



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

***Mentha piperita* CULTIVADA COM VARIAÇÃO DE CÁLCIO. TROCAS GASOSAS E  
ÓLEO ESSENCIAL**

**JULIANA LETICIA DE FAZIO**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências Biológicas  
(Botânica), AC: Fisiologia e Bioquímica  
Vegetal.

**BOTUCATU – SP  
-2011-**

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE BOTUCATU  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

*Mentha piperita* CULTIVADA COM VARIAÇÃO DE CÁLCIO. TROCAS GASOSAS E  
ÓLEO ESSENCIAL

JULIANA LETICIA DE FAZIO

PROF<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO  
ORIENTADORA

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências Biológicas  
(Botânica), AC: Fisiologia e Bioquímica  
Vegetal.

BOTUCATU – SP  
-2011-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

De Fazio, Juliana Leticia.

*Mentha piperita* cultivada com variação de cálcio. Trocas gasosas e óleo essencial / Juliana Leticia De Fazio. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Carmen Silvia Fernandes Boaro

Capes: 20303017

1. Menta (Planta). 2. Labiadas (Planta). 3. Plantas oleaginosas. 4. Cálcio.

Palavras-chave: Cálcio; Lamiaceae; Menta; Óleo essencial; Trocas gasosas.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Carlos e Neusa  
Aos meus irmãos Márcia, Eduardo e Andréa  
À minha amiga Lidiane Ritsue Nagoshi

Vocês sempre acreditaram em mim e agora fazem parte deste grande  
Objetivo materializado.

Agradeço o amor, carinho, apoio, dedicação e amizade de vocês em todos  
os momentos de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e pelas bênçãos em minha vida.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Silvia Fernandes Boaro, pela orientação, confiança, paciência e ajuda durante todo esse processo.

Aos professores João Domingos Rodrigues e Elizabeth Orika Ono, pela ajuda e apoio durante a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Ortiz Mayo Marques, pela ajuda e disponibilidade de usar seus laboratórios para a extração e análise da composição química do óleo essencial.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Martha Maria Mischan, pelo auxílio prestado nas análises estatísticas.

Ao auxiliar acadêmico do Departamento de Botânica, José Eduardo Costa, por todo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

Ao Senhor Auro Pires, pelo apoio e auxílio na condução prática do experimento.

Aos funcionários do Departamento de Botânica e da Seção de Pós-graduação, pela disponibilidade.

À Universidade Estadual Paulista e ao corpo docente do Departamento de Botânica, pela oportunidade de realizar este curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

À Amanda Cristina Esteves Amaro, pela ajuda nas avaliações de trocas gasosas.

À Lenita Lima Haber, Maria Aparecida, Mônica Tiho, Daniela e Talita pela ajuda na extração do óleo essencial e identificação dos componentes.

Aos amigos da Botânica: Valdir, Inara, Débora, Paula, Juliana Gimenez, Jaqueline, Jennifer, Daniel Baron, Jamile, Thaís, Bruno e a todos os demais, pela ajuda prestada e pelos momentos de alegria e descontração.

Ao Dr. Celso Charuri, pelo conhecimento e pelos Amigos que me deu.

Aos Amigos da Pró-Vida, pelo carinho e amizade, Sempre!!!

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram, ajudaram e me incentivaram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
INTRODUÇÃO.....	03
OBJETIVOS.....	05
REVISÃO DE LITERATURA.....	06
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

## LISTA DE TABELAS

- 1 Comparação entre médias de área foliar (AF), em  $\text{dm}^2$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....28
- 2 Comparação entre médias de matéria seca de lâminas foliares (MSLF), em g, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....31
- 3 Comparação entre médias de matéria seca total, em g, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....33
- 4 Comparação entre médias da assimilação de  $\text{CO}_2$ , em  $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....37
- 5 Comparação entre médias da transpiração, em  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....39
- 6 Comparação entre médias da concentração interna de  $\text{CO}_2$ , em  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....41
- 7 Comparação entre médias da condutância estomática, em  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....43
- 8 Médias e desvio padrão da eficiência de uso da água, em  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....45



9	Comparação entre médias do rendimento de óleo essencial, em g 100 g <sup>-1</sup> matéria seca, de <i>Mentha piperita</i> L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L <sup>-1</sup> , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....	49
10	Composição química do óleo essencial, em %, das plantas de <i>Mentha piperita</i> L. cultivadas em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L <sup>-1</sup> . Médias das colheitas realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 DAT.....	51
11	Comparação entre médias do teor de limoneno, em %, de <i>Mentha piperita</i> L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L <sup>-1</sup> , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....	53
12	Comparação entre médias do teor de pulegona, em %, de <i>Mentha piperita</i> L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L <sup>-1</sup> , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....	56
13	Comparação entre médias do teor de mentona, em %, de <i>Mentha piperita</i> L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L <sup>-1</sup> , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....	59
14	Comparação entre médias do teor de mentofurano + neo-mentol, em %, de <i>Mentha piperita</i> L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L <sup>-1</sup> , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....	62
15	Comparação entre médias do teor de mentol, em %, de <i>Mentha piperita</i> L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L <sup>-1</sup> , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....	65
16	Comparação entre médias do teor de acetato de mentila, em %, de <i>Mentha piperita</i> L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L <sup>-1</sup> , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....	68
17	Comparação entre médias do teor de 1,8-cineol, em %, de <i>Mentha piperita</i> L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L <sup>-1</sup> , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.....	70

## LISTA DE FIGURAS

- 1 Biossíntese dos constituintes do óleo essencial de *Mentha piperita*. As enzimas atuantes rota são: 1) limoneno sintase; 2) limoneno-3-hidroxilase; 3) trans-isopiperitenol desidrogenase; 4) isopiperitenona redutase; 5) cis-isopulegona isomerase; 6) pulegona redutase; 7) neo-mentol redutase; 8) mentol desidrogenase; 9) mentofurano sintase; 10) pulegona redutase; 11) neo-mentol redutase; 12) mentona redutase. O local de atuação das enzimas metabólicas está indicado entre parênteses.....16
- 2 Área foliar (AF), em  $\text{dm}^2$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática.....28
- 3 Matéria seca de lâminas foliares (MSLF), em g, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática.....31
- 4 Matéria seca total, em g, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática.....33
- 5 Assimilação de  $\text{CO}_2$ , em  $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....37
- 6 Transpiração, em  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....39
- 7 Concentração interna de  $\text{CO}_2$ , em  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....41
- 8 Condutância estomática, em  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....43

- 9 Eficiência de uso da água, em  $\mu\text{mol CO}_2$  ( $\text{mmol H}_2\text{O}$ )<sup>-1</sup>, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....45
- 10 Rendimento de óleo essencial, em  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  matéria seca, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....49
- 11 Teor de limoneno, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....53
- 12 Teor de pulegona, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....56
- 13 Teor de mentona, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....59
- 14 Teor de mentofurano + neo-mentol, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....62
- 15 Teor de mentol, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....65
- 16 Teor de acetato de mentila, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....68
- 17 Teor de 1,8-cineol, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.....70

DE FAZIO, J.L. *Mentha piperita* CULTIVADA COM VARIAÇÃO DE CÁLCIO. TROCAS GASOSAS E ÓLEO ESSENCIAL. 2011. 100 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

## RESUMO

Embora o cálcio tenha sido extensivamente estudado, o metabolismo deste macronutriente precisa ser melhor avaliado, uma vez que este elemento atua como mensageiro secundário nas vias de transdução de sinal em células vegetais e, devido às variações em sua concentração celular, atua por meio de proteínas moduladoras e suas moléculas-alvo, regulando vários processos celulares, incluindo desde o controle do transporte iônico até a expressão gênica. Neste contexto, existem dúvidas sobre o efeito do cálcio no desenvolvimento das plantas, nas trocas gasosas e na rota de produção dos óleos essenciais, especialmente no rendimento e composição química. Este estudo objetivou ampliar o conhecimento sobre aspectos do metabolismo do cálcio em *Mentha piperita*, uma espécie medicinal e aromática, quando cultivada em solução nutritiva. Avaliou-se a influência da variação dos níveis de cálcio nos índices fisiológicos, nas trocas gasosas e no rendimento e composição química do óleo essencial. Para tanto, as plantas foram cultivadas durante seu desenvolvimento em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon contendo  $160 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio e modificada para fornecimento de 200, 120, 80 e  $40 \text{ mg L}^{-1}$ . Aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo, foram avaliados os índices fisiológicos área foliar, matéria seca de lâminas foliares e total, além do rendimento e da composição química do óleo essencial. Para análise das variáveis das trocas gasosas foi utilizado sistema aberto portátil de fotossíntese (LI-6400, Li-Cor Inc., NE, USA), determinando-se, aos 65, 85 e 105 DAT, a assimilação de  $\text{CO}_2$ , transpiração, condutância estomática, concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  e eficiência do uso da água. Para as avaliações do óleo essencial foi realizada a extração por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger determinando-se o seu rendimento e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, a composição química. Os resultados obtidos permitiram concluir que os índices fisiológicos foram influenciados pela variação do nível de cálcio na solução de cultivo. O aumento de cálcio foi benéfico para desenvolvimento de área foliar e produção de matéria seca no final do desenvolvimento. Níveis de cálcio abaixo do utilizado na solução nutritiva completa, ou acima dele, influenciaram de modo discreto as trocas gasosas. A variação de cálcio na solução nutritiva influenciou de modo discreto o rendimento de óleo essencial, interferindo com a sua composição química, que também variou com o desenvolvimento da espécie. Óleo essencial de menta em quantidade adequada e com qualidade satisfatória pode ser obtido com o seu cultivo em solução contendo 40 e  $80 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ . As plantas cultivadas com  $40 \text{ mg L}^{-1}$  devem ser colhidas aos 65 DAT e aquelas com  $80 \text{ mg L}^{-1}$ , aos 65 ou 85 DAT.

Palavras-chave: Lamiaceae, menta, cálcio, trocas gasosas, óleo essencial.

## ***Mentha piperita* GROWN UNDER CALCIUM VARIATION. GAS EXCHANGES AND ESSENTIAL OIL.**

### **ABSTRACT**

Although calcium has been extensively studied, the metabolism of this macronutrient needs further evaluation since this element acts as a secondary messenger in signal transduction pathways in plant cells and, due to variations in its cell level, acts by means of modulator proteins and their target molecules, regulating several cell processes, from ion transportation control to gene expression. Thus, there are doubts about the effect of calcium on plant development, gas exchanges and essential oil production route, especially concerning yield and chemical composition. This study aimed to expand the knowledge of calcium metabolism aspects in *Mentha piperita*, an aromatic medicinal species, grown under nutrient solution. The influence of calcium level variation on physiological indexes, gas exchanges and essential oil yield and chemical composition was assessed. The plants were grown during their development in Hoagland & Arnon nutrient solution number 2 containing 160 mg L<sup>-1</sup> and modified to supply 200, 120, 80 and 40 mg L<sup>-1</sup>. At 45, 65, 85, 105 and 140 days after transplant (DAT) of seedlings to the culture solution, the assessed physiological indexes were leaf area, leaf blade and total dry matter, and essential oil yield and chemical composition. To analyze gas exchange variables, an open portable photosynthesis system (LI-6400, Li-Cor Inc., NE, USA) was used to determine, at 65, 85 and 105 DAT, CO<sub>2</sub> assimilation, transpiration, stomatal conductance, intercellular CO<sub>2</sub> concentration and water use efficiency. For the assessments related to essential oil, extraction by hydrodistillation in Clevenger-type device was carried out to determine its yield and chemical composition through gas chromatography coupled to mass spectrometry. The obtained results indicated that the physiological indexes were influenced by the calcium level variation in the culture solution. Calcium increase was beneficial for leaf area development and dry matter yield. When below the level used by the complete nutrient solution, or above it, calcium discreetly influenced gas exchanges. Calcium variation in the nutrient solution discreetly influenced essential oil yield, interfering with its chemical composition, which also varied with the species development. Mint essential oil at an adequate quantity and satisfactory quality can be obtained by means of culture in solution containing 40 and 80 mg L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>. Plants grown with 40 mg L<sup>-1</sup> should be harvested at 65 DAT and those grown with 80 mg L<sup>-1</sup>, at 65 or 85 DAT.

Keywords: Lamiaceae, mint, calcium, gas exchanges, essential oil.

## INTRODUÇÃO

Espécies da família Lamiaceae, ricas em óleos essenciais, tem sido amplamente investigadas sob o ponto de vista agrônomo e químico, não apenas com o intuito de maximizar o conteúdo de óleo essencial, mas também buscando avaliar a variação dos constituintes importantes desses óleos (Martins, 1998).

A *Mentha piperita* L., conhecida como hortelã, hortelã pimenta, menta e hortelã-apimentada, é uma erva aromática, de mais ou menos 30 cm de altura e semi-ereta, cujos ramos variam do verde escuro ao roxo purpúreo e as folhas são elíptico-acuminadas, denteadas e pubescentes (Lorenzi & Matos, 2002). A menta apresenta grande interesse econômico na obtenção de óleos essenciais, que tem ação antimicrobiana e espasmolítica. O chá abafado de suas folhas pode ser usado para facilitar a digestão e a eliminação de gases do aparelho digestivo (Lorenzi & Matos, 2002; Simões & Spitzer, 2007).

O cultivo de plantas na ausência de solo, em sistema completamente ou parcialmente controlado pode aumentar a produtividade vegetal e essa técnica pode permitir o desenvolvimento de todas as potencialidades das plantas (Mairapetyan, 1999).

Dentre os elementos essenciais presentes na solução de cultivo das espécies vegetais, o cálcio é um macronutriente cuja atividade depende de sua concentração e localização na célula (Trewavas, 1999). Ele atua como mensageiro secundário nas vias de transdução de sinal em células vegetais (Yang, 1996) e, devido às variações em sua concentração celular, atua por meio de proteínas moduladoras e suas moléculas-alvo, regulando vários processos celulares. Tais ações regulatórias variam desde o controle do transporte iônico até a expressão gênica, efeitos possíveis devido ao sistema homeostático, que regula os níveis celulares desse cátion (Hepler, 2005). O cálcio está, portanto, envolvido em várias respostas de plantas a estímulos ambientais (Epstein & Bloom, 2006) e hormonais (Taiz & Zeiger, 2009) em processos celulares e de desenvolvimento.

A nutrição mineral também influencia os processos de fotossíntese e respiração, devido aos elementos minerais serem componentes de enzimas e pigmentos, ou ainda, ativadores diretos do processo fotossintético (Larcher, 2006).

A síntese de óleo essencial é dependente de compostos sintetizados no metabolismo primário e, portanto, pode-se inferir que ela está relacionada à produtividade das plantas determinada pela quantidade de folhas, capacidade fotossintética e disponibilidade de nutrientes que determinam o ganho de biomassa. Milthorpe & Moorby (1974) referiram que a

ausência, ou mesmo a insuficiência, de um nutriente interfere na produção final, embora não se conheçam quais das variáveis fisiológicas intermediárias ficam comprometidas, interferindo na produtividade. Fageria et al. (1997) afirmam que o suprimento adequado de nutrientes minerais para as culturas é um dos fatores mais importantes para aumento de sua produtividade.

