. Medicinal and aromatic plant materials as nitrification inhibitors for augmenting yield and nitrogen uptake of Japanese mint (*Mentha arvensis* L. var. Piperascens) **Bioresource Technology**, v.86, p. 267–276, 2003 a.
7. KIRAN, U.; PATRA D. D. Influence of natural essential oils and their by-products as nitrification retarders in regulating nitrogen utilization for Japanese mint in sandy loam soils of subtropical central India Agriculture. **Ecosystems and Environment** v. 94, p. 237–245, 2003 b.
8. LAWRENCE B. M. A review of the world production of essential oil. **Perfumer & Flavorist**, v. 10, p. 2–16, 1985.

9. LI, Y.; CRAKER, L. E.; POTTER, T. Effect of light level on essential oil production of sage (*salvia officinalis*) and thyme (*thymus vulgaris*). **Acta Horticulturae**, v. 426, p. 419-426,1996
10. LIMA H. R. P.; KAPLAN M. A. C.; CRUZ A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas, **Floresta e Ambiente**, v. 10, n.2, p.71 - 77, 2003.
11. NISSEN, O. MSTAT-C. **A microcomputer for design, management, and analysis of agronomic research experiments**. Version 2.11 East Lansing: Michigan State University, 1993. p. 300
12. POCA, A. M. P. C.. **Biomassa, óleo essencial, perfil fitoquímico e nutrientes da carqueja sob influência de fontes e doses de nitrogênio**. 2005, Curitiba. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia) Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná.
13. RAIJ B.; CANTARELLA H.; QUAGGIO J. A.; FURLANI A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo.** Campinas: Instituto Agronômico e Fundação IAC, 1996. p. 285.
14. RAM, D.; RAM, M.; SINGH, R. Optimization of water and nitrogen application to menthol mint (*Mentha arvensis* L.) through sugarcane trash mulch in a sandy loam soil of semi-arid subtropical climate. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 886–893, 2006.
15. SIFOLA, M. I.; BARBIERI, G. Growth, yield and essential oil content of three variedades of basil grown under different levels of nitrogen in the field. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 408–413, 2006.
16. SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO M. G.; NASCIMENTO, E. A.; NELSON D. L.; SALES, J. F.; MOL, D. J. S. Influence of radiation level on plant growth, yield and quality of essential oil in carqueja. **Ciência Agrotecnológica**, v. 30, n. 1, p. 52-57, 2006.
17. TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
18. TURNER, G. W.; CROTEAU, R. Organization of monoterpene biosynthesis in Mentha. Immunocytochemical localization of geranyl diphosphate syntase, limonene-6-hidroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. **Plant Physiology**, v.136, p. 4215- 4227, 2004.

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

20. TURNER, G. W ; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B Development of peltate glandular trichomes of peppermint. **Plant Physiology**, v. 124, p. 675-679, 2000 b.

.

4 CAPÍTULO III – METABOLISMO DE *Mentha* x *piperita* E *M. aquatica* SOB DIFERENTES NÍVEIS DE RADIAÇÃO E NITROGÊNIO.

RESUMO

O sucesso de uma espécie em diferentes condições de radiação está relacionado com a eficácia e rapidez com que esta espécie se adapta às novas condições a que foi exposta. O menor ou maior poder de adaptação muitas vezes está relacionado ao ajuste do seu aparelho fotossintético, para que possa garantir com maior eficácia a conversão da energia radiante em carboidratos e, conseqüentemente, maior crescimento. O nitrogênio é um elemento de extrema importância no metabolismo vegetal. O fornecimento de nitrogênio é necessário, pois este participa de inúmeros processos bioquímicos e da síntese de inúmeros compostos como: aminoácidos proteínas, ácidos nucléicos e clorofilas Este experimento teve como objetivo avaliar a influencia da adubação nitrogenada e radiação, no metabolismo de *Mentha aquatica* e *Mentha* x *piperita.* O experimento foi desenvolvido em condições de casa-de-vegetação em delineamento experimental inteiramente casualizado, comparando o efeito de genótipos, adubação nitrogenada (presença e ausência) e níveis de radiação (100%, 70% e 30%), cada qual com três repetições. A concentração de clorofilas totais, *a* e *b*, açúcares totais e redutores, proteínas totais e atividade da enzima nitrato redutase, foi avaliada em cada unidade experimental. A diminuição da radiação aumentou a concentração de clorofilas totais, *a* e *b* nas espécies de menta, porém sem efeito da adubação nitrogenda. A adubação nitrogenada eleva os níveis de proteínas totais na presença de 100% de radiação para “Lavander Mint”, no entanto não influencia o acúmulo de proteínas nas variedades “Grapefruit Mint” e “Peppermint” nos diferentes níveis de radiação. A atividade da enzima nitrato redutase aumentou com a adubação nitrogenada nas espécies de menta, sendo similar nos diferentes níveis de radiação. As plantas que não receberam a adubação nitrogenada diminuíram a atividade enzimática nos menores níveis de radiação. O acúmulo de açúcares totais e redutores, em folhas das variedades de *Mentha,* são superiores em plantas expostas aos mais altos níveis de radiação.

Palavras chave: nitrato redutase, clorofila, açúcares, proteínas.

ABSTRACT

The plant species production under different levels of radiation is related with the efficiency which those plants adapt under the condition that were exposed. The nutrient nitrogen affects the plant metabolism being present on aminoacids, proteins and chlorophyll molecules. This experiment had as main objective to evaluate the affect of radiation levels and nitrogen fertilization on mint species metabolism. The experiment was carried out greenhouse condition in completed randomized design. The essential oil wa obtained by hydrodestilation during 3 hours and them analyzed by GC/MS. The concentration of *a*, *b* and total chlorophyll, total and reducing sugars, total protein and nitrate reductase enzyme activity of levaes was evaluated on each experimental unit. The decrease on radiation increased the concentration of *a*, *b* and total chlorophyll on kind species, however without effect of nitrogen fertilization. Nitrogen supplies increase the protein level on chemotype linalool of *M. aquatica* but with no changes on leaves of chemotypes of *M.* x *piperita* under different radiation levels. The nitrate reductase activity increased with nitrogen fertilization on all mint species, with no difference among the radiation levels. The developed plants under without nitrogen fertilization showed a decrease of enzyme activity. Total and reducing sugars accumulation in mint leaves were great when high level of radiation was provided.