Os óleos essenciais apresentam sabor acre e picante podendo ser incolor ou ligeiramente amarelado. Já foram considerados “desperdício fisiológico” ou mesmo produto de desintoxicação (Mothes, 2003; Knobloch *et al.*, 2003). Hoje sabe-se que possuem a função de proteger a planta contra parasitas, competidores e agentes predadores, além de promover a atração de polinizadores e dispersores tendo, portanto, papel fundamental na ecologia química (Spring, 2000; Taiz & Zeiger, 2009).

Maia (1998) registrou variações químicas e físicas dos componentes do óleo essencial de menta, por se tratar de mistura de compostos de diversas naturezas que a planta acumula a taxas específicas. Essas taxas e, conseqüentemente os teores das substâncias presentes no óleo, são muito dependentes de fatores ambientais. A composição química dos óleos essenciais, portanto, é influenciada pelo ambiente no qual o vegetal se desenvolve e pelo tipo de cultivo realizado. A intensidade da produção de óleos essenciais é, de modo freqüente, correlacionada com a otimização da nutrição mineral (Mairapetyan, 1999; Simões & Spitzer, 2007). Dessa forma, plantas desenvolvidas sob diferentes condições podem conter óleos com características diferentes.

A expressão de um gene em uma planta medicinal pode alterar o perfil de metabólitos produzidos, de tal modo que o fluxo da via seja direcionado e que uma maior quantidade de um composto ativo útil seja acumulada. A manipulação genética do metabolismo de plantas pode ser realizada no sentido de produzir quantidades significativas de metabólitos de elevado valor farmacêutico (França et al., 2004).

Com base no acima exposto, o cultivo de *Mentha piperita* com variação do nível de cálcio, poderá auxiliar a elucidar a interpretação da atuação desse nutriente em etapas do metabolismo primário e secundário da espécie.

## **OBJETIVOS**

### **Gerais**

Estudar etapas do metabolismo de cálcio em *Mentha piperita*, por meio de aspectos fisiológicos e fitoquímicos.

### **Específicos**

1. Acompanhar o desenvolvimento das plantas de menta cultivadas com variação do nível de cálcio, por meio da avaliação da área foliar e da matéria seca de lâminas foliares e total.
2. Avaliar as trocas gasosas das plantas submetidas aos diferentes níveis de cálcio, em sistema aberto portátil de fotossíntese (LI-6400, Li-Cor Inc., NE, USA), durante seu desenvolvimento.
3. Avaliar o rendimento e a composição química do óleo essencial das plantas de menta submetidas a variação de cálcio em sua nutrição, por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.



## REVISÃO DE LITERATURA

A família Lamiaceae é representada no Brasil por 26 gêneros e cerca de 350 espécies (Souza & Lorenzi, 2005). Muitos desses gêneros foram trazidos pelos colonizadores e se aclimataram facilmente, como *Mentha* (menta), *Ocimum* (alfavaca), *Lavandula* (alfazema), *Origanum* (orégano), *Majorana* (manjerona), *Rosmarinus* (alecrim) e *Salvia* (sálvia) (Joly, 1993). Todos compartilham uma importante característica da família que é o odor intenso, conferido pela presença de óleos essenciais (Martins, 1998).

Em geral, as plantas dessa família são herbáceas ou arbustivas, com folhas opostas e inteiras (Souza & Lorenzi, 2005). As flores são pequenas ou grandes, reunidas em inflorescências, quase sempre axilares. Essas flores são diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, zigomorfas e bilabiadas. Apresentam dois ou quatro estames, ovário súpero, bicarpelar, bilocular, com dois óvulos por lóculo e falsamente tetralocular por invaginação dos carpelos. O fruto é do tipo baga e suas sementes raramente possuem endosperma, que quando aparece, é escasso (Souza & Lorenzi, 2005).

*Mentha piperita*, produzida pelo cruzamento de *Mentha spicata* e *Mentha aquatica* (Croteau et al., 2005), é originária da Europa e foi trazida no período da colonização ao Brasil, maior produtor do mundo desde a II Guerra Mundial até a década de 70, sendo nessa época, o Estado do Paraná responsável por 95% da produção. A queda na produção ocorreu após o esgotamento da fertilidade natural do solo onde se instalou a cultura (Paraná, 1976). A menta foi implantada no Estado de São Paulo no início do século XX e, atualmente, é encontrada em canteiros e jardins em todo o país (Lorenzi & Matos, 2002). Apesar de o Brasil ter sido responsável por 63,7 a 80,8% da produção mundial de óleo essencial de menta entre 1963 e 1975, atualmente 90% desses óleos destinados ao mercado brasileiro são importados (Rech et al., 2000; Cerimele & Ringuelet, 2008), condição indicativa da necessidade de estudo da espécie para garantir a oferta em rendimento e qualidade do óleo essencial de menta para o mercado nacional.

Alguns elementos minerais são imprescindíveis para o adequado desenvolvimento das plantas e devem estar presentes na solução de cultivo. Dentre eles pode-se citar o cálcio, um macronutriente que é absorvido no ápice radicular em sua forma iônica  $Ca^{2+}$  (Taiz & Zeiger, 2009). Ao entrar na planta, o cálcio move-se com a água, estando sua movimentação e teor nos tecidos sujeitos à taxa de transpiração (Collier & Huntington, 1983). Uma vez depositado, o cálcio não apresenta redistribuição para outras partes da planta, sendo acumulado

principalmente em tecidos que transpiram mais facilmente (Millaway & Wiersholm, 1979). Nos órgãos que apresentam dificuldade de transpiração, como as folhas novas e mais internas, o transporte do cálcio é dependente das condições ambientais que favoreçam o desenvolvimento da pressão radicular (Bradfield & Guttridge, 1984).

A passagem do cálcio pela membrana plasmática e das organelas ocorre por meio de canais, bombas e transportadores. Sua entrada no citoplasma ocorre por canais de influxo, que estão localizados na membrana plasmática e são a principal rota de entrada. A velocidade de influxo de cálcio pelos canais (Hille, 1992) e os sensores que determinam a abertura ou fechamento de seus portões (Taiz & Zeiger, 2009) permitem o controle preciso das propriedades cinéticas do influxo de cálcio no citoplasma. Esses canais podem ser classificados quanto a forma de operação e controle. Assim, existem os operados por diferença de voltagem, mecanicamente por estiramento celular e por mensageiros secundários. Nos canais operados por voltagem, a variação do potencial elétrico para o cálcio atua determinando a abertura ou fechamento (Bush, 1995). Os canais de influxo de cálcio operados mecanicamente são controlados pela tensão e estiramento celular, resultantes do processo de crescimento celular. Bush (1995) registrou que esses canais são estimulados, por exemplo, pela regulação celular do turgor, respostas tigmotrópicas, toxidez ao alumínio (provavelmente devido à competição pelas pontes iônicas de  $\text{Ca}^{2+}$  de grupos carboxílicos não esterificados das redes de pectinas da parede celular), temperatura, entre outros estímulos. O autor ressaltou ainda que estes canais podem responder também ao potássio.

O mensageiro secundário 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) ativa especificamente canais de cálcio. Segundo o modelo existente, o complexo hormônio-receptor ativa a fosfolipase C (PLC), enzima localizada na membrana, onde hidroliza o grupo de fosfolípídeos 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol ( $\text{PIP}_2$ ), liberando os compostos ativos, 1,4,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG), que apresenta glicerol, insolúvel em água. (Salisbury & Ross, 1992; Bethke et al., 1995; Taiz & Zeiger, 2009). O  $\text{IP}_3$  produzido é solúvel em água e difunde-se pelo citoplasma até encontrar sítios de ligação no tonoplasto. Estes sítios de ligação são sensores dos portões de canais de cálcio, que se abrem quando ligados ao  $\text{IP}_3$  (Salisbury & Ross, 1992; Bethke et al., 1995; Taiz & Zeiger, 2009).

A saída de cálcio do citoplasma ocorre por meio de bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, que pertencem a um grupo de bombas iônicas, as ATPases do tipo P, que formam um intermediário fosforilado durante o transporte (Bush, 1995).

Os estudos conduzidos na identificação de tipos de ATPases, localização celular e função encontram restrições devido à variação nos níveis de cálcio durante as avaliações, causada por vento, toque físico e estresses, de maneira geral (Bush, 1995).

No vacúolo, um dos locais onde é acumulado, o cálcio entra por transportadores secundários  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  tipo antiporte. Estes transportadores requerem ATPases de  $\text{H}^+$  na membrana para geração da força motriz prótonica e, portanto, estão restritos a membranas com bombas de  $\text{H}^+$ . São abundantes e muito ativos no tonoplasto (Taiz & Zeiger, 2009).

No tonoplasto e na membrana de várias organelas estão presentes os canais liberadores de cálcio, que participam da homeostase de cálcio, liberando esses íons para o citoplasma ou daí retirando-os quando ocorre aumento de sua concentração (Taiz & Zeiger, 2009).

Ao entrar na célula o cálcio pode ligar-se aos ácidos oxálico, fítico e fosfórico, ficando armazenado no vacúolo. Tal situação é desfavorável, uma vez que ligado covalentemente, o cálcio torna-se indisponível. O cálcio pode ainda ligar-se não covalentemente por ligação de valência coordenada, compartilhando elétrons, na parede celular, formando complexos com os ácidos poligalacturônicos. Por fim, o elemento pode, por meio de ligação eletrostática, na parede celular, formar complexos com os pectatos. O cálcio é assimilado pela formação de complexos de valência coordenada e ligações eletrostáticas com aminoácidos, fosfolipídeos e outras moléculas carregadas negativamente (Taiz & Zeiger, 2009).

Devem ser ainda registradas as funções do cálcio na célula, como, a de constituinte da lamela média e parede celular, manutenção da integridade das membranas, devido à estabilização que mantém entre as cabeças dos fosfolipídeos, cofator de enzimas que atuam na hidrólise de ATP e de fosfolipídeos, elemento essencial na formação do fuso mitótico e orientação da divisão celular, na nodulação em leguminosas, no crescimento do tubo polínico em direção ao ovário, por meio de quimiotropismo, no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, na produção da coifa das raízes, no mecanismo de produção de calosidade nas raízes e parte aérea, quando o tecido sofre injúria, como mensageiro secundário de respostas a sinais ambientais e hormonais e agente regulador de processos metabólicos, quando ligado à calmodulina (Taiz & Zeiger, 2009).

O cálcio, portanto, participa de vários processos fisiológicos nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas e, ao contrário dos outros nutrientes, sua maior proporção encontra-se localizada no apoplasto, estabilizando ligações entre as substâncias pécticas da parede celular ou como reserva no vacúolo (Taiz & Zeiger, 2009).

Para que o cálcio desempenhe adequadamente suas funções, é necessário que ocorra a homeostase dentro da célula. Esta homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  se refere à manutenção de um ambiente interno dentro de certos limites físicos e químicos (Epstein & Bloom, 2006).

Devido à síntese de energia metabólica, na forma de ATP, depender de grande quantidade de íons fosfato livres, a concentração citoplasmática de cálcio em células vivas é mantida baixa para evitar a formação de fosfato de cálcio, que é um sal insolúvel. Para tanto, um sistema de transportadores, bombas e canais atua na manutenção da concentração citoplasmática de cálcio (Bethke et al., 1995).

Dentre os reservatórios de cálcio que participam da homeostase desse elemento, podem ser citados a parede celular, ou seja, o apoplasto e alguns compartimentos dentro da célula. A parede celular contém concentrações milimolares de cálcio e dependendo do pH e propriedades de suas cargas, a concentração de cálcio no apoplasto de células em crescimento é mantida entre 100 e 200  $\mu\text{moles}$  (Cleland et al., 1990).

O vacúolo pode ser considerado um dos mais importantes reservatórios de cálcio para a homeostase desse elemento no simplasto, em parte devido ao seu grande volume. O nível de cálcio nesse compartimento pode variar de 100  $\mu\text{moles}$  a 100  $\text{mmoles}$ . Sua avaliação é difícil, uma vez que, no vacúolo são encontradas grandes quantidades de ácidos orgânicos, como os ácidos fítico, oxálico e fosfórico, que ao ligarem-se covalentemente ao cálcio, o tornam indisponível (Bethke et al., 1995).

Moller et al. (1981) verificaram que as mitocôndrias de plantas são capazes de retirar cálcio do citoplasma e nessas organelas o íon participa da regulação de suas funções, pelo controle da oxidação do NADH.

Muitos estudos referidos por Bethke et al. (1995) descreveram as mitocôndrias e o cloroplasto participando da homeostase do cálcio celular. No entanto, o mecanismo de entrada do cálcio na mitocôndria é controverso, uma vez que essa organela apresenta bombas de cálcio com baixa afinidade pelo elemento, ou seja, elevado  $K_m$ . Também existem registros de que o cálcio presente na matriz mitocondrial estaria fixado na forma insolúvel de sais de cálcio, o que sugere a não participação da mitocôndria na homeostase do cálcio (Bethke et al., 1995).

No cloroplasto, há indícios de que existam canais de cálcio e transportadores tipo uniporte. Também parece existir calmodulina, que pode ligar-se ao cálcio regulando algumas atividades bioquímicas da organela (Taiz & Zeiger, 2009).

Por fim, devem ser registrados os estudos referidos por Hepler (2005) que mostram que as plantas possuem um rico e multifacetado mecanismo de regulação do cálcio citoplasmático.

Um dos papéis mais importantes do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é o de mensageiro secundário em vias de transdução de sinal em células vegetais (Bush, 1995; Yang, 1996), estando, portanto, envolvido em várias respostas de plantas a estímulos ambientais (Epstein & Bloom, 2006) e hormonais (Taiz & Zeiger, 2009), em processos celulares e de desenvolvimento.

Dessa forma, um estímulo qualquer, gera, conseqüentemente, resposta da planta, envolvendo toda bioquímica, metabolismo e fisiologia, integrando o chamado sistema complexo de transdução de sinais (Bethke et al., 1995). Assim, entre o estímulo e a resposta celular ocorre uma série de eventos na célula iniciados com a percepção do estímulo pelos receptores membranares, que por meio de mudanças em sua conformação e/ou outros mecanismos, enviam o sinal para mensageiros secundários. Também, existem os receptores citoplasmáticos e nucleares, que fazem parte da percepção de moléculas que “carregam os estímulos”. De forma geral, os estímulos são levados por mensageiros secundários até o núcleo onde interagem e operam o sistema gênico, com duplicação do DNA, transcrição de RNAm e por fim, a síntese de uma proteína ou enzima no citoplasma (Taiz & Zeiger, 2009). Essa proteína formada pode ainda ligar-se a outros ativadores citoplasmáticos, como o cálcio, ativar muitas outras enzimas e assim produzir uma série de ações enzimáticas que fazem parte da resposta celular final (Taiz & Zeiger, 2009).

Os íons  $\text{Ca}^{2+}$ , ao mesmo tempo que são adequados para atuarem como sinalizadores ou mensageiros celulares, são inadequados para servirem como elementos efetadores no metabolismo (Bethke et al., 1995). O autor ainda registra que para o íon tornar-se um potente elemento efetador na célula, deve ligar-se a proteínas que, com esta ligação alterem sua conformação e possibilitem a modulação de processos de respostas bioquímicas e fisiológicas.

Entre as proteínas mais comuns ligantes ao cálcio, encontram-se a calmodulina e as proteínas quinases, dependentes de cálcio. A calmodulina é um polipeptídico com quatro sítios de ligação de cálcio. Um par desses sítios é ligado ao outro por formações helicoidais na molécula, o que gera sua forma de halteres. A calmodulina é uma proteína altamente conservada ao longo da evolução das espécies, sendo encontrada em todas as filogenias das linhas eucarióticas. Uma vez ligada ao cálcio, a calmodulina torna-se ativada e pode ligar-se a muitas outras proteínas e enzimas, ativando-as. Estas últimas, farão parte da seqüência de respostas celulares geradas por estímulos (Taiz & Zeiger, 2009).

Um outro grupo de proteínas ativado pela ligação com cálcio são as proteínas quinases dependentes de cálcio, constituídas de três domínios na molécula, um domínio quinase, um domínio semelhante à calmodulina e um domínio auto-inibitório. Quando quatro íons de cálcio ligam-se à proteína quinase, esta torna-se ativa, desacoplando o domínio auto-inibitório (Taiz & Zeiger, 2009).

O cálcio pode, ainda, ligar-se a elementos do citoesqueleto da célula vegetal, regulando-o, sendo conhecido como elemento importante no comportamento dos microtúbulos e microfilamentos de actina da célula (Hepler, 2005).

O cálcio e a calmodulina (CaM) participam da expressão gênica em plantas, atuando sobre os fatores de transcrição na regulação transcricional. A atuação sobre esses fatores de transcrição pode ocorrer por elevação da concentração de  $Ca^{2+}$  no núcleo ativando diretamente os fatores de transcrição e modulando sua atividade, ativando diretamente as sequências promotoras e regulando a expressão gênica, interagindo com os fatores de transcrição e modulando sua ligação com o DNA ou sua atividade transcricional, regulando indiretamente a transcrição associando-se a múltiplos componentes da maquinaria transcricional, como por exemplo, o complexo  $Ca^{2+}/CaM$  ativando uma proteína ligante a um fator de transcrição e este novo complexo interagindo com outros fatores de transcrição, regulando sua função e o complexo  $Ca^{2+}/CaM$  regulando a expressão gênica por modular a fosforilação dos fatores de transcrição, sendo tal regulação obtida pela ligação de uma proteína quinase e uma proteína fosfatase à CaM (Kim et al., 2009).

Níveis adequados de cálcio são importantes para controlar a toxicidade de íons específicos, como o alumínio e metais pesados (Rengel, 1992; Grattan & Grieses, 1993; Hawkins & Lewis, 1993). Sua presença é essencial para garantir o crescimento de raízes, em densidade e comprimento, importantes para a absorção de nutrientes.

A podridão estilar do tomateiro é provocada pela deficiência de cálcio. Em alguns casos, as folhas apresentam teores normais deste nutriente, enquanto o fruto mostra-se deficiente devido à pequena translocação e ao transporte unidirecional do cálcio no xilema (Lopes, 1998).

Sinais característicos da deficiência de cálcio incluem a necrose de regiões meristemáticas jovens, como os ápices radiculares ou folhas jovens, nas quais a divisão celular e a formação de paredes são mais rápidas. A necrose em plantas em lento crescimento pode ser precedida por clorose generalizada e curvamento das folhas para baixo. As folhas jovens apresentam-se deformadas. O sistema radicular de uma planta deficiente em cálcio

pode mostrar-se acastanhado, curto e altamente ramificado, com formação de células bi ou trinucleadas. Pode haver redução severa no crescimento, se as regiões meristemáticas da planta morrerem prematuramente (Taiz & Zeiger, 2009).

Ferrari et al. (2005) cultivando *Mentha crisper* L., em solução nutritiva nº 1 de Hoagland & Arnon (1950), com redução do nível de cálcio de 200 mg L<sup>-1</sup> para 60 mg L<sup>-1</sup>, até 46 dias após o transplante e 20 mg L<sup>-1</sup> a seguir (60/20) e de 200 para 30 mg L<sup>-1</sup>, observaram que os níveis mais baixos e iguais a 60/20 e 30 mg L<sup>-1</sup> promoveram redução na área foliar e matéria seca total, sendo que somente na concentração igual a 30 mg L<sup>-1</sup> ocorreu redução da matéria seca de folhas. Espécies não pertencentes à família Lamiaceae também foram estudadas com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes níveis de cálcio sobre a produção, entre elas *Stylosanthes guyanensis*, *Coffea arabica* e *Vigna mungo*. Rodrigues et al. (1993), ao cultivarem *Stylosanthes guyanensis* em solução nutritiva com variação do nível de cálcio de 200 para 133, 66 e 0 mg L<sup>-1</sup>, relataram drástica redução da área foliar conforme os níveis de cálcio foram reduzidos. Ramalho et al. (1995), observaram diminuição da área foliar em *Coffea arabica* submetida à deficiência de cálcio e Jain et al. (1997) cultivando *Vigna mungo* L. com diferentes níveis de cálcio relataram que a redução deste nutriente provocou diminuição da área foliar e da matéria seca nos diversos órgãos da planta.

*Mentha piperita* foi cultivada por De Fazio (2007), em solução nutritiva contendo 160, 80 e 16 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, respectivamente, nível completo de cálcio e sua redução para 50% e para 10% na solução de cultivo e pulverizadas com 0, 100, 200 e 400 mg L<sup>-1</sup> de ethephon. Ao avaliar as plantas submetidas aos diferentes níveis de cálcio e não pulverizadas com ethephon, observou-se que as plantas cultivadas com 80 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram desenvolvimento e rendimento de óleo essencial próximos aos das cultivadas com o nível completo de cálcio e igual a 160 mg L<sup>-1</sup>. Já as plantas cultivadas com o menor nível de cálcio e igual a 16 mg L<sup>-1</sup>, apresentaram drástica redução no desenvolvimento e no rendimento de óleo essencial, pois a parte aérea dessas plantas apresentou pequeno desenvolvimento. Nelas, as folhas mostraram sinais de deficiência de cálcio, tornando-se cloróticas, pequenas e com as bordas queimadas. As raízes ficaram curtas e acastanhadas e o ápice caulinar morreu, devido a baixa disponibilidade de cálcio na solução de cultivo, levando assim, ao surgimento de novas brotações que também morriam pouco depois.

Com base no estudo realizado por De Fazio (2007), verificou-se a necessidade de avaliar o cálcio, sem a interação com ethephon, e em níveis intermediários entre 160 e 40 mg L<sup>-1</sup>, uma vez que o nível de 30 mg L<sup>-1</sup> foi definido insuficiente para *M. crisper*, em estudo



prévio (De Fazio et al., 2005), visando definir a concentração mínima de cálcio, na solução de cultivo, que possibilite o desenvolvimento da menta, sem manifestação de deficiência nutricional e com quantidade e qualidade satisfatória de seu óleo essencial. Além disso, a avaliação de um nível acima do completo poderá auxiliar o estudo do metabolismo do cálcio.

A nutrição mineral também influencia os processos de fotossíntese e respiração, devido aos elementos minerais serem componentes de enzimas e pigmentos, ou ainda, ativadores diretos do processo fotossintético (Larcher, 2006). Segundo Ghanotakis & Yocum (1990) e Ramalho et al. (1995), o cálcio é essencial para a fotossíntese, pois atua no funcionamento do fotosistema II (PSII), promovendo a evolução do oxigênio, sendo também importante na obtenção de luz para a oxidação da água, uma vez que mantém a estabilidade e a agregação das moléculas de clorofila no complexo antena. Verificou-se que a deficiência de cálcio reduz a produção de biomassa em plantas, que pode ser resultante da diminuição na eficiência de carboxilação, na capacidade fotossintética e na produção de energia (Atkinson et al., 1989). Ramalho et al. (1995) avaliaram a influência do  $\text{Ca}^{2+}$  em *Coffea arabica*, e verificaram que a deficiência deste nutriente induziu a deterioração do aparelho fotossintético, tanto em nível estomático como mesofílico. Continuando os estudos na mesma espécie Ramalho et al. (1995) concluíram que a deficiência desse nutriente reduziu a expansão foliar, a área fotossinteticamente ativa, a produção de clorofila e, portanto, a captação de luz pelo complexo antena, interferindo com a eficiência fotoquímica do PSII. Quando as folhas recebem mais energia do que são capazes de utilizar na fotossíntese, cria-se um gradiente de prótons, que excede o requerimento para a síntese de ATP, aumenta a energia disponível e satura ou até inativa o PSII (Krause & Weis, 1991).

David (2007) cultivando *Mentha piperita* em solução nutritiva completa e modificada para fornecimento de 50% de N, P, K e Mg; 50% de N, P e K e 25% de Mg; e 65% de N, 50% de P, 25% de K e 100% de Mg, observou que as plantas cultivadas com 50% de N, P, K e Mg e com 50% de N, P e K e 25% de Mg, de maneira geral, mantiveram ou até elevaram a assimilação de  $\text{CO}_2$ , aumentaram a transpiração e a condutância estomática e, somente as plantas cultivadas com 50% de N, P e K e 25% de Mg, de maneira geral, elevaram a concentração interna de  $\text{CO}_2$ , quando comparadas às cultivadas com a solução nutritiva completa.

Os óleos essenciais, produtos do metabolismo secundário, são sintetizados a partir do metabolismo primário, utilizando o Acetil-CoA, intermediário do processo respiratório. Na rota do ácido mevalônico as moléculas de Acetil-CoA são ligadas entre si por meio de



enzimas específicas e dependentes de fósforo, formando um intermediário de cinco carbonos, o isopentenil difosfato (IPP) que é a unidade básica da formação dos terpenos. O IPP também pode ser formado a partir de intermediários da glicólise por meio de um conjunto de reações da rota do metileritritol fosfato (Taiz & Zeiger, 2009).

Esses compostos voláteis produzidos pelas plantas podem ser concentrados artificialmente, dando origem a um líquido hidrofóbico e quimicamente complexo, denominado óleo essencial. O termo “essencial” indica que o óleo contém odor e essência característicos do material vegetal de que foi extraído. A maior parte desses compostos pertence às classes dos terpenóides, derivados de ácidos graxos incluindo produtos da via das lipoxigenases, benzenóides e fenilpropanóides. A grande maioria destes compostos é emitida pela parte vegetativa e pelas flores das plantas (Knudsen et al., 1993).

Estima-se que as plantas superiores sejam responsáveis pela síntese de mais de 30.000 terpenóides quimicamente distintos, com porção significativa empregada na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e química. As principais classes de terpenos incluem os mono, sesqui e diterpenos, classificados como metabólitos secundários, e os tri- e tetraterpenos, considerados metabólitos primários. Esse grupo dos terpenóides compreende moléculas essenciais para o desenvolvimento e metabolismo vegetal, como os carotenóides, as giberelinas, o ácido abscísico e os brassinosteróides, os esteróis vegetais e as cadeias fitol das clorofilas, tocoferóis e quinonas. No entanto, a maioria dos terpenóides são metabólitos secundários, tais como os componentes voláteis dos óleos essenciais e as moléculas complexas que possivelmente funcionam como compostos de defesa, como paclitaxol, empregado no tratamento anti-câncer (Harborne, 1991).

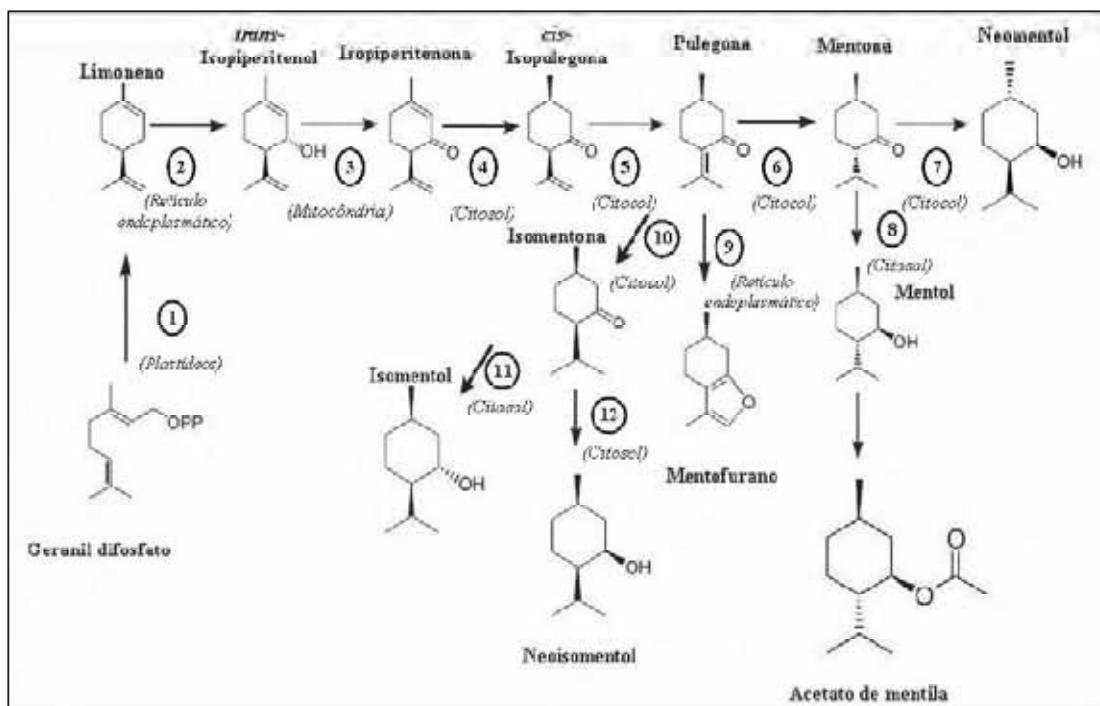
A função biológica dos compostos voláteis das plantas permanece controversa, embora se aceite que os compostos emitidos pelas flores atuem geralmente como guias e atrativos para polinizadores (Reinhard et al., 2004). Evidências recentes, obtidas de estudos genômicos e funcionais, sugerem a existência de reguladores principais das vias biossintéticas dos compostos envolvidos na atração de polinizadores (Verdonk et al., 2005; Hoballah et al., 2007). Entretanto, a associação de uma determinada substância química presente nas emissões florais a um polinizador específico permanece desconhecida. Muitos voláteis emitidos por flores possuem atividade biológica anti-microbiana e anti-herbivoria (DeMoraes et al., 2001; Hammer et al., 2003), sugerindo seu envolvimento na proteção das partes reprodutivas das plantas durante a floração.