Key words: nitrate reductase, chlorophylls, sugar, protein.

4.1 INTRODUÇÃO

O metabolismo vegetal está condicionado ao processo fotossintético. Deste resultam as substâncias do metabolismo primário, como aminoácidos, nucleotídeos e açúcares, as quais irão originar os metabólitos secundários (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O desenvolvimento de uma determinada espécie em diferentes condições de radiação está relacionado com a eficácia e rapidez com que esta espécie se adapta às novas condições a que foi exposta. O nível de adaptação por sua vez, está diretamente relacionado ao ajuste do aparelho fotossintético, de forma a garantir com maior eficácia a conversão da energia radiante em carboidratos e, conseqüentemente, maior crescimento (DIAS-FILHO, 1997; CAMPOS & UCHIDA, 2002; TAIZ & ZEIGER, 2004).

O nitrogênio é um elemento de extrema importância no metabolismo vegetal. O fornecimento de nitrogênio é necessário, pois este participa de inúmeros processos de síntese de compostos como: aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos e clorofilas. A principal forma de nitrogênio na terra é o molecular, que totaliza 78% dos gases atmosféricos, no entanto, apenas algumas plantas que se associam a organismos fixadores de nitrogênio são capazes de utilizar nitrogênio molecular. A maioria das plantas absorve nitrogênio inorgânico na forma de nitrato, sendo a nitrato redutase a primeira enzima envolvida na assimilação do N-inorgânico. Esta enzima tem como função a redução do nitrato a nitrito no citoplasma, assumindo papel de extrema importância no metabolismo vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A qualidade e o rendimento dos óleos essenciais estão diretamente relacionados ao metabolismo primário vegetal, pois este deve fornecer condições ideais para a formação dos metabólitos secundários, seja em condições ótimas para que estas plantas possam alocar suas reservas para produção destes metabólitos ou em situações adversas para que acionem seus mecanismos de defesa (TAIZ & ZEIGER, 2004, CASTRO *et al.*, 2004).

Devido a grande importância do elemento nitrogênio para os organismos vegetais, e da radiação para fixação de carbono, tornam-se necessários estudos que avaliem diferentes níveis de radiação e nitrogênio nas diversas espécies do gênero *Mentha.* A fim de avaliar possíveis plantios em consórcio ou maior adensamento, onde a competição por luz aumenta, sem que estes tratamentos interfiram no potencial de qualidade e rendimento dos óleos essências destas espécies.

Este experimento teve como objetivo avaliar a influência da adubação nitrogenada e radiação no metabolismo de *Mentha aquatica* e *Mentha* x *piperita.*

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos de setembro a dezembro de 2005 em condições de casa-de-vegetação e as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo - UFPR (Curitiba, PR).

4.2.1 MATERIAL VEGETAL

As espécies *Mentha aquatica*, variedade "Lavander Mint" e *Mentha* x *piperita* variedades "Grapefruit Mint" e "Peppermint", foram incluídas, conforme descrito no Capítulo II.

4.2.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL NOS TECIDOS FOLIARES

Para a determinação de proteína nos tecidos foliares foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976), onde 1 g de folhas frescas, na forma de discos foliares com área de 0,7854 cm^2 foram lavados e secos sendo posteriormente, macerados em 10 mL de solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,5. O extrato obtido foi, em seguida, filtrado e centrifugado por 10 minutos, a 20.000 x g, a 4 ºC.

Após a centrifugação foi retirada uma alíquota 40 µL do sobrenadante e transferida para um tubo de ensaio, sendo adicionados 460 µL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,5, e 1000 µL do reagente de Bradford (1:4, v/v). A leitura das absorbâncias foi obtida em espectrofotômetro Shymadzu UV-1601 no comprimento de onda de 630 nm. As concentrações de proteínas foram calculadas por meio de curva-padrão de soro albumina bovina (BSA).

4.2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NITRATO REDUTASE (NR)

Otimização do método para determinação da atividade da NR

A atividade enzimática pode ser avaliada por meio do consumo de substrato ou formação de produto. No presente trabalho a atividade da enzima nitrato redutase foi

determinada pela formação de nitrito, utilizando a metodologia proposta por JAWORSKI (1971).

Para se estabelecer melhores condições de análise da atividade da enzima nitrato redutase em espécies de *Mentha* foi necessário realizar inicialmente a otimização do método *in vivo* de JAWORSKI (1971). Foram utilizadas folhas de *Mentha aquatica* L., cultivadas em casa-de-vegetação. Cerca de 1,0 grama de tecido foliar foi reduzido a pedaços, os quais, foram colocados em frascos contendo 2,5 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5, contendo propanol a 1%, e 1,5 mL de uma solução de KNO_3 (concentração final de 0,4 mM) para os ensaios de atividade da enzima. No controle negativo (branco), substituiu-se a solução de KNO_3 pelo mesmo volume de água destilada. Em seguida, os frascos contendo os materiais foram agitados manualmente com auxílio de bastão de vidro, cada tratamento foi submetido ou não a vácuo, por 1 minuto, utilizando dessecador ligado a uma bomba pressurizadora, e em seguida incubados no escuro a 30° C por 30 minutos. Para ajustar a melhor concentração de substrato no meio de reação, um ensaio adicional foi conduzido utilizando-se 0,2, 0,4, 0,8, 1,5 e 3,0 mM de KNO_3 . Após o período de incubação, alíquotas de 1 mL da solução foram retiradas e transferidas para tubos de ensaio onde foram adicionados 4 mL do reagente de nitrito [sulfanilamida a 1% e hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina a 0,02% (1:1 v/v)]. Estes foram, então, incubados por 15 minutos a 30°C. Todas as concentrações foram calculadas em função do volume final do sistema de incubação.

Um segundo ensaio, utilizando a mesma metodologia descrita acima, determinou a quantidade de tecido foliar de *M. aquatica* a ser utilizada para determinação da atividade da enzima. Para alcançar este objetivo, utilizou-se, 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 gramas de tecidos foliares no meio de reação.

As quantificações foram feitas em espectrômetro Shymadzu UV-1601 no comprimento de onda de 540 nm, a atividade da enzima foi calculada pela quantidade de nitrito formado por grama de tecido foliar a partir da curva padrão de nitrito, expressa em n/mol No_2/g.

Determinação da atividade da enzima nitrato redutase

Um total de 0,5 g de tecido foliar fresco das espécies de *Mentha* coletados na forma de discos foliares com área de 0,7854 cm^2 foi adicionado em tubos de ensaio contendo 2,5 mL tampão fosfato 0,2 M pH 7,5, e 1,5 mL de KNO_3 8 mM e incubados em banho-maria a 30 ºC durante 30 minutos. Após a incubação, foi transferido 1 mL da solução para tubos de

ensaio onde foi adicionado o reagente de nitrito [sulfanilamida a 1% e hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina a 0,02% (1:1 v/v)]. Os tubos foram então incubados por 15 minutos a 30°C. A quantidade de nitrito formado foi analisada utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda a 540 nm. A atividade da enzima foi então expressa pela quantidade de produto formado (nmol NO_2/g).

4.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILA a, CLOROFILA b E CLOROFILA TOTAL

Para a determinação da concentração das clorofilas nas espécies de *Mentha* utilizou-se 20 discos foliares com área correspondente a 0,7854 cm^2 que foram colocados em almofariz e macerados em 10 mL de álcool etílico a 80% (v/v). Após a maceração, procedeu-se a filtragem em papel de filtro qualitativo e centrifugação por 10 minutos , a 20.000 x g, a 4ºC (LICHTENTHALER & WELLBURN, 1983). Foram, então, analisados 2 mL do sobrenadante em espectrofotômetro Shymadzu UV-1601, nos comprimentos de onda de 645nm para clorofila a e 663 nm para clorofila b, para quantificação das clorofilas. Nos cálculos dos teores de clorofilas a, b e total, consideraram-se as equações de LINDER (1974).

4.2.5 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método DNS (ácido dinitro salicílico) (MILLER 1959). Tecidos foliares das espécies de *Mentha* foram lavadas com água destilada e secas. Amostras de 0,5 g foram colocadas em almofariz e maceradas em 10 mL de solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,5. O macerado foi filtrado e centrifugado por 10 minutos, a 20.000 x g, a 4ºC. Após esta etapa, retirou-se 1,0 mL do sobrenadante e adicionou-se 1,0 mL do reagente DNS, completando-se o volume de 10 mL com água destilada. Finalmente, realizou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro Shymadzu UV-1601 no comprimento de onda de 540 nm, sendo as concentrções determinadas a partir de curva-padrão de glucose.

4.2.6 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS

Para a quantificação da concentração de açúcares totais foi utilizado o método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Folhas das espécies de *Mentha* foram lavadas com água destilada e secas. Em seguida, coletou-se 0,5 g de tecido foliar e macerou-se em almofariz com 10 mL de solução tampão fosfato 0,2M, pH 7,5. O macerado foi posteriormente filtrado, e centrifugado por 10 minutos a 20.000 x g, a 4ºC. Após a centrifugação, retirou-se 100 µL do sobrenadante e adicionou-se 349 µL de H_2O, 500 µL fenol a 0,5% e 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Shymadzu UV-1601 no comprimento de onda de 490 nm e as concentrações de açúcares totais determinadas por meio de curva-padrão de glucose.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NITRATO REDUTASE (NR) EM *Mentha aquatica* L.

A utilização de níveis crescentes de substrato (NO_3) resultou em aumento na produção de NO_2 (Figura 4). Apesar de concentrações maiores de substrato resultarem em atividades superiores, a maior diferença entre NO_2 produzido foi observado quando se passou da concentração 0,4 para 0,8 mM (aumento de quase 10 vezes). O aumento do substrato induz a atividade tanto da NR quanto da nitrito redutase (NIR) (DATTA & SHARMA, 1999) e os menores aumentos na concentração de NO_2 observados em tecidos de *M. aquatica*, parecem demonstrar o clássico comportamento de saturação enzimática pela concentração do substrato.

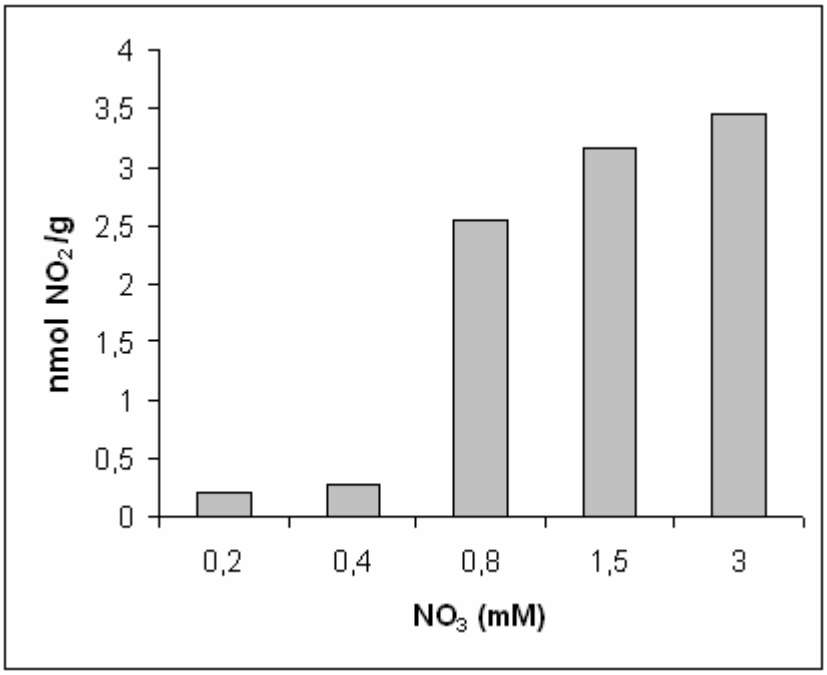

FIGURA 7 Quantidade de nitrito formado em função da concentração de substrato NO_3. (1g de material vegetal), Curitiba-Pr, 2006.