Os voláteis emitidos pelas partes vegetativas das plantas também estão associados a funções protetoras contra estresses bióticos e abióticos (Dudareva et al., 2004). O isopreno, um dos compostos voláteis vegetais mais estudados, é emitido por folhas de plantas lenhosas (Sharkey and Yeh, 2001) e parece estar envolvido na proteção do aparelho fotossintético sob temperaturas elevadas, pela estabilização das membranas dos tilacóides (Sharkey et al., 2001) ou pela repressão de moléculas ativas de oxigênio (Loreto & Velikova, 2001). A emissão de compostos voláteis dos órgãos vegetativos em resposta ao dano por herbivoria é uma característica de inúmeras espécies vegetais, incluindo abóbora (*Cucumis sativus*; Mercke et al., 2004), *Lotus japonicus* (Arimura et al., 2004) e milho (*Zea mays*; Degen et al., 2004). Essas substâncias funcionam como defesas indiretas do vegetal, atraindo artrópodos que atacam e parasitam os herbívoros, minimizando os danos aos tecidos vegetais (Dicke & van Loon, 2000). Alguns voláteis induzidos por herbivoria também agem como defesas diretas repelindo (DeMoraes et al., 2001; Kessler & Baldwin, 2001) ou intoxicando os herbívoros (Vancanneyt et al., 2001) ou patógenos (Andersen et al., 1994). Atualmente, o papel dos voláteis emitidos por órgãos vegetativos na comunicação entre plantas tem sido discutido (Engelberth et al., 2004). A função fisiológica dos compostos voláteis vegetativos no metabolismo das plantas permanece desconhecida, entretanto suas características químicas sugerem que possam exercer diversas funções protetoras. O isopreno e vários mono- e sesquiterpenos têm elevada capacidade de associação com espécies reativas de oxigênio, sugerindo que possam atuar como anti-oxidantes celulares (Loreto et al., 2004).

Os monoterpenos presentes nos tricomas glandulares de menta (*M. piperita* L.) constituem um dos óleos essenciais de maior valor econômico, tendo sido intensivamente estudado e considerado como um sistema-modelo para a investigação do metabolismo de monoterpenos em plantas (Gershenzon et al., 2000; Dudareva et al., 2003). A biossíntese do mentol, principal componente do óleo essencial de menta é complexa e ocorre no ciclo do ácido mevalônico (Vickery & Vickery, 1981), envolvendo várias etapas e diferentes tipos de reações químicas (Croteau et al. 2005) (figura 1). Os metabólitos primários, isopentenil difosfato e dimetilalil difosfato, são inicialmente convertidos a geranyl difosfato, sendo que este precursor universal dos monoterpenos sofre ciclização originando o intermediário limoneno. A formação de limoneno é a primeira etapa comprometida da biossíntese de mentol, sendo esse hidroxilado a trans-isopiperitenol em uma reação mediada pelo citocromo P450. Em seguida, uma seqüência de cinco etapas leva à produção do mentol (Croteau et al., 2000).

O mentol é o componente mais abundante do óleo essencial de folhas adultas de menta, porém a qualidade total do óleo e, portanto, o seu valor comercial é determinado pelo balanço entre a quantidade de vários compostos do óleo essencial. Em geral, óleos superiores contêm maiores quantidades de mentol, quantidades intermediárias de mentona e baixos teores de pulegona e mentofurano. Sob diversas condições de estresses abióticos, incluindo luz, temperatura e umidade relativa, as plantas promovem acúmulo de pulegona e mentofurano (Brun et al., 1991; Voirin et al., 1990; Mahmoud & Croteau, 2003). Assim, os metabólitos e as reações intermediárias assumem grande importância, pois são os principais determinantes da produção final de mentol e de seus subprodutos (Berthea et al., 2001).

A determinação da via biossintética dos monoterpenos em *M. piperita* permitiu que os estudos avançassem para a investigação dos aspectos regulatórios do metabolismo destes produtos naturais, extremamente importantes para a produção de óleos essenciais devido às suas funções de proteção no metabolismo das plantas (Dudareva et al., 2003).



**Figura 1.** Biossíntese dos constituintes do óleo essencial de *Mentha piperita*. As enzimas atuantes rota são: 1) limoneno sintase; 2) limoneno-3-hidroxilase; 3) trans-isopiperitenol desidrogenase; 4) isopiperitenona redutase; 5) cis-isopulegona isomerase; 6) pulegona redutase; 7) neo-mentol redutase; 8) mentol desidrogenase; 9) mentofurano sintase; 10) pulegona redutase; 11) neo-mentol redutase; 12) mentona redutase. O local de atuação das enzimas metabólicas está indicado entre parênteses. Adaptado de Croteau et al. (2005) e Rios-Esteva et al. (2008), por Búfalo (2011).

A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (Wink, 1990), sendo cada um desses processos governados por genes e, portanto, influenciados por três fatores principais: hereditariedade, estágio de desenvolvimento e ambiente (Roberts et al., 1996). Ainda segundo Gottlieb et al. (1996) as rotas metabólicas estão sob o controle da constituição genética do organismo, sendo as rotas que originam os metabólitos secundários estimuladas durante seus estágios particulares de desenvolvimento, ou durante períodos de estresse, entre outros fatores ambientais que interferem na produção desses compostos.

Fatores ambientais e de desenvolvimento têm grande influência na regulação da produção e composição do óleo essencial de menta. O cultivo dessa planta na ausência de solo, em sistema completamente ou parcialmente controlado aumenta sua produtividade, permitindo assim como no solo o desenvolvimento de todas as potencialidades (Mairapetyan, 1999). Segundo Mairapetyan (1999) plantas aromáticas cultivadas em hidroponia apresentam maior produtividade em relação àquelas cultivadas de modo tradicional, acumulando de três a seis vezes mais óleo essencial por área, já que essa produtividade é dependente da nutrição mineral.

Objetivando avaliar a influência do cálcio no óleo essencial, Maia et al. (2001), cultivando *Mentha arvensis* L. em solução nutritiva contendo 100, 200 (controle) e 400 mg L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> verificaram que o aumento do cálcio elevou a produção de óleo e os teores de limoneno e mentona e reduziu o de mentol, enquanto sua redução para 100 mg L<sup>-1</sup> diminuiu a produção de óleo e os teores de limoneno e mentona e aumentou o de mentol. De Fazio (2007) avaliou plantas de *Mentha piperita* em solução nutritiva com redução do nível de cálcio em diferentes épocas do ciclo de desenvolvimento e observou que aos 106 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução, as plantas cultivadas com 80 e 16 mg L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> apresentaram diminuição do rendimento de óleo essencial em folha e caule, sendo o menor valor observado nas cultivadas com 16 mg L<sup>-1</sup>. Já aos 136 DAT, a redução do cálcio para 80 mg L<sup>-1</sup> não prejudicou o rendimento de óleo, o que ocorreu uma vez mais nas plantas cultivadas com 16 mg L<sup>-1</sup>, indicando ser esse nível insuficiente para o desenvolvimento da espécie e para a produção de seu óleo.

Vários estudos foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos da nutrição mineral sobre a produção e a composição do óleo essencial de espécies da família Lamiaceae, dentre elas *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*, *Mentha crispa* e *Mentha arvensis*. Mairapetyan (1999) estudou a otimização das relações N:P:K em

*Mentha piperita* L., em cultivo hidropônico e concluiu que a menta requer maior suprimento de fósforo para o máximo acúmulo de óleo essencial. Leal (2001) trabalhando com *Mentha piperita* L., em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon com diferentes níveis de nitrogênio, concluiu que níveis de nitrogênio iguais a 263 e 315 mg L<sup>-1</sup>, acima daquele recomendado na solução completa e igual a 210 mg L<sup>-1</sup> interferiram com o desenvolvimento das plantas, diminuindo a produção e a qualidade do óleo essencial, que apresentou menor teor de mentol. Valmorbidia et al. (2006) ao avaliarem a mesma espécie cultivada em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon, concluíram que a menta pode ser cultivada com redução de 50 a 75% do potássio recomendado na solução nutritiva, e iguais respectivamente a 117,0 e 58,5 mg L<sup>-1</sup>, apresentando rendimento e qualidade do óleo essencial satisfatórios. A diminuição de potássio aumentou o teor de mentol nas plantas e não interferiu com o conteúdo de óleo produzido. David et al. (2006) trabalhando com a *Mentha piperita* L. na mesma solução contendo 31,0 mg L<sup>-1</sup> de fósforo, observaram que a redução de 50% do elemento, ou seja, 15,5 mg L<sup>-1</sup> na solução não foi deficiente para as plantas, com resultados satisfatórios para o teor de mentol. No entanto, quando as plantas foram cultivadas com acréscimo de 50% de fósforo na solução e igual a 46,5 mg L<sup>-1</sup>, a produção de matéria seca e de óleo essencial tendeu a ser maior. No entanto, foram observados maiores teores de mentona. Os autores concluíram que a variação do nível de fósforo na solução nutritiva pode resultar em plantas com variação do rendimento e composição do óleo essencial. Santos et al. (2002) avaliaram a cultura de *Ocimum basilicum*, em solução nutritiva proposta por Furlani (1998) nas concentrações de 50%, 75%, 100% e 125%. Os resultados indicaram que a alfavaca deve ser cultivada na concentração padrão, igual a 100%. Bueno (2004) trabalhando com *Thymus vulgaris* L., em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon (1950) com diferentes níveis de fósforo, concluiu que o nível de fósforo igual a 46,5 mg L<sup>-1</sup> e acima daquele recomendado na solução completa, igual a 31 mg L<sup>-1</sup>, interferiu no desenvolvimento das plantas, aumentando o comprimento, a matéria fresca e seca de parte aérea, a matéria seca de raízes e a matéria seca total, o rendimento e o conteúdo do óleo essencial, com aumento do teor de carvacrol.

Na menta, a produção de óleo e seu teor de mentol aumentam com a maturidade das folhas, e conseqüentemente, das glândulas de óleo. Portanto, o rendimento e a qualidade do óleo essencial são influenciados pela época de colheita das plantas (Rabak, 1977; Topalov & Zheljzkov, 1991), sendo o máximo florescimento ou 50% dele sugeridos como as melhores épocas para rendimento. Rabak (1977) observou maior rendimento de óleo quando as plantas

de *Mentha piperita* atingiram o máximo florescimento. Topalov & Zheljzkov (1991) observaram os maiores rendimentos de *Mentha piperita* com 50% de florescimento. No entanto, o conteúdo de mentol aumentou nas colheitas mais tardias, e assim, naquela após o florescimento, apesar da diminuição do rendimento de óleo, houve aumento de sua qualidade.

Portanto, os fatores ambientais e de desenvolvimento podem afetar o fluxo de metabólitos ao longo da via, demonstrando que a regulação de determinadas etapas da via biossintética dos monoterpenos é desconhecida e responsiva a diversos estímulos ambientais e de desenvolvimento (Croteau et al., 2000).

Estudos com plantas intactas demonstraram que a produção de monoterpenos é restrita às glândulas em desenvolvimento, nas folhas jovens (Turner et al., 2000) e que as perdas por reciclagem metabólica e evaporação dos voláteis não são determinantes para a produção e composição do óleo essencial (Gershenzon et al., 2000). Estudos *in vitro* da atividade dos nove passos enzimáticos envolvidos na biossíntese do mentol, associados a estudos da taxa de produção *in vivo* sugerem que a produção de monoterpenos é controlada pela regulação coordenada da atividade de todas as enzimas relevantes, com exceção da mentona redutase, que é ativa apenas nas fases tardias do desenvolvimento (McConkey et al., 2000). No presente momento, não existem evidências de que as enzimas envolvidas na biossíntese de mentol em menta sejam reguladas por modulação alostérica ou por modificações covalentes (Mahmoud & Croteau, 2003), sugerindo que tanto a produção quanto a composição química do óleo essencial sejam reflexos diretos das conseqüências cinéticas dos níveis das enzimas biossintéticas presentes em determinada situação fisiológica e de desenvolvimento. Portanto, o principal determinante para a produção e qualidade do óleo essencial é a produção transcricional e traducional das enzimas que catalisam a via e sua posterior reciclagem metabólica.

Estudos com mutantes perda-de-função para a mentofurano sintase (*mfs*), obtidos por silenciamento gênico via mRNA antisenso, demonstraram que embora a atividade reduzida da mentofurano sintase levasse a redução no teor de mentofurano, o teor de pulegona permaneceu inalterado no óleo essencial das plantas transgênicas (Mahmoud & Croteau, 2001). Teoricamente, esperar-se-ia que a redução na atividade da *mfs* promovesse um aumento no teor de pulegona devido à redução na conversão dessa cetona intermediária à mentofurano, associada à taxa presumivelmente fixa de redução da pulegona a mentona via pulegona redutase. Entretanto, observou-se redução do teor de ambos, mentofurano e pulegona, no óleo obtido das plantas transgênicas *mfs*, demonstrando a existência de um nível

mais complexo de regulação além da simples redistribuição cinética dos intermediários da via (Mahmoud & Croteau, 2001). Em um estudo complementar, Mahmoud & Croteau (2003) investigaram a composição do óleo essencial de mutantes gerados por superexpressão e co-supressão da *mfs* em plantas transgênicas. Os resultados indicam que o mentofurano está envolvido na regulação transcricional da pulegona redutase, a enzima do ponto de ramificação da via. Igualmente, por este mecanismo de regulação transcricional, o mentofurano diminui a atividade da redutase, conseqüentemente, levando ao acúmulo de pulegona. Estes resultados demonstram a existência de uma função inesperada de uma molécula freqüentemente considerada como um metabólito final que funciona na regulação, ao nível transcricional, de uma etapa final numa via biossintética complexa (Mahmoud & Croteau, 2003).

O isolamento e caracterização dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela biossíntese de monoterpenos em menta demonstraram a importância da regulação da expressão gênica no controle do metabolismo secundário (McConckley et al., 2000; Mahmoud & Croteau, 2001). O entendimento dos mecanismos empregados pelas plantas na biossíntese e na regulação da produção dos compostos voláteis permitirá o emprego de condições ambientais e químicas de cultivo que favoreçam a formação de maiores quantidades de óleo essencial de melhor qualidade.

O uso de técnicas moleculares e bioquímicas permitiu grande avanço nas pesquisas sobre os óleos essenciais de plantas e grande número de genes que codificam as enzimas envolvidas na biossíntese dos compostos que fazem parte dos óleos essenciais foram isolados e caracterizados.



## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período compreendido entre novembro de 2010 e março de 2011, no Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu/SP, em casa de vegetação tipo “Paddy Fan” com controle de temperatura, que foi mantida em  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As coordenadas geográficas desta localidade são  $48^{\circ}24'35''$  de longitude oeste e  $22^{\circ}49'10''$  de latitude sul, a 800 m acima do nível do mar.