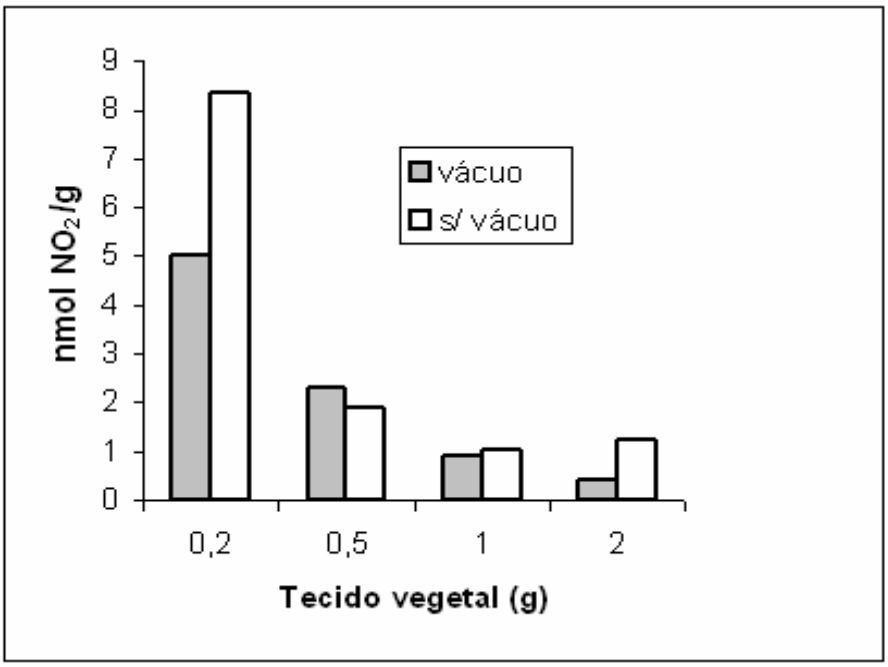

FIGURA 8 Quantidade de nitrito formado em função da quantidade de material vegetal, concentração final de substrato de 0,4 mM, Curitiba-Pr,2006.

Ao serem testadas diferentes quantidades de material vegetal na avaliação da atividade da enzima nitrato redutase observou-se que as menores quantidades resultaram em maiores valores de atividade enzimática, sendo que 0,2 g de material foram suficientes para a produção de 8,4 mg de NO_2 por grama de tecido vegetal. O aumento na quantidade de material vegetal resultou em redução nas concentrações de NO_2 (Figura 5). A diminuição da atividade, com o aumento de material vegetal pode estar relacionada com o aumento de outras substâncias no ambiente de incubação, o que poderia dificultar a reação enzima substrato.

O uso de vácuo para melhorar a infiltração de NO_3 nos tecidos vegetais não resultou em maiores concentrações de NO_2 (Figura 5). Estes resultados sugerem a ineficiência do sistema, ou perdas de NO_2 no processo ou ainda uma rápida conversão desse composto (NO_2) em NH_3 (LEA, 1997).

O objetivo deste experimento foi determinar as melhores condições de análise da nitrato redutase *in vivo* em *Mentha*, avaliando-se o efeito da quantidade de tecido vegetal, da infiltração NO_3 com vácuo e concentração de substrato NO_3, para obtenção de melhores condições de análise da atividade *in vivo* da enzima em *M. aquatica*. Conforme STOLTZ & BAZU (2002), apesar da enzima nitrato redutase catalisar a mesma reação em espécies vegetais, sua localização dentro dos tecidos, estrutura e mecanismos regulatórios são características de cada organismo. Portanto, faz-se necessário o estabelecimento das

melhores condições para cada espécie com a finalidade de se obter a otimização da atividade enzimática.

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILA a, b E TOTAL, AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES, PROTEÍNAS TOTAIS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA NITRATO REDUTASE EM ESPÉCIES DE *Mentha aquatica* E *Mentha* x *piperita*.

Para clorofilas totais, *a* e *b*, os resultados obtidos demonstraram que houve efeito significativo dos fatores radiação e genótipo. Com 70% e 30% de radiação ocorreram maiores médias para clorofilas totais, *a* e *b,* sendo que a variedade "Peppermint" demonstrou maiores médias (Tabelas 7 e 8). O aumento no teor de clorofilas das folhas de sombra está relacionado às adaptações fisiológicas em plantas sob condições de limitação de radiação. Plantas de ambientes sombreados possuem um número inferior de cloroplastos quando comparadas a plantas expostas a pleno sol. No entanto, cada cloroplasto de folhas sombreadas possui um número maior volume de tilacóides, onde ficam alocadas as moléculas de clorofila (LAMBERS *et al*, 1998). Os resultados deste experimento concordam com aqueles encontrados por LIMA JR. (2005), ALMEIDA (2004) e ENGEL & POGGIANI (1991), testando espécies florestais em 3 níveis de sombreamento, onde observaram maior acúmulo de clorofilas nos níveis mais baixos de radiação.

TABELA 7: Quantificação de clorofilas:total *a* e *b* (mg/cm^2) em variedades de *Mentha* sob diferentes níveis de radiação, Curitiba-Pr, 2006.

Radiação	Clorofila Total	Clorofila A	Clorofila B
100%	2,037 b	1,266 b	0,771 b
70%	2,372 a	1,482 ab	0,891 a
30%	2,634 a	1,663 a	0,971 a

* Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem estatísticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 8: Quantificação de clorofilas:total *a* e *b* (mg/cm^2) em variedades de *Mentha* sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio, Curitiba-Pr, 2006.

Espécie/ variedade	Clorofila Total	Clorofila A	Clorofila B
M. aquatica / Lavander mint	2,194 b	1,385 b	0,809 b
M. x *piperita* / Grapefruit mint	2,093 b	1,317 b	0,776 b
M. x piperita / Peppermint	2,756 a	1,709 a	1,048 a

* Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem estatísticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A análise estatística demonstrou interação tripla entre os fatores genótipo, radiação e nitrogênio para as variáveis proteínas totais, nitrato redutase, açúcares totais e redutores, no entanto para melhor apresentação dos resultados, os dados serão discutidos a partir da dupla interação dos fatores radiação/nitrogênio por genótipo avaliado.

A variedade “Lavander Mint” em solo adubado com nitrogênio apresentou maior concentração de proteínas nos tecidos foliares quando exposta a 100% de radiação, sendo observada uma diminuição significativa quando houve limitação de radiação. Em solo não adubado com nitrogênio esta diminuição não foi observada. Este comportamento está provavelmente relacionado com os teores de matéria orgânica de solo que atendeu as exigências do material genético avaliado (Tabela 1 - Capítulo II). A atividade da enzima nitrato redutase embora não tenha sido alterada em solo adubado com nitrogênio, apresentou redução significativa devido à limitação de radiação em solo não adubado com nitrogênio (Tabela 9). Estes resultados indicam que nas condições de limitação de radiação em solo não adubado, houve um maior acúmulo de proteínas estruturais, provavelmente ligadas aos tilacóides dos cloroplastos, em detrimento de proteínas catalíticas como no caso da enzima nitrato redutase. A variedade “Grapefruit Mint” em solo adubado com nitrogênio apresentou maior concentração de proteínas nos tecidos foliares quando exposta a 100% e 70% de radiação, sendo observada uma diminuição significativa em 30% de radiação. Em solo não adubado com nitrogênio como em “Lavander Mint” esta diminuição não foi observada. A atividade da enzima nitrato redutase por sua vez embora não tenha sido alterada em solo adubado com nitrogênio, apresentou redução significativa em 30% de radiação em solo não adubado com nitrogênio (Tabela 9).

Para a variedade “Peppermint” apresentou maior quantidade de proteínas nos tecidos foliares, diretamente proporcional à radiação na presença de nitrogênio e inversamente proporcional na ausência de nitrogênio. Para 100% de radiação com nitrogênio e em 30% de radiação sem nitrogênio as maiores médias de proteínas nos tecidos foliares. Atividade da enzima nitrato redutase demonstrou maior atividade em 30% de radiação quando utilizada adubação nitrogenada (Tabela 9). Este resultado concorda com os encontrados por ANDRADE NETTO (2005), em experimento realizado com café em diferentes níveis de radiação, onde em plantas sombreadas foi observada maior atividade da enzima nitrato redutase, média 2,5 x superior àquelas expostas a sol pleno. Este resultado indica uma possível adaptação desta espécie para ambientes sombreados em que nas condições de limitação de radiação em solo adubado, houve um maior acúmulo de proteínas catalíticas em detrimento as proteínas estruturais.

TABELA 9: Concentração de proteínas totais (µg/g) e atividade da enzima nitrato redutase em variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada dob diferentes níveis de radiação, Curitiba-Pr, 2006.

	Radiação (%)		
	100	**70**	**30**
***M. aquatica* / Lavander mint**			
Proteínas Totais			
Com adubação nitrogenada	144,13 Aa	105,31 Bb	120,25 Ba
Sem adubação nitrogenada	139,36 Aa	126,50 Aa	130,42 Aa
Redutase de Nitrato			
Com adubação nitrogenada	1,20 Aa	1,11Aa	1,16 Aa
Sem adubação nitrogenada	1,59 Aa	0,90 Ba	0,51 Cb
***M.* x *piperita* / Grapefruit mint**			
Proteínas Totais			
Com adubação nitrogenada	158,46 Aa	142,05 Aa	119,64 Ba
Sem adubação nitrogenada	156,99 Aa	133,11 Ba	126,75 Ba
Redutase de Nitrato			
Com adubação nitrogenada	2,43 Aa	1,92 Ba	2,51 Aa
Sem adubação nitrogenada	1,37 ABb	1,46 Ab	1,04 Bb
***M. x piperita* / Peppermint**			
Proteínas Totais			
Com adubação nitrogenada	135,31 Aa	118,53 Aa	119,02 Aa
Sem adubação nitrogenada	109,35 Bb	119,88 Aba	130,66 Aa
Redutase de Nitrato			
Com adubação nitrogenada	1,25 Ba	1,17 Ba	1,97 Aa
Sem adubação nitrogenada	0,67Ab	0,51 Ab	0,51Ab

* Nas variedades médias com as mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatísticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação ao acúmulo de açúcares totais e redutores para a variedade “Lavander mint”, houve redução tanto em solo adubado como não adubado com nitrogênio quando as plantas estavam expostas à condição de limitação de radiação. Considerando especificamente cada nível de radiação, observa-se que as médias de concentração de açúcares totais e redutores foram superiores em solo adubado com nitrogênio (Tabela. 10).

Para a variedade “Grapefruit mint” houve redução no acúmulo açucares totais tanto em solo adubado como não adubado com nitrogênio quando as plantas estavam expostas à condição de limitação de radiação. Para açúcares redutores não houve diferença entre os níveis de radiação para o solo adubado com nitrogênio, em solo sem adubação nitrogenada ocorreu diminuição significativa a partir de 70% de radiação (Tabela. 10).

Em “Peppermint” plantas que receberam adubação nitrogenada o acúmulo de açúcares totais foi superior àquelas que não receberam. Com a limitação da radiação houve

diminuição do acúmulo de açúcares totais com ou sem adubação nitrogenada e de açúcares redutores sem adubação nitrogenada (Tabela 10).

TABELA 10: Concentração de açúcares totais e redutores (µg/g) em variedades de *Mentha* com e sem adubação nitrogenada sob diferentes níveis de radiação, Curitiba-Pr, 2006.