### Material vegetal

Estacas de *Mentha piperita* L. foram obtidas de plantas matrizes cultivadas no Departamento de Botânica, a partir de mudas provenientes do canteiro de plantas medicinais e aromáticas do CPQBA, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas, Unicamp - Campinas/SP.

Ramos aéreos das plantas foram utilizados para a confecção de estacas apicais, com aproximadamente 10 cm de comprimento e três pares de folhas. Estas estacas foram desinfetadas em solução de hipoclorito a 2%, lavadas em água corrente e colocadas em bandejas contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>, onde permaneceram, em câmara de nebulização intermitente, até o enraizamento.

Após 30 dias, as estacas enraizadas foram retiradas do substrato, lavadas em água corrente e transferidas para vasos plásticos com capacidade de seis litros contendo a solução de cultivo. Os vasos foram pintados externamente com purpurina prateada para evitar o crescimento de algas.

### Tratamentos

As plantas foram cultivadas em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon (1950) contendo  $160 \text{ mg L}^{-1}$  e modificada para fornecimento de níveis de cálcio iguais a 200, 120, 80 e  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , onde permaneceram até as datas de colheita, realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) para os vasos. Dessa forma, as plantas foram cultivadas em cinco tratamentos designados T1 e composto por  $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ , T2 (testemunha), constituído por  $160 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ , T3, com  $120 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ , T4, com  $80 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$  e T5, constituído por  $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ .



Todas as soluções foram continuamente arejadas, utilizando-se um soprador rotatório e renovadas a cada duas semanas (Dantas et al., 1979). Sempre que necessário, o volume de solução dos vasos foi completado com água. O controle diário do pH da solução nutritiva foi feito com a utilização de um medidor de pH e ajustado para 5,5 - 6,0, faixa ideal para o desenvolvimento da menta, de acordo com as preconizações de Huterwall (1986). A condutividade elétrica da solução foi controlada, com a utilização de um condutivímetro e mantida entre 1,5 - 2,5 mS cm<sup>-1</sup>, de acordo com as especificações de Carmello (1992).

### **Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial 5x5, ou seja, cinco níveis de cálcio, avaliados em cinco épocas de colheita, de modo a cobrir parte do ciclo do vegetal. Em cada época de colheita foram avaliadas a área foliar, a matéria seca das lâminas foliares e total, as trocas gasosas, o rendimento e a composição química do óleo essencial. A extração do óleo essencial, para avaliação do seu rendimento, bem como a análise de sua composição química foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agrônomo de Campinas, em Campinas/SP, sob supervisão da Pesquisadora responsável pelo Laboratório Dr<sup>a</sup> Márcia Ortiz Mayo Marques e da Dr<sup>a</sup> Lenita Lima Haber.

### **Variáveis avaliadas**

Em cada época de colheita, as plantas submetidas aos diferentes tratamentos foram separadas em lâminas foliares, caules mais pecíolos e raízes mais estolões. As lâminas foliares foram imediatamente submetidas à determinação da área foliar, em dm<sup>2</sup>, com auxílio do integralizador de área foliar LI 3100 da LI-COR. A seguir, todo o material foi acondicionado em sacos de papel, etiquetado e colocado para secar em estufa de circulação forçada de ar, a 40°C, até obtenção de matéria seca constante. Após a secagem, o material foi pesado em balança analítica Ohaus tipo Analytical Standard com sensibilidade de até 0,1 mg para determinação da matéria seca e, após a pesagem, as lâminas foliares foram utilizadas para a extração do óleo essencial.

## ***Determinações fisiológicas***

### ***1. Área foliar***

Definida como a somatória da área de todas as lâminas foliares da planta, em decímetros quadrados.

### ***2. Matéria seca de lâminas foliares***

A matéria seca das lâminas foliares foi definida como o peso de todas as folhas da planta, expresso em gramas.

### ***3. Matéria seca total***

A matéria seca total correspondeu à soma das matérias secas de folhas, caules e raízes, em cada época de colheita, expressa em gramas.

## ***Trocas gasosas***

As avaliações de trocas gasosas, seguindo-se a mesma metodologia utilizada por Búfalo (2011) e Amaro (2011) foram realizadas utilizando-se equipamento com sistema aberto portátil de fotossíntese com analisador de CO<sub>2</sub> e vapor d'água por radiação infravermelha (“*Infra Red Gas Analyser – IRGA*”, modelo LI-6400, Li-Cor Inc., NE, USA).

Tais medidas foram estimadas a partir da diferença entre a concentração de CO<sub>2</sub> e vapor d'água do ar da referência (valor presente na câmara sem a folha) e da amostra (valor com a folha presente na câmara), obtendo-se as concentrações de vapor d'água e CO<sub>2</sub> que foram liberados (transpiração – vapor d'água) e assimilados (assimilação de CO<sub>2</sub>) pelos estômatos das folhas.

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas entre 09:00 e 11:00 horas da manhã, aos 65, 85 e 105 DAT, selecionando-se uma planta de cada repetição, de cada tratamento, nas quais foram escolhidas e padronizadas as 2<sup>a</sup> ou 3<sup>a</sup> folhas, com o limbo completamente expandido e fotossinteticamente ativas.

As características de trocas gasosas avaliadas foram: taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), taxa de transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática (gs,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e concentração interna de CO<sub>2</sub> na folha (Ci,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ). Essas

variáveis foram calculadas pelo programa de análise de dados do equipamento medidor de fotossíntese, que utiliza a equação geral de trocas gasosas de Caemmerer & Farquhar (1981).

A eficiência de uso da água (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ ) foi determinada por meio da relação entre assimilação de  $\text{CO}_2$  e taxa de transpiração (A/E) e calculada de acordo com Berry & Downton (1983).

### ***Rendimento e composição química do óleo essencial***

A extração do óleo essencial foi feita por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger. Segundo Simões & Spitzer (2007), os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água.

As folhas de *Mentha piperita* L. foram secas em estufa de aeração forçada a temperatura constante de 40°C até obtenção de matéria seca constante. Tal secagem visou impedir a deterioração do material por meio da redução do teor de água uma vez que, a desidratação atua diminuindo a atividade das enzimas, o que permite a conservação da planta por mais tempo (Silva & Casali, 2000). Além disso, a eliminação de água aumenta o percentual de princípios ativos em relação à massa. A seguir, 100 gramas de folhas foram colocadas em balão com capacidade de 2000 mL, adicionando-se água até cobrir a amostra, que em seguida foi aquecida. Após a destilação, o rendimento do óleo foi medido em  $\text{g } 100\text{g}^{-1}$  de matéria seca.

A composição química dos óleos essenciais extraídos foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), em equipamento Shimadzu modelo QP-5000 dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e gás de arraste Hélio (fluxo 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ ). Para a identificação das substâncias, os seus espectros de massa foram comparados aos do banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 Libr.) e literatura (McLafferty et al., 1989), determinando-se o índice de retenção de Kovats, comparando os mesmos com os citados na literatura (Adams, 1995).

### **Análise estatística**

A área foliar, matéria seca de lâminas foliares e total da planta foram submetidas à análise de variância do fatorial e as médias comparadas pelo teste Tukey, segundo especificações de Zar (1999), utilizando-se o nível de 5% de significância. Avaliou-se o fator

colheita, ou seja, idade das plantas, por meio de análise de regressão e os tratamentos tiveram suas curvas ajustadas segundo a equação exponencial quadrática, que representa o crescimento da *M. piperita*, conforme demonstram estudos prévios realizados com a espécie (David et al., 2007; De Fazio et al., 2007; Valmorbida & Boaro, 2007; Valmorbida et al., 2007).

As variáveis assimilação de CO<sub>2</sub>, transpiração, condutância estomática e concentração interna de CO<sub>2</sub> e o rendimento e composição química do óleo essencial foram submetidas a análise de variância do fatorial e ao teste Tukey, utilizando-se o nível de 5% de significância.

A homogeneidade das variâncias foi testada usando-se o teste de Levene (Zar, 1999).

Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software SAS, Versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Para a eficiência de uso da água utilizou-se o desvio padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinações fisiológicas

#### Área foliar

A variação da área foliar (AF) de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 2.

A AF apresentou-se mais elevada, no final do desenvolvimento, quando as plantas foram cultivadas com 160 e 200 mg L<sup>-1</sup> de cálcio; intermediária, quando o cultivo foi realizado com 80 e 120 mg L<sup>-1</sup>, e menor, quando as plantas foram cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio.

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 1, revela que houve efeito da variação do nível de cálcio na AF em todas as épocas de colheita. Aos 45, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo, as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> apresentaram, de maneira geral, menor AF, enquanto aos 65 DAT, as cultivadas com 40 e 160 mg L<sup>-1</sup> apresentaram menor AF.

Tomando-se como base as plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que, de maneira geral, a redução do cálcio para 40 mg L<sup>-1</sup> reduziu a AF. Deve-se destacar que, até os 85 DAT, os níveis de cálcio iguais a 80 e 120 mg L<sup>-1</sup> promoveram adequada produção de AF e que, a partir dos 105 DAT, as plantas necessitaram de maior quantidade de cálcio para manter maior AF.

A determinação da área foliar é importante, pois as folhas são responsáveis pela captação de energia solar e produção de matéria orgânica por meio da fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2009) e fatores que interferem com seu desenvolvimento podem influenciar o processo fotossintético e o crescimento do vegetal.

Os dados existentes na literatura sobre a ação do cálcio na área foliar destacam a importância do mineral na obtenção de plantas com maior área foliar, e, portanto, com condições de elevada atividade fotossintética e adequada produção de matéria foliar. Assim, na omissão de cálcio, a sintomatologia de deformação, diminuição de número e clorose de folhas, redução de seu tamanho e necrose do limbo (Malavolta et al.,1997), sugere, na instalação da carência de cálcio, redução da área foliar.

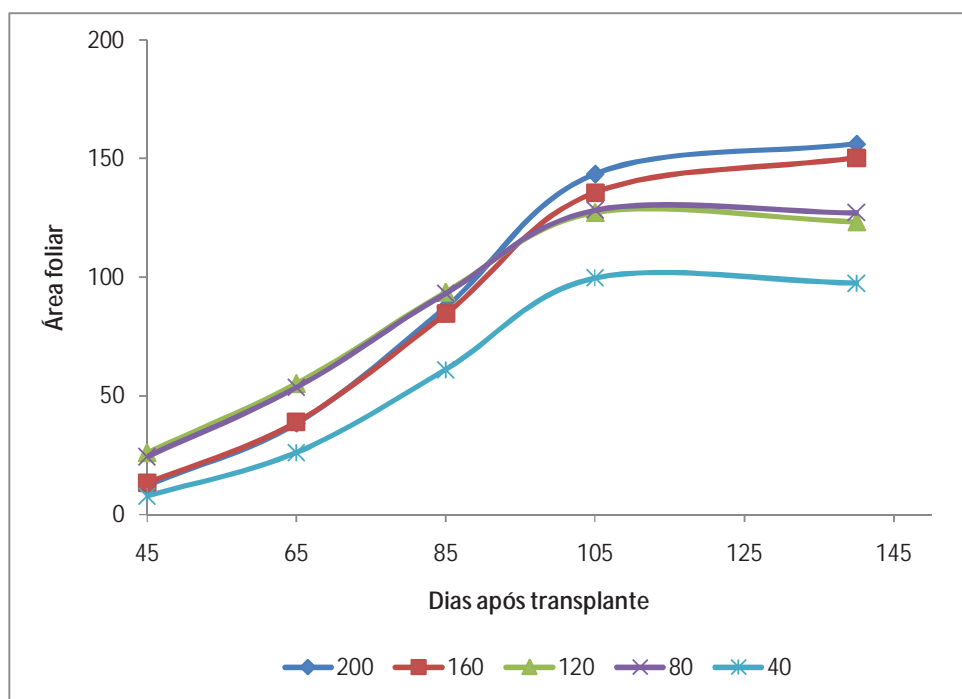
A redução da AF observada nas plantas cultivadas com o menor nível de cálcio concorda com os resultados obtidos por Ferrari et al. (2005) que, cultivando *Mentha crispa* em solução nutritiva nº 1 de Hoagland & Arnon (1950), com redução do nível de cálcio de 200 mg L<sup>-1</sup> para 60 mg L<sup>-1</sup>, até 46 dias após o transplante e 20 mg L<sup>-1</sup> a seguir (60/20) e para 30 mg L<sup>-1</sup>, observaram que os níveis mais baixos e iguais a 60/20 e 30 mg L<sup>-1</sup> promoveram redução na AF. De Fazio (2007) ao cultivar *Mentha piperita* em solução nutritiva com redução do nível de cálcio observou que as plantas cultivadas com 16 mg L<sup>-1</sup> apresentaram redução da AF, sendo estas folhas menores, cloróticas, com bordas queimadas e em menor número. No presente estudo, a redução do nível de cálcio para 40 mg L<sup>-1</sup>, de maneira geral, diminuiu a AF (figura 2), mas as folhas não manifestaram sinais de deficiência.

Espécies não pertencentes à família Lamiaceae também foram estudadas com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes níveis de cálcio sobre a produção, entre elas *Stylosanthes guyanensis*, *Coffea arabica* e *Vigna mungo*. Rodrigues et al. (1993), ao cultivarem *Stylosanthes guyanensis* em solução nutritiva com variação do nível de cálcio de 200 para 133, 66 e 0 mg L<sup>-1</sup>, relataram drástica redução da AF conforme os níveis de cálcio foram reduzidos. Ramalho et al. (1995), observaram diminuição da AF em *Coffea arabica* submetida à deficiência de cálcio e Jain et al. (1997) cultivando *Vigna mungo* com diferentes níveis de cálcio relataram que a redução deste nutriente provocou diminuição da AF. Deve-se, no entanto, ressaltar que espécies diferentes exigem quantidades diferentes de um mesmo nutriente para seu desenvolvimento. (Malavolta et al., 1997).

**Tabela 1.** Comparação entre médias de área foliar (AF), em dm<sup>2</sup>, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	11,37 bc	42,42 b	91,71 b	126,70 a	161,98 a	86,83
160	13,57 b	35,65 c	96,73 b	125,71 a	151,88 b	84,71
120	26,22 a	54,18 a	94,92 b	127,15 a	127,19 c	85,93
80	23,85 a	53,49 a	103,07 a	115,69 b	130,20 c	85,26
40	6,96 c	30,20 c	66,85 c	81,28 c	103,23 d	57,72
<b>médias colheitas</b>	16,39	43,20	90,66	115,31	134,90	

Letras minúsculas comparam médias dos níveis de cálcio em cada época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 2.** Área foliar (AF), em dm<sup>2</sup>, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática.

### Matéria seca de lâminas foliares

A variação da matéria seca de lâminas foliares (MSLF) de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 3.