	Radiação (%)		
	100	**70**	**30**
***M. aquatica* / Lavander mint**			
Açucares totais			
Com adubação nitrogenada	190,63 Aa	63,98 Ba	71,09 Ba
Sem adubação nitrogenada	79,93 Ab	50,09 Bb	45,82 Bb
Açucares redutores			
Com adubação nitrogenda	14,86 Aa	11,24 Ba	7,13 Ca
Sem adubação nitrogenada	10,13 Ab	7,77 Bb	8,52 Ba
***M.* x *piperita* / Grapefruit mint**			
Açucares totais			
Com adubação nitrogenada	168,84 Aa	134,39 Ba	86,72 Ca
Sem adubação nitrogenada	150,52 Ab	95,88 Bb	90,35 Ba
Açucares redutores			
Com adubação nitrogenada	8,48 Ab	8,38 Aa	7,42 Aa
Sem adubação nitrogenada	10,75 Aa	5,50 Bb	6,00 Ba
***M. x piperita* / Peppermint**			
Açucares totais			
Com adubação nitrogenada	110,72 Aa	100,93 Aa	45,19 Ba
Sem adubação nitrogenada	61,61 Ab	29,71 Bb	28,77 Bb
Açucares redutores			
Com adubação nitrogenada	9,51 Aa	6,00 Ba	6,30 Ba
Sem adubação nitrogenada	8,29 Aa	5,94 Ba	4,61 Ba

* Nas variedades médias com as mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatísticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A maior concentração de proteínas, açúcares totais e redutores nas folhas expostas à radiação 100% de radiação se dá devido à maior atividade fotossintética dessas plantas. Quanto maior a exposição à radiação maior atividade da enzima Rubisco que é a enzima responsável pela fixação de CO_2, sendo posteriormente convertido em açúcar no ciclo de Calvin-Benson (TAIZ & ZEIGER, 2004). Em condições ideais a sacarose é translocada na planta para sustentar o crescimento, enquanto o amido é acumulado nos cloroplastos para servir como reserva de carboidratos durante os períodos em que a fotossíntese não está ocorrendo (HAMMOND & BURTON, 1983; HEWITT *et al.*, 1985). A maioria das espécies vegetais acumula uma quantidade suficiente de amido, durante o período de luz para suprir a demanda de energia no período de escuro e manter um crescimento eficaz (HEWITT *et al.*, 1985). Os mais baixos níveis de açúcares redutores em plantas sombreadas podem ser

justificados pela baixa atividade fotossintética dessas plantas, pois estas possuem metabolismo mais lento diminuindo a formação desses açúcares.

Dos fatores climáticos, a intensidade luminosa é o que mais afeta a assimilação de nitrato pelas plantas. A atividade da enzima nitrato redutase em plantas suplementadas com nitrogênio foi superior a aquelas que não receberam adubação nitrogenada, sendo que estas ficaram mais susceptíveis às variações dos níveis de radiação, apresentando menor atividade enzimática com a limitação da radiação. Em condições de baixa intensidade luminosa, a atividade da nitrato redutase diminui, afetando a produção de ferredoxina que atua como agente redutor na assimilação do nitrato, fazendo com que ocorra acúmulo de nitrato nos vacúolos (MANTOVANI *et al.*, 2005), sendo esta uma possível explicação para menores concentrações de NO_2.

4.4 CONCLUSÕES

Menores níveis de radiação aumentam a concentração de clorofilas totais, a e b nas variedades de Mentha, “Lavander Mint”, “Grapefruit Mint” e “Peppermint”, não tendo efeito da adubação nitrogenada.

A adubação nitrogenada eleva os níveis de proteínas totais na presença de 100% de radiação para “Lavander Mint”, no entanto não influencia o acúmulo de proteínas nas variedades “Grapefruit Mint” e “Peppermint” nos diferentes níveis de radiação. A adubação nitrogenada aumenta a atividade da enzima nitrato redutase, sendo similar nos diferentes níveis de radiação. As plantas que não receberam a adubação nitrogenada diminuíram a atividade enzimática nos menores níveis de radiação.

O acúmulo de açúcares totais e redutores, em folhas das variedades de *Mentha,* são superiores em plantas expostas aos mais altos níveis de radiação.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, L. P.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; ZANELA, S. M.; VIEIRA, C. V. Early growth of plants of *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submitted to radiation solar levels. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 83-88. 2004.
2. ANDRADE NETTO, J. F. **Atividade das enzimas nitrato redutase e glutamine sintase em cafeeiro arábica**. 2005. Piracicaba. Dissertação de mestrado, (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)
3. BRADFORD, M. M., Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. **Analytical Biochemestry**, v. 72, p. 248-254. 1976.
4. CAMPOS, M. A. A.; UCHIDA, T. Influence of shade on the growth of seedlings of three Amazon species. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.3, p.281-288, 2002.
5. CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**, 2. ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004. p. 48-66.
6. DATA, R.; SHARMA, R. Temporal and spatial regulation of nitrate reductase and nitrite reductase in greening maize leaves. **Plant Science**, v. 144, p. 77-83. 1999.
7. DIAS-FILHO, M. B. Physiologycal response of *Solanum crinitum* Lam. to contrasting light environments. **Pesquisa Agropececuária Brasileira**, v. 32, p. 789-796. 1997.
8. DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p.350-356, 1956.
9. ENGEL, V. L; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n. 1 p. 39-45. 1991.

10. HAMMOND, J. B. W.; BURTON, K. S. Leaf starch metabolism during the growth of pepper (*Capsicum annuum*) plants. **Plant Physiology**, England, v. 73, p. 61-65, 1983.

11. HEWITT, J. D.; CASEY, L. L.; ZOBEL, R. W. Effect of day length and night temperature on starch accumulation and degradation in soybean. **Annals of Botany**, v. 56, p. 513-522, 1985.

12. JAWORSKI, E. K. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 43, p. 1274-1279, 1971.

13. LAMBERS, H., CHAPIN, F. S., PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology.** USA: Springer, 1998.

14. LEA, P. J. Primary nitrogen metabolism. In: DAY, P. M.; HARBORNE, J. B. (eds.) **Plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1997. p. 273-313.

15. LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determination of total caratenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v.11, p.591-592. 1983.

16. LIMA JR, E. C.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; VIEIRA, C. V.; OLIVEIRA, H. M. Gas exchange and initial growth of young leaves of *Cupania vernalis* camb. Submitted to different shading levels. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p.1092-1097. 2005.

17. LINDER, S. A proposal for the use of standardized methods for chlorophyll determinations in ecological and ecophysiological investigations. **Physiology Plantarum**, v.32, p.154-156. 1974.

18. MANTOVANI, J. R.; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. Produção de alface e acúmulo de nitrato em função da adubação nitrogenada. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.3, p.758-762, 2005.

19. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

20. STOLTZ, J. F.; BAZU, P. Evolution of nitrate reductase: Molecular and structural variations on a common function. **Chembiochem**, v 3, p**.** 198-206, 2002.

21. TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

5 CAPITULO IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho avaliou-se o comportamento de materiais genéticos de *Mentha* em respostas à adubação nitrogenada e diferentes níveis de radiação, visando um melhor desenvolvimento vegetativo e produção de óleo essencial. Foram avaliados a influência de diferentes níveis de radiação solar e da presença e ausência de adubação nitrogenada. A necessidade deste conhecimento surgiu em função da inexistência de informações à respeito do cultivo consorciado e plantio adensado, o que pode proporcionar ao agricultor uma melhor utilização da área de cultivo. Além disso, a adubação nitrogenada é recomendada de forma geral para as espécies do gênero *Mentha* sem levar em consideração as necessidades nutricionais de cada genótipo.

A variedade “Lavander Mint” quando comparada às demais variedades testadas neste trabalho, apresentou maior exigência em adubação nitrogenada e radiação. Para esta variedade, o rendimento de óleo bem como a maior concentração dos constituintes majoritários linalol e acetato de linalila ocorreram com 100% de radiação e adubação nitrogenada. Porém, o desenvolvimento vegetativo desta variedade não tem relação direta com a adubação nitrogenada nos níveis de matéria orgânica presentes no solo utilizado, sendo limitado seu desenvolvimento apenas pelos níveis de radiação.

A variedade “Grapefruit Mint” obteve maior rendimento de óleo essencial em condição de radiação mais baixas quando utilizada a adubação nitrogenada. Neste caso, a alta radiação e adubação nitrogenada podem ter criado condições favoráveis ao desenvolvimento vegetativo em detrimento ao metabolismo secundário nestas condições

A variedade “Peppermint” comportou-se semelhantemente à variedade “Lavander Mint” em relação ao desenvolvimento vegetativo, tendo o acúmulo de massa seca menor com a limitação de radiação, no entanto, o número de ramos não foi afetado por esta condição. O rendimento de óleo essencial não foi afetado pela adubação nitrogenada, apenas pela limitação de radiação, sendo que o constituinte majoritário mentol esteve presente em grande quantidade nos diferentes níveis de radiação independente da suplementação de nitrogênio.

Os genótipos testados “Lavander Mint”, “Grapefruit Mint” e “Peppermint” adaptaram-se às condições de limitação de radiação, no que diz respeito aos níveis de clorofila. A maior disponibilidade de nitrogênio devido à adubação nitrogenada resultou em aumento da atividade da enzima nitrato redutase, sendo que o aumento da concentração de açúcares

nas folhas expostas aos mais altos níveis de radiação resulta em incremento de carbono que é alocado para fotossíntese nestas condições.

Este estudo ainda não é conclusivo no que diz respeito à densidade de plantio e adubação nitrogenada, já que foram realizados em condição de casa-de-vegetação testando apenas a ausência e presença de nitrogênio. Representa o início de estudos para se determinar as condições ideais de plantio nos diferentes genótipos de *Mentha*, em função do objetivo de produção, seja para extração de óleos essenciais ou para consumo in natura. Faz-se necessário a realização de novos estudos que testem à quantidade de adubação nitrogenada bem como a fonte de nitrogênio, para os diferentes genótipos de *Mentha.* Os diferentes genótipos de *Mentha* devem ser avaliados em ambiente externo, com relação à limitação de radiação, pois como observado, a intensidade luminosa é cerca de 50% inferior no interior da casa-de-vegetação. Estes estudos complementares são necessários para que se possa indicar ao agricultor o melhor material genético, assim como as condições adequadas de cultivo para cada situação.

ANEXOS

ANEXO 1 – Análise de variância de área foliar do experimento de desenvolvimento de *Mentha* x *piperita* e *Mentha aquatica*, rendimento e qualidade do óleo essencial sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	2225523.524	1112761.762	22.2659	0.0000*
4	Fator B	1	21934.885	21934.885	0.4389	
6	AB	2	171954.202	85977.101	1.7204	0.1934
8	Fator C	2	833713.858	416856.929	8.3411	0.0011*
10	AC	4	624921.519	156230.380	3.1261	0.0263**
12	BC	2	79551.356	39775.678	0.7959	
14	ABC	4	363838.941	90959.735	1.8201	0.1463
-15	Erro	36	1799140.771	49976.133		
	Total	53	6120579.056			

Coeficiente de Variação: 41.90%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade

Fator A: Radiação; Fator B: Nitrogênio; Fator C: Genótipo.

ANEXO 2 – Análise de variância de massa seca total do experimento de desenvolvimento de *Mentha* x *piperita* e *Mentha aquatica*, rendimento e qualidade do óleo essencial sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	937.884	468.942	97.7531	0.0000**
4	Fator B	1	11.414	11.414	2.3792	0.1317
6	AB	2	106.537	53.269	11.1041	0.0002**
8	Fator C	2	116.382	58.191	12.1302	0.0001**
10	AC	4	116.557	29.139	6.0742	0.0008**
12	BC	2	41.135	20.567	4.2874	0.0214*
14	ABC	4	76.966	19.241	4.0110	0.0086**
-15	Erro	36	172.699	4.797		
	Total	53	1579.574			

Coeficiente de Variação: 24.88%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade

ANEXO 3 – Análise de variância de número de ramos do experimento de desenvolvimento de *Mentha* x *piperita* e *Mentha aquatica*, rendimento e qualidade do óleo essencial sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	117.967	58.984	16.7846	0.0000**
4	Fator B	1	0.433	0.433	0.1231	
6	AB	2	12.756	6.378	1.8150	0.1774
8	Fator C	2	1656.553	828.277	235.6980	0.0000**
10	AC	4	18.614	4.654	1.3242	0.2796
12	BC	2	20.277	10.139	2.8851	0.0688
14	ABC	4	55.200	13.800	3.9270	0.0096**
-15	Erro	36	126.509	3.514		
	Total	53	2008.311			