A MSLF no final do desenvolvimento da menta, manteve-se, mais elevada, nas plantas cultivadas com 120, 160 e 200 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, intermediária, nas cultivadas com 80 mg L<sup>-1</sup>, e menor nas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup>. Deve ser registrado que o comportamento da MSLF foi, de maneira geral, semelhante ao da AF (figura 2).

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 2, revela que houve diferença de MSLF em todas as épocas de colheita. Aos 45 DAT, a MSLF foi maior nas plantas cultivadas com 80 e 120 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, quando comparada com a das plantas cultivadas com os demais níveis que, por sua vez, não diferiram entre si. Aos 65, 85, 105 e 140 DAT, as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram menor MSLF.

Tomando-se como referência a MSLF das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que houve efeito da variação do nível de cálcio, em especial quando as plantas foram cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> que, de maneira geral, apresentaram menor MSLF durante todo o ciclo. Deve-se destacar que, até os 85 DAT, o nível de cálcio igual a 80 mg L<sup>-1</sup> promoveu adequada produção de MSLF e que, a partir dos 105 DAT, as plantas necessitaram de maior quantidade de cálcio para manter maior MSLF.

Os resultados revelam ainda (figura 3) diferença de translocação de matéria orgânica nas plantas cultivadas com os diferentes níveis de cálcio. A tendência de aumento na MSLF nas plantas cultivadas com 120 e 160 mg L<sup>-1</sup> reflete menor exportação de matéria orgânica das folhas, para outras partes da planta. Já nas plantas cultivadas com os demais níveis observa-se maior translocação da matéria orgânica das folhas para os demais órgãos. Esta reposta pode interferir com a produtividade da espécie submetida à variação de cálcio.

Os resultados relatados por Jain et al. (1997), Ferrari et al. (2005) e De Fazio (2007) concordam com os obtidos no presente estudo no que se refere à diminuição da MSLF quando o nível de cálcio na solução de cultivo foi reduzido. Jain et al. (1997) cultivando *Vigna mungo* L. com diferentes níveis de cálcio relataram que a redução deste nutriente provocou diminuição da matéria seca nos diversos órgãos da planta. Ferrari et al. (2005) cultivando *Mentha crispa* L., em solução nutritiva nº 1 de Hoagland & Arnon (1950), com redução do nível de cálcio de 200 mg L<sup>-1</sup> para 60 mg L<sup>-1</sup>, até 46 dias após o transplante e 20 mg L<sup>-1</sup> a

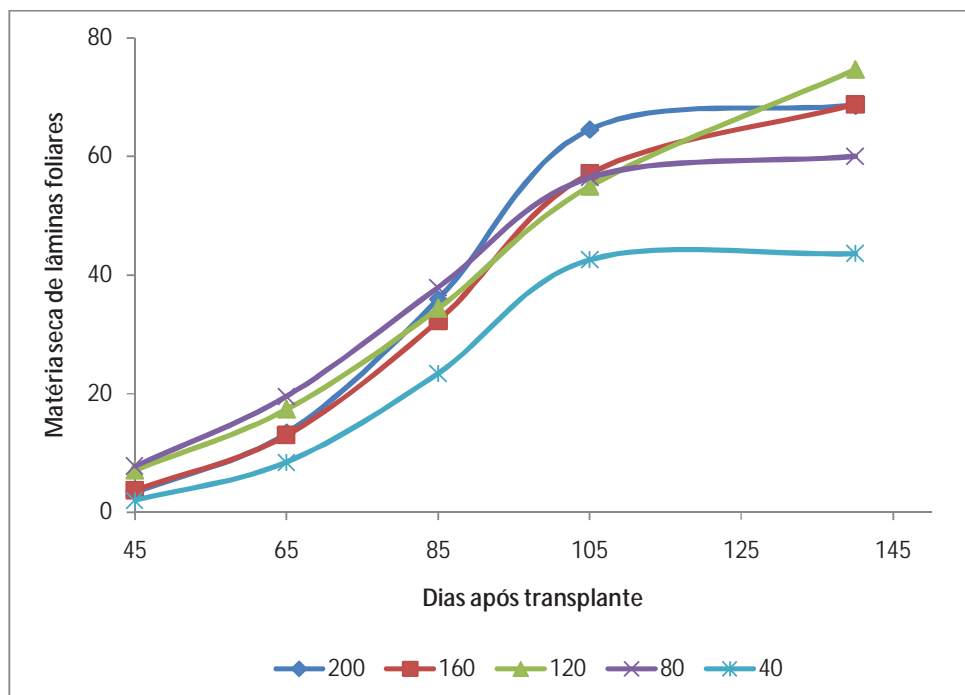


seguir (60/20) e para  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , observaram que o nível mais baixo e igual a  $30 \text{ mg L}^{-1}$  promoveu redução da MSLF. De Fazio (2007) ao cultivar *Mentha piperita* com redução do nível de cálcio observou que as plantas cultivadas com  $16 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$  apresentaram a menor MSLF e sinais de deficiência do nutriente.

**Tabela 2.** Comparação entre médias de matéria seca de lâminas foliares (MSLF), em g, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	3,11 b	15,21 bc	37,15 a	56,93 a	71,31 b	36,74
160	3,66 b	13,19 c	35,64 a	51,05 bc	70,65 b	34,84
120	7,05 a	17,32 b	35,32 a	53,55 b	75,11 a	37,67
80	7,05 a	23,84 a	36,66 a	50,81 c	62,41 c	36,15
40	1,79 b	10,27 d	22,73 b	38,12 d	45,42 d	23,66
<b>médias colheitas</b>	4,53	15,96	33,50	50,09	64,98	

Letras minúsculas comparam médias dos níveis de cálcio em cada época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 3.** Matéria seca de lâminas foliares (MSLF), em g, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática.

### **Matéria seca total**

A variação da matéria seca total (MST) de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 4.

A MST no final do desenvolvimento da menta, manteve-se, mais elevada, nas plantas cultivadas com 160 e 200 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, intermediária, nas cultivadas com 80 e 120 mg L<sup>-1</sup>, e menor nas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup>. Deve ser registrado que o comportamento da MST foi, de maneira geral, semelhante ao da AF (figura 2) e da MSLF (figura 3).

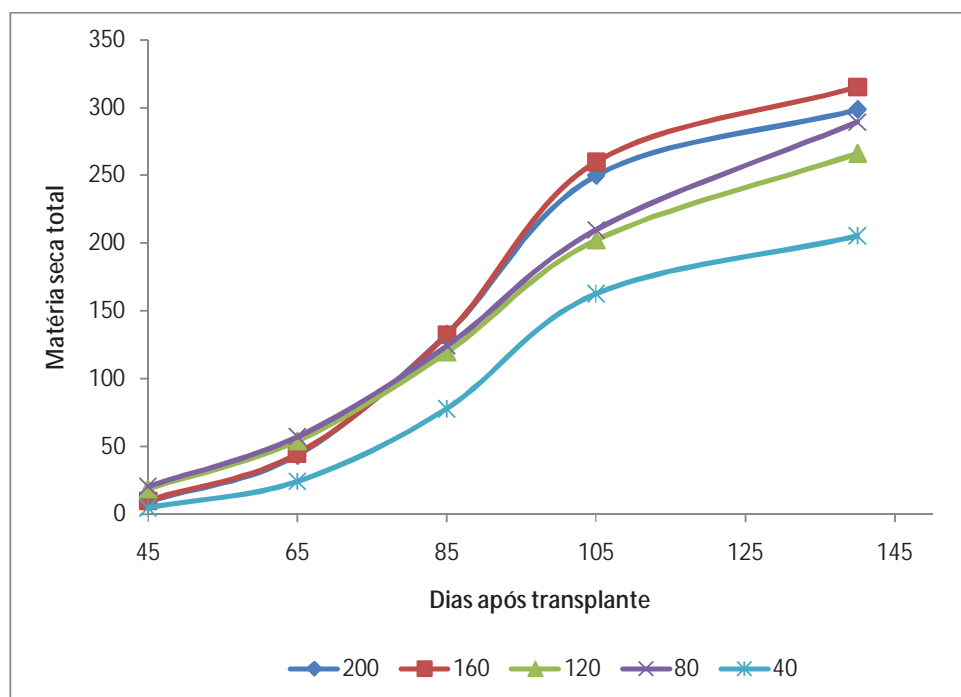
A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 3, revela que houve diferença de MST em todas as épocas de colheita e as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram menor MST durante todo o ciclo de desenvolvimento. Deve-se destacar que, até os 85 DAT, o nível de cálcio igual a 80 mg L<sup>-1</sup> promoveu adequada produção de MST e que, a partir dos 105 DAT, as plantas necessitaram de maior quantidade de cálcio para manter maior MST.

Leal (2001) ao cultivar *Mentha piperita* em solução nutritiva, com variação do nível de nitrogênio, observou que as plantas cultivadas na solução completa, contendo 210 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio, apresentaram maior MST, quando comparadas às cultivadas com 263 e 315 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo a partir dos 105 DAT, quando o cultivo da menta com solução nutritiva completa e nível de cálcio igual a 160 mg L<sup>-1</sup> promoveu elevada MST. Em ambos os estudos, níveis dos nutrientes acima daquele preconizado para a solução nutritiva completa resultaram em menor produção de matéria seca total. Ferrari et al. (2005) cultivando *Mentha crispa* L., em solução nutritiva nº 1 de Hoagland & Arnon (1950), com redução do nível de cálcio de 200 mg L<sup>-1</sup> para 60 mg L<sup>-1</sup>, até 46 dias após o transplante e 20 mg L<sup>-1</sup> a seguir (60/20) e para 30 mg L<sup>-1</sup>, também observaram que os níveis mais baixos e iguais a 60/20 e 30 mg L<sup>-1</sup> promoveram redução na MST. De Fazio (2007) ao cultivar *Mentha piperita* em solução nutritiva com redução do nível de cálcio relatou que as plantas cultivadas com o menor nível e igual a 16 mg L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> apresentaram redução da MST.

**Tabela 3.** Comparação entre médias de matéria seca total, em g, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	8,93 b	42,96 c	136,51 a	222,16 b	309,68 b	144,05
160	9,72 b	47,22 b	135,66 a	243,76 a	321,18 a	151,51
120	19,76 a	46,49 b	134,52 a	199,00 c	264,25 d	132,80
80	17,95 a	78,24 a	131,07 a	189,16 d	303,49 c	143,98
40	4,57 c	26,11 d	79,78 b	149,83 e	210,54 e	94,17
<b>médias colheitas</b>	12,19	48,20	123,51	200,78	281,83	

Letras minúsculas comparam médias dos níveis de cálcio em cada época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 4.** Matéria seca total, em g, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Valores ajustados pela equação exponencial quadrática.

### **Avaliação dos índices fisiológicos, em seu conjunto**

A área foliar (AF), a matéria seca de lâminas foliares (MSLF) e a matéria seca total (MST) das plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, apresentaram, de maneira geral, comportamento semelhante entre si (figuras 2, 3 e 4).

Tomando-se como referência os índices fisiológicos das plantas cultivadas com  $160 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que o cultivo com  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio, até os 85 DAT, permitiu adequado desenvolvimento das plantas, que apresentaram elevada AF, MSLF e MST. Verifica-se ainda que, de maneira geral, a redução do nível de cálcio para  $40 \text{ mg L}^{-1}$  diminuiu os índices fisiológicos ao longo do ciclo de desenvolvimento, que no entanto, não levou à sinais de deficiência das plantas.

## Trocas gasosas

### Assimilação de CO<sub>2</sub>

A variação da assimilação de CO<sub>2</sub> de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas épocas de avaliação, pode ser observada na figura 5.

De maneira geral, a assimilação de CO<sub>2</sub> das plantas submetidas aos diferentes níveis de cálcio diminuiu com o desenvolvimento. O maior decréscimo foi observado nas plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup>. As cultivadas com 120 e 200 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram menor variação da assimilação de CO<sub>2</sub> e, ao longo das avaliações, as médias de assimilação de CO<sub>2</sub> não variaram entre si (figura 5 e tabela 4).

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 4, revela que não houve diferença de assimilação de CO<sub>2</sub> nas avaliações realizadas aos 65 e 85 DAT. Aos 105 DAT, a assimilação de CO<sub>2</sub> das plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio foi menor que a das cultivadas com os demais níveis que, por sua vez, não diferiram entre si.

Tomando-se como referência a assimilação de CO<sub>2</sub> das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que houve discreto efeito da variação do nível de cálcio, sendo que a redução deste nutriente para 40 mg L<sup>-1</sup> promoveu declínio da assimilação de CO<sub>2</sub> aos 105 DAT.

De acordo com Atkinson et al. (1989) a deficiência de cálcio reduz a produção de biomassa em plantas, que pode ser resultante da diminuição na eficiência de carboxilação, na capacidade fotossintética e na produção de energia. Ramalho et al. (1995) avaliaram a influência do Ca<sup>2+</sup> em *Coffea arabica*, e verificaram que a deficiência deste nutriente induziu a deterioração do aparelho fotossintético, tanto em nível estomático como mesofílico. Estes últimos autores relataram ainda que a deficiência desse nutriente reduziu a expansão foliar, a área fotossinteticamente ativa, a produção de clorofila e, portanto, a captação de luz pelo complexo antena, interferindo com a eficiência fotoquímica do PSII. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os acima citados e as plantas cultivadas com o menor nível de cálcio, que não induziu nelas a manifestação de sinais de deficiência, reduziu a assimilação de CO<sub>2</sub>, a produção de biomassa (figuras 3 e 4) e área foliar (figura 2).

Deve-se destacar que não foram encontrados trabalhos, na literatura consultada, que avaliem a influência da variação do nível de cálcio na assimilação de CO<sub>2</sub> em *M. piperita*.