Coeficiente de Variação: 17.87%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade

ANEXO 4 – Análise de variância de rendimento de óleo essencial do experimento de desenvolvimento de *Mentha* x *piperita* e *Mentha aquatica*, rendimento e qualidade do óleo essencial sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	5.360	2.680	71.6501	0.0000
4	Fator B	1	5.851	5.851	156.4200	0.0000**
6	AB	2	0.121	0.060	1.6131	0.2133
8	Fator C	2	47.063	23.532	629.0636	0.0000**
10	AC	4	22.763	5.691	152.1276	0.0000**
12	BC	2	2.094	1.047	3.224	0.0000**
14	ABC	4	12.897	3.224	86.1927	0.0000**
-15	Erro	36	1.347	0.037		
	Total	53	97.496			

Coeficiente de Variação: 8.15%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade

ANEXO 5 – Análise de variância de proteínas totais do experimento metabolismo de *Mentha* x *piperita* e *M. aquatica* sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	2517.140	1258.570	14.2717	0.0000**
4	Fator B	1	270.682	270.682	3.0694	0.0883
6	AB	2	2076.188	1038.094	11.7716	0.0001**
8	Fator C	2	4888.617	2444.309	27.7175	0.0000**
10	AC	4	1206.533	301.633	3.4204	0.0181*
12	BC	2	523.252	261.626	2.9667	0.0642
14	ABC	4	1399.417	349.854	3.9672	0.0091**
-15	Erro	36	3174.717	88.187		
	Total	53	16056.544			

Coeficiente de Variação: 7.14%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade

ANEXO 6 – Análise de variância da enzima nitrato redutase do experimento metabolismo de *Mentha* x *piperita* e *M. aquatica* sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	0.958	0.479	15.8431	0.0000**
4	Fator B	1	4.002	4.002	132.3837	0.0000**
6	AB	2	1.032	0.516	17.0761	0.0000**
8	Fator C	2	5.564	2.782	92.0272	0.0000**
10	AC	4	0.794	0.198	6.5638	0.0004**
12	BC	2	4.402	2.201	72.8173	0.0000**
14	ABC	4	1.289	0.322	10.6647	0.0000**
-15	Erro	36	1.088	0.030		
	Total	53	19.129			

Coeficiente de Variação: 12.73%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade

ANEXO 7 – Análise de variância de açúcares totais do experimento metabolismo de *Mentha* x *piperita* e *M. aquatica* sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	41575.685	20787.843	471.3454	0.0000**
4	Fator B	1	19244.762	19244.762	436.3574	0.0000**
6	AB	2	4985.416	2492.708	56.5199	0.0000**
8	Fator C	2	31424.541	15712.270	356.2614	0.0000**
10	AC	4	5296.462	1324.116	30.0231	0.0000**
12	BC	2	2748.827	1374.414	31.1636	0.0000**
14	ABC	4	7026.741	1756.685	39.8312	0.0000**
-15	Erro	36	1587.715	44.103		
	Total	53	113890.150			

Coeficiente de Variação: 7.45%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade

ANEXO 8 – Análise de variância de açúcares redutores do experimento metabolismo de *Mentha* x *piperita* e *M. aquatica* sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	134.105	67.053	108.6774	0.0000**
4	Fator B	1	23.154	23.154	37.5279	0.0000**
6	AB	2	5.525	2.762	4.4771	0.0183*
8	Fator C	2	94.618	47.309	76.6776	0.0000**
10	AC	4	5.770	1.443	2.3380	0.0738
12	BC	2	6.426	3.213	5.2075	0.0103*
14	ABC	4	49.058	12.265	19.8782	0.0000**
-15	Erro	36	22.212	0.617		
	Total	53	340.868			

Coeficiente de Variação: 9.63%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade

ANEXO 9 – Análise de variância de clorofila total do experimento metabolismo de *Mentha* x *piperita* e *M. aquatica* sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	3.229	1.615	9.7258	0.0004**
4	Fator B	1	0.014	0.014	0.0823	
6	AB	2	0.170	0.085	0.5124	
8	Fator C	2	4.596	2.298	13.8408	0.0000**
10	AC	4	0.789	0.197	1.1888	0.3323
12	BC	2	0.108	0.054	0.3255	
14	ABC	4	1.041	0.260	1.5672	0.2040
-15	Erro	36	5.977	0.166		
	Total	53	15.924			

Coeficiente de Variação: 17.36%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade

ANEXO 10 – Análise de variância de clorofila *a* do experimento metabolismo de *Mentha* x *piperita* e *M. aquatica* sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio.

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	1.425	0.713	4.6777	0.0156*
4	Fator B	1	0.015	0.015	0.0956	
6	AB	2	0.077	0.038	0.2512	
8	Fator C	2	1.575	0.787	5.1672	0.0106*
10	AC	4	0.411	0.103	0.6749	
12	BC	2	0.127	0.064	0.4183	
14	ABC	4	0.584	0.146	0.9577	
-15	Erro	36	5.485	0.152		
	Total	53	9.698			

Coeficiente de Variação: 26.55%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade

ANEXO 11 – Análise de variância de clorofila *b* do experimento metabolismo de *Mentha* x *piperita* e *M. aquatica* sob diferentes níveis de radiação e nitrogênio

	Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médio	F Observado	Prob
2	Fator A	2	0.363	0.182	6.7561	0.0032**
4	Fator B	1	0.000	0.000	0.0003	
6	AB	2	0.034	0.017	0.6243	
8	Fator C	2	0.793	0.397	14.7547	0.0000**
10	AC	4	0.092	0.023	0.8543	
12	BC	2	0.009	0.004	0.1653	
14	ABC	4	0.068	0.017	0.6360	
-15	Erro	36	0.968	0.027		
	Total	53	2.327			

Coeficiente de Variação: 18.67%

**Significativo a 1% de probabilidade; *significativo a 5% de probabilidade