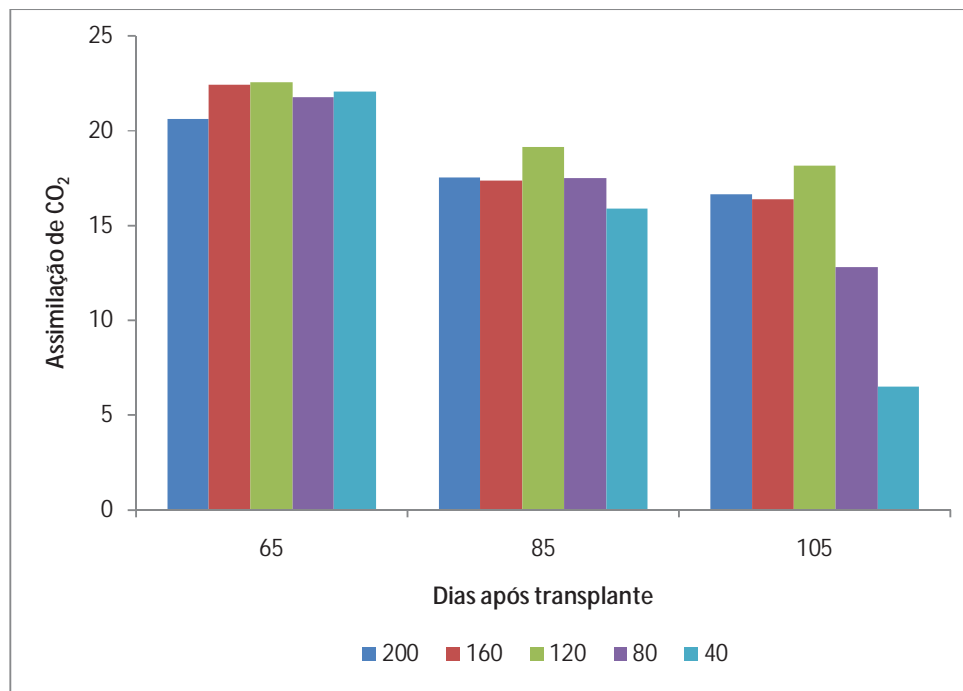
Com o intuito de avaliar a influência da variação do nível de magnésio sobre a assimilação de CO<sub>2</sub>, David (2007) cultivou *Mentha piperita* em solução nutritiva completa e modificada para fornecimento desse nutriente e observou que a assimilação de CO<sub>2</sub> foi mantida ou até maior com redução de magnésio. A autora sugeriu que mesmo tendo sido reduzida a quantidade do nutriente fornecido às plantas foi suficiente para a realização das atividades metabólicas. Esses resultados concordam com os obtidos no presente estudo em que a redução do nível de cálcio para 25% do proposto na solução completa foram suficientes para manter a assimilação das plantas.

Rosolem (2005) relatou que mesmo sendo detectada redução dos teores de cálcio e magnésio no tecido foliar da planta, os níveis podem ainda ser classificados na faixa de suficiência, não causando, portanto, danos ao crescimento ou à produção.

**Tabela 4.** Comparação entre médias da assimilação de CO<sub>2</sub>, em  $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)			médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	65	85	105	
200	20,63 aA	17,54 aA	16,64 aA	18,27
160	22,43 aA	17,37 aB	16,41 aB	18,74
120	22,53 aA	19,14 aA	18,15 aA	19,94
80	21,78 aA	17,51 aAB	12,83 aB	17,37
40	22,07 aA	15,90 aB	6,50 bC	14,82
<b>médias colheitas</b>	21,88	17,49	14,11	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 5.** Assimilação de CO<sub>2</sub>, em  $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.



## Transpiração

A variação da transpiração de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas épocas de avaliação, pode ser observada na figura 6.

De maneira geral, a transpiração das plantas de menta submetidas aos diferentes níveis de cálcio diminuiu ao longo do ciclo de desenvolvimento, resultados concordantes com a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (figura 5).

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 5, revela que não houve diferença de transpiração nas avaliações realizadas aos 65 e 85 DAT. Aos 105 DAT, a transpiração das plantas cultivadas com 40 e 80 mg L<sup>-1</sup> de cálcio foi menor que a das plantas cultivadas com 120 e 200 mg L<sup>-1</sup> e não diferiu daquelas com 160 mg L<sup>-1</sup>.

Tomando-se como referência a transpiração das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que não houve efeito da variação do nível de cálcio nesta variável. No entanto, as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram maior decréscimo na transpiração, durante o ciclo de desenvolvimento (tabela 5).

Esses resultados encontram apoio nos registros de Larcher (2006) que refere que por meio da regulação estomática, a planta é capaz de modular as taxas de transpiração de acordo com as possibilidades e as necessidades do seu balanço hídrico. As mudanças na resistência estomática são importantes para a regulação da perda de água pela planta e para o controle da taxa de absorção de dióxido de carbono necessária à fixação continuada deste CO<sub>2</sub> durante a fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2009).

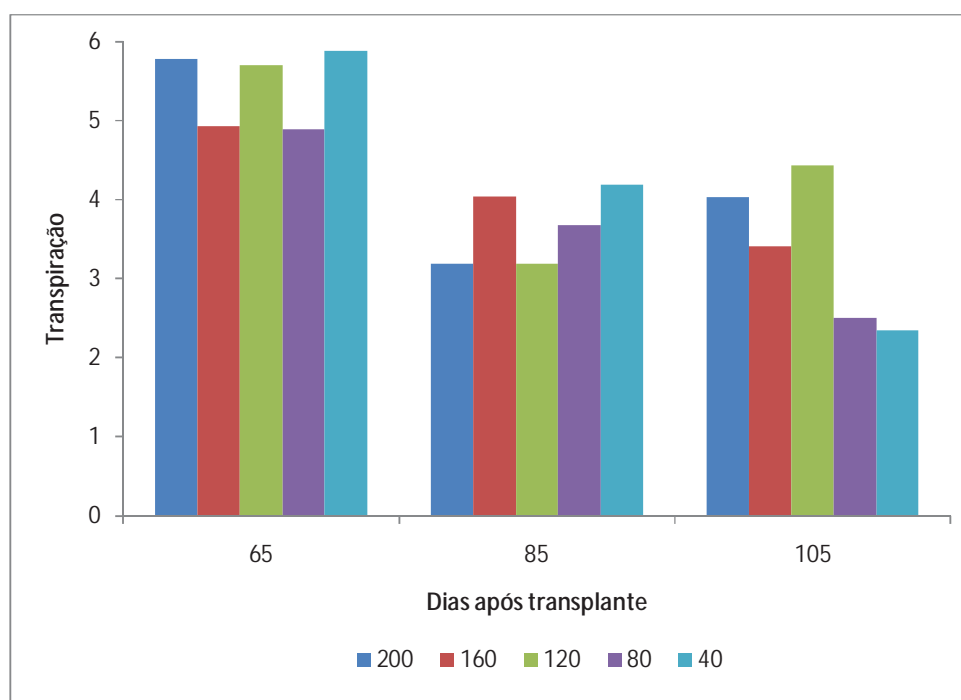
Deve ser destacado que, na literatura consultada, não foram identificados trabalhos que avaliem a influência da variação do nível de cálcio na transpiração de *M. piperita*.

David (2007), cultivando *Mentha piperita* em solução nutritiva completa e modificada para fornecimento de 50% de N, P, K e Mg; 50% de N, P e K e 25% de Mg; e 65% de N, 50% de P, 25% de K e 100% de Mg observou que, independente da porcentagem de redução de N, P, K e Mg, houve, de maneira geral, aumento da transpiração das plantas de menta comparadas às cultivadas com solução completa, resultados que diferem dos observados no presente estudo, em que não foi observada influência da variação do nível de cálcio na transpiração das plantas da mesma espécie.

**Tabela 5.** Comparação entre médias da transpiração, em  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis $\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Colheitas (DAT)			médias níveis $\text{Ca}^{2+}$
	65	85	105	
200	5,78 aA	3,19 aB	4,03 aB	4,33
160	4,93 aA	4,04 aAB	3,41 abB	4,13
120	5,70 aA	3,19 aB	4,43 aAB	4,44
80	4,89 aA	3,68 aAB	2,50 bB	3,69
40	5,88 aA	4,19 aB	2,35 bC	4,14
<b>médias colheitas</b>	5,44	3,66	3,35	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 6.** Transpiração, em  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.

## Concentração interna de CO<sub>2</sub>

A variação da concentração interna de CO<sub>2</sub> de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas épocas de avaliação, pode ser observada na figura 7.

A concentração interna de CO<sub>2</sub> durante o ciclo de desenvolvimento da menta, variou menos, de maneira geral, nas plantas cultivadas com 80 e 120 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que não apresentaram diferença entre as avaliações, quando comparada com a daquelas cultivadas com os demais níveis. Deve-se ressaltar que, de maneira geral, a concentração interna de CO<sub>2</sub> manteve-se elevada durante todo o ciclo de desenvolvimento (figura 7 e tabela 6).

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 6, revela que houve diferença de concentração interna de CO<sub>2</sub> em todas as avaliações.

Tomando-se como referência a concentração interna de CO<sub>2</sub> das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que, aos 65 DAT, a variação do nível de cálcio aumentou a concentração interna de CO<sub>2</sub>. Aos 85 DAT, o menor e o maior nível de cálcio, iguais respectivamente a 40 e 200 mg L<sup>-1</sup> diminuíram a concentração interna de CO<sub>2</sub>. Aos 105 DAT, a redução do cálcio para 80 mg L<sup>-1</sup> diminuiu a concentração interna de CO<sub>2</sub> nas plantas (tabela 6).

Apesar do acúmulo de CO<sub>2</sub> nas folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, a taxa fotossintética foi elevada no início do ciclo. Essa observação talvez concorde com os relatos de Larcher (2006), de que nessas condições a carboxilação esteja próxima à saturação.

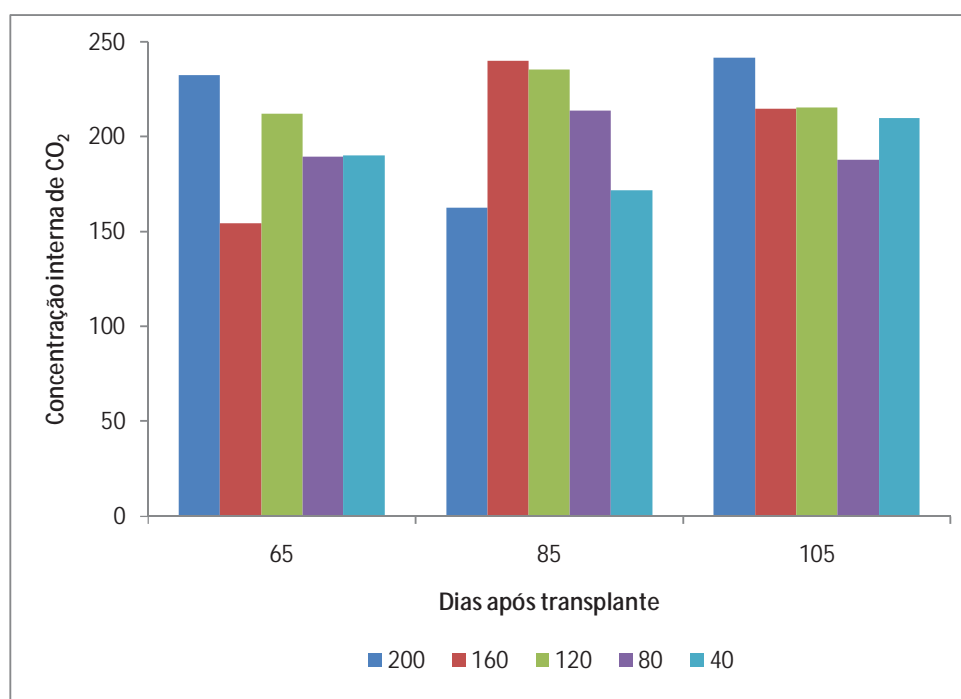
Não foram encontrados, na literatura consultada, trabalhos que avaliem a influência da variação do nível de cálcio na concentração interna de CO<sub>2</sub> em espécies aromáticas e medicinais.

David (2007), cultivando *Mentha piperita* em solução nutritiva completa e modificada para fornecimento de 50% de N, P, K e Mg; 50% de N, P e K e 25% de Mg; e 65% de N, 50% de P, 25% de K e 100% de Mg, observou que as plantas cultivadas com 50% de N, P e K e 25% de Mg apresentaram, de maneira geral, maior concentração interna de CO<sub>2</sub>, quando comparadas às cultivadas com a solução completa, ao longo do ciclo de desenvolvimento. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no presente estudo, aos 65 DAT, época em que a redução do nível de cálcio, elevou a concentração interna de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 6.** Comparação entre médias da concentração interna de CO<sub>2</sub>, em  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)			médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	65	85	105	
200	232,65 aA	162,65 bB	241,57 aA	212,30
160	154,31 cB	239,97 aA	214,69 aA	202,99
120	212,23 abA	235,42 aA	215,35 aA	221,00
80	189,40 bA	213,71 aA	187,77 bA	196,96
40	190,20 bAB	171,71 bB	209,70 aA	190,54
<b>médias colheitas</b>	195,76	204,69	213,82	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 7.** Concentração interna de CO<sub>2</sub>, em  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.

## Condutância estomática

A variação da condutância estomática de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas épocas de avaliação, pode ser observada na figura 8.

A condutância estomática durante o ciclo de desenvolvimento da menta, manteve-se mais constante nas plantas cultivadas com 120 e 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, diminuindo nas demais (figura 8 e tabela 7).

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 7, revela que não houve diferença de condutância estomática nas avaliações realizadas aos 65 e 85 DAT. Aos 105 DAT, a condutância estomática das plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio não diferiu daquela das cultivadas com 200 mg L<sup>-1</sup> e foi menor que a das plantas cultivadas com os demais níveis que, por sua vez, não diferiram entre si. Deve-se destacar que, ao longo do ciclo de desenvolvimento, as plantas cultivadas com 120 e 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio controlaram menos sua condutância estomática, quando comparadas com as cultivadas com 40, 80 e 200 mg L<sup>-1</sup>.

Tomando-se como referência a condutância estomática das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que, apenas no final do ciclo, aos 105 DAT, houve efeito da variação do nível de cálcio, sendo que a redução deste nutriente para 40 mg L<sup>-1</sup> e seu aumento para 200 mg L<sup>-1</sup> promoveram declínio da condutância estomática (tabela 7 e figura 8), indicando que estas plantas controlaram mais sua condutância estomática, resultando em diminuição da assimilação de CO<sub>2</sub> apenas nas plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> (tabela 4 e figura 5).

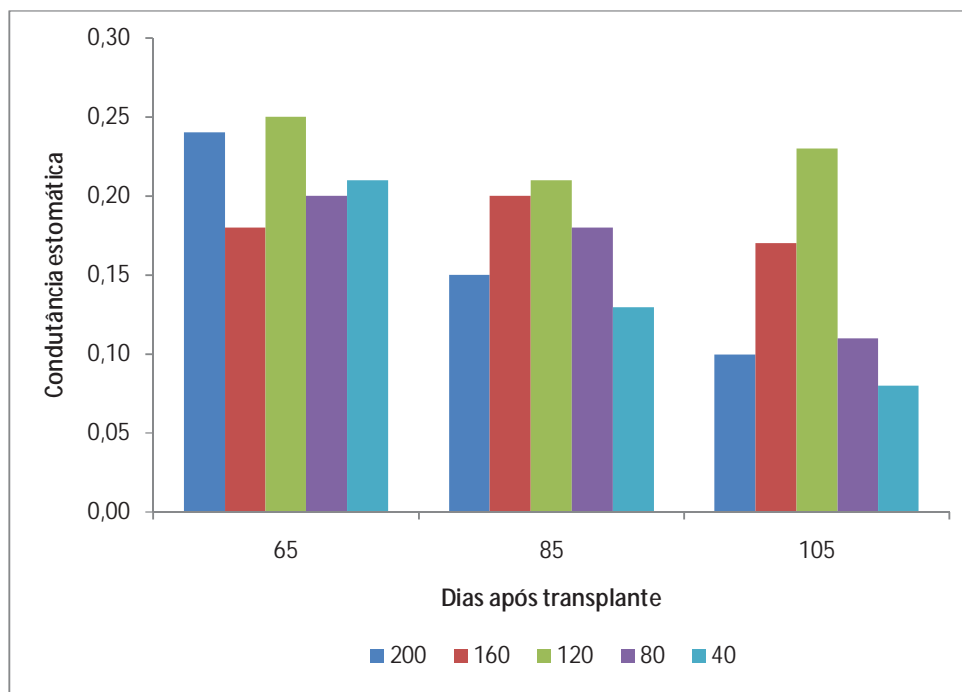
Deve-se destacar que não foram encontrados, na literatura consultada, trabalhos que avaliem a influência da variação do nível de cálcio na condutância estomática de espécies da família Lamiaceae.

No entanto, David (2007), cultivando *Mentha piperita* em solução nutritiva completa e modificada para redução de fornecimento de N, P, K e Mg observou que as plantas cultivadas com 50% de N, P, K e Mg e 50% de N, P e K e 25% de Mg apresentaram, de maneira geral, maior condutância estomática, ao longo do ciclo de desenvolvimento, quando comparadas com as cultivadas com a solução completa. Os resultados do presente estudo diferem dos observados por David (2007), pois a variação do nível de cálcio influenciou de maneira discreta a condutância estomática, verificando-se influência da redução do cálcio somente aos 105 DAT, quando as plantas foram cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 7.** Comparação entre médias da condutância estomática, em  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis $\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Colheitas (DAT)			médias níveis $\text{Ca}^{2+}$
	65	85	105	
200	0,24 aA	0,15 aB	0,10 bcB	0,16
160	0,18 aA	0,20 aA	0,17 abA	0,18
120	0,25 aA	0,21 aA	0,23 aA	0,23
80	0,20 aA	0,18 aAB	0,11 bB	0,16
40	0,21 aA	0,13 aB	0,08 cB	0,14
<b>médias colheitas</b>	0,22	0,17	0,14	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 8.** Condutância estomática, em  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.

### **Eficiência de uso da água**

A variação da eficiência de uso da água de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas épocas de avaliação, pode ser observada na figura 9.

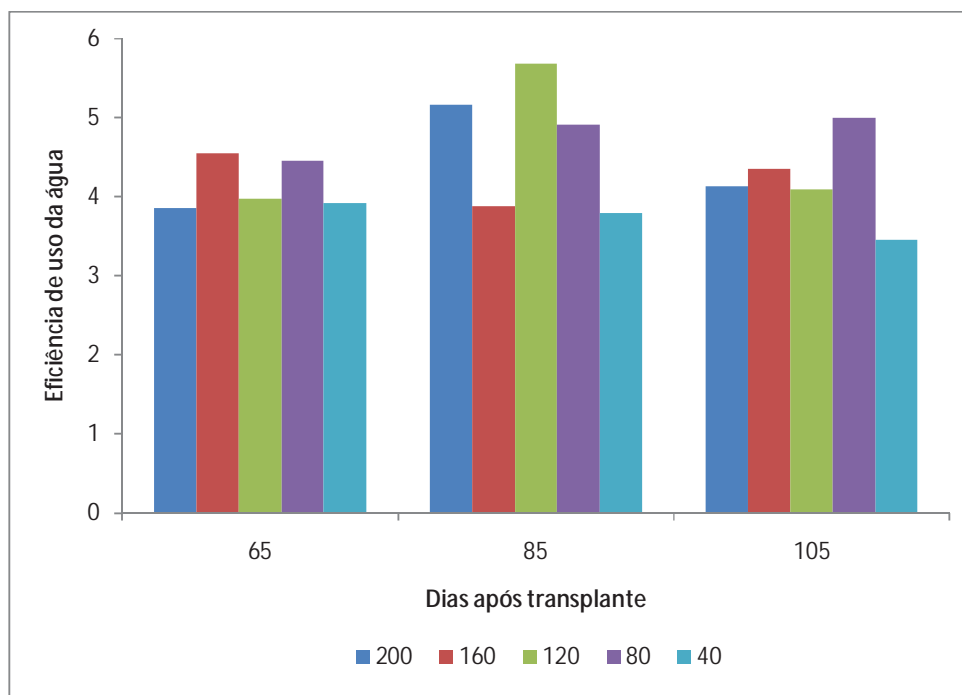
A variação da eficiência de uso da água nas plantas cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, que pode ser observada na tabela 8, foi discreta, e as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> apresentaram, em média, menor eficiência. Deve-se destacar que as plantas cultivadas com 80 mg L<sup>-1</sup> apresentaram elevada eficiência de uso da água em todas as épocas de avaliação e, em média, a maior eficiência, o que pode ser confirmado pela taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> nas plantas submetidas a esses dois níveis de cálcio, que foi menor nas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> e não diferiu nas cultivadas com 80 mg L<sup>-1</sup> (figura 5 e tabela 4).

Tomando-se como referência a eficiência de uso da água das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que o efeito da variação do nível de cálcio nas plantas de menta foi discreto e pouco mais evidente quando 40 mg L<sup>-1</sup> foram utilizados. Estes resultados podem indicar que, de maneira geral, independente do nível de cálcio utilizado na solução de cultivo, a menta tendeu a otimizar a entrada de CO<sub>2</sub> pelos estômatos sem, no entanto, perder excessiva quantidade de água.

Não foram identificados, na literatura consultada, trabalhos que avaliem a influência da nutrição mineral na eficiência de uso da água em espécies da família Lamiaceae.

**Tabela 8.** Médias e desvio padrão da eficiência de uso da água, em  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis $\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Colheitas (DAT)			médias níveis $\text{Ca}^{2+}$
	65	85	105	
200	$3,86 \pm 0,17$	$5,17 \pm 0,28$	$4,13 \pm 0,07$	4,39
160	$4,55 \pm 0,15$	$3,88 \pm 0,14$	$4,35 \pm 0,23$	4,26
120	$3,97 \pm 0,23$	$5,68 \pm 0,26$	$4,09 \pm 0,26$	4,58
80	$4,45 \pm 0,19$	$4,91 \pm 0,38$	$4,99 \pm 0,43$	4,78
40	$3,92 \pm 0,12$	$3,80 \pm 0,36$	$3,45 \pm 0,23$	3,72
<b>médias colheitas</b>	4,15	4,69	4,20	



**Figura 9.** Eficiência de uso da água, em  $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ , de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em  $\text{mg L}^{-1}$ , nas diferentes avaliações realizadas aos 65, 85 e 105 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.



### **Avaliação das trocas gasosas, em seu conjunto**

As trocas gasosas, avaliadas no presente estudo, por assimilação de CO<sub>2</sub>, transpiração, concentração interna de CO<sub>2</sub>, condutância estomática e eficiência de uso da água (figuras 5, 6, 7, 8 e 9) apresentaram, de maneira geral, discreta influência da variação do nível de cálcio na solução de cultivo. No entanto, a redução do nível de cálcio para 40 mg L<sup>-1</sup> geralmente diminuiu as variáveis de trocas gasosas, no final do desenvolvimento das plantas.

Deve-se ainda ressaltar que, de maneira geral, a assimilação de CO<sub>2</sub>, a transpiração e a condutância estomática tenderam a diminuir com a idade das plantas, enquanto a concentração interna de CO<sub>2</sub> e a eficiência de uso da água apresentaram menores variações durante as avaliações.

Tomando-se como referência as variáveis de trocas gasosas das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que o aumento do cálcio para 200 mg L<sup>-1</sup> ou sua diminuição para 120 mg L<sup>-1</sup> não influenciou a assimilação de CO<sub>2</sub>, a transpiração e a condutância estomática, revelando poucas vezes nas avaliações realizadas, discretas diferenças de concentração interna de CO<sub>2</sub> e eficiência do uso da água. Assim, nas plantas cultivadas com 200 mg L<sup>-1</sup>, enquanto aos 65 DAT verificou-se aumento da concentração interna de CO<sub>2</sub> e diminuição da eficiência, aos 85 DAT, essa relação inverteu.

A comparação das plantas cultivadas com 80 mg L<sup>-1</sup> de cálcio com as cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> também não revelou variação de assimilação de CO<sub>2</sub>, transpiração e condutância estomática e, embora tenham sido observadas discretas variações de concentração interna de CO<sub>2</sub>, foram essas as plantas que apresentaram a melhor eficiência de uso da água.

As plantas cultivadas com redução do nível de cálcio para 40 mg L<sup>-1</sup> comparadas àquelas com o nível completo, igual a 160 mg L<sup>-1</sup>, embora não tenham apresentado alteração da transpiração, revelaram apenas na última avaliação diminuição da assimilação de CO<sub>2</sub> e em média, menor eficiência de uso da água.

Portanto, com base nos resultados obtidos, a avaliação das variáveis de trocas gasosas revelou que, em relação ao nível de 160 mg L<sup>-1</sup>, a variação do nível de cálcio não interferiu na transpiração e que, embora essa variação tenha demonstrado algumas alterações nas demais variáveis, apenas as plantas cultivadas com o menor nível de cálcio revelaram redução na assimilação de CO<sub>2</sub> na última avaliação.

## Rendimento e composição química de óleo essencial

### Rendimento

A variação do rendimento de óleo essencial de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 10.

O rendimento de óleo essencial durante o ciclo de desenvolvimento da menta manteve-se mais elevado, aos 85 e 105 DAT, nas plantas cultivadas com os diferentes níveis de cálcio.

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 9, revela que não houve diferença de rendimento de óleo essencial nas colheitas realizadas aos 45, 105 e 140 DAT. Aos 65 DAT, as plantas cultivadas com 40 e 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram o menor rendimento de óleo, enquanto aos 85 DAT, o menor rendimento foi observado nas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup>, que não diferiu daquelas com 80 mg L<sup>-1</sup> de cálcio.

Tomando-se como referência o rendimento de óleo essencial das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que o único efeito da variação do nível de cálcio foi verificado nas plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup>, que apresentaram o menor rendimento de óleo essencial aos 85 DAT.

Vários estudos foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos da nutrição mineral sobre o rendimento de óleo essencial de espécies da família Lamiaceae. Mairapetyan (1999) estudou a otimização das relações N:P:K em *M. piperita*, em cultivo hidropônico e concluiu que a menta requer maior suprimento de fósforo para o máximo acúmulo de óleo essencial, o que concorda com os resultados do presente estudo, quando se considera o menor nível de cálcio ao qual as plantas foram submetidas. Leal (2001) trabalhando com *Mentha piperita*, em solução nutritiva com diferentes níveis de nitrogênio, concluiu que os maiores níveis de nitrogênio interferiram com o desenvolvimento das plantas, diminuindo o rendimento do óleo essencial. Valmorbidia et al. (2006) ao avaliarem a mesma espécie cultivada em solução nutritiva, concluíram que a menta pode ser cultivada com redução de 50 a 75% do potássio recomendado na solução nutritiva, apresentando rendimento satisfatório do óleo essencial. Maia et al. (2001), cultivando *Mentha arvensis* em solução nutritiva contendo 100, 200 (controle) e 400 mg L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> verificaram que o aumento do cálcio elevou o rendimento de óleo, enquanto sua redução para 100 mg L<sup>-1</sup> diminuiu o rendimento do óleo.

De Fazio (2007) avaliou plantas de *Mentha piperita* em solução nutritiva com redução do nível de cálcio em diferentes épocas do ciclo de desenvolvimento e observou que aos 106 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução, as plantas cultivadas com 80 e 16 mg L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> apresentaram diminuição do rendimento de óleo essencial, sendo o menor valor observado nas cultivadas com 16 mg L<sup>-1</sup>. Já aos 136 DAT, a redução do cálcio para 80 mg L<sup>-1</sup> não prejudicou o rendimento de óleo, o que ocorreu uma vez mais nas plantas cultivadas com 16 mg L<sup>-1</sup>, indicando ser esse nível insuficiente para o desenvolvimento da espécie e para a produção de seu óleo. Esses estudos concordam em parte com os resultados obtidos nesse trabalho, uma vez que a *Mentha piperita* pode ser cultivada com redução de cálcio em 50% na solução nutritiva, sem que ocorra prejuízo de rendimento de seu óleo essencial.

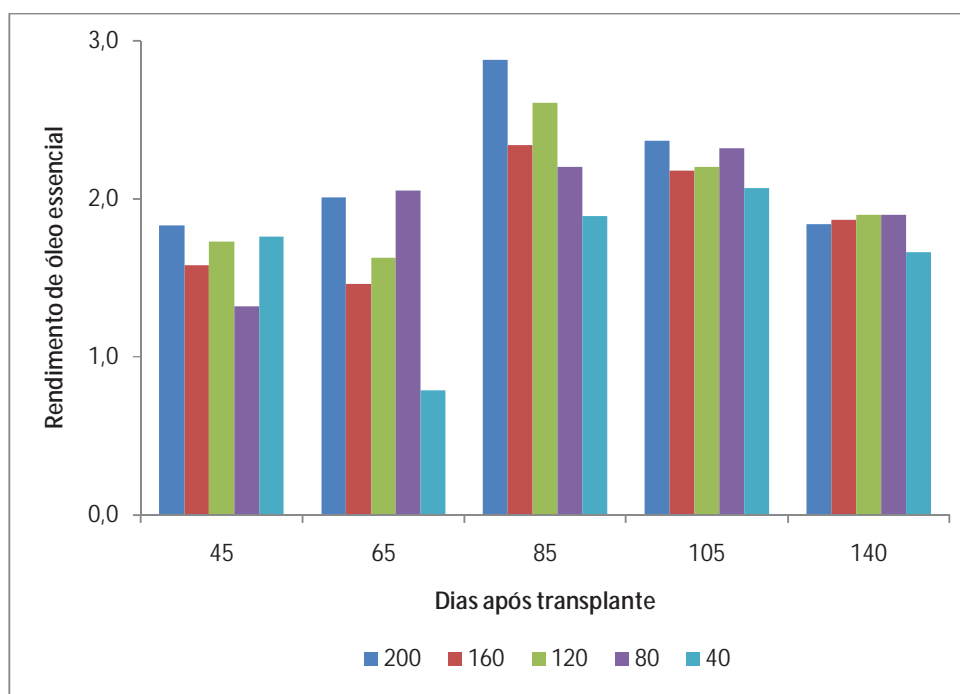
Na menta, o rendimento de óleo é influenciado pela época de colheita das plantas (Rabak, 1977; Topalov & Zheljzakov, 1991). De Fazio (2007) avaliou plantas de *Mentha piperita* em solução nutritiva com redução do nível de cálcio em diferentes épocas do ciclo de desenvolvimento, demonstrando que a mesma dosagem de um nutriente pode levar a resultados diferentes de produção de óleo em diferentes épocas.

Os resultados observados no presente estudo revelam discreta influência do nível de cálcio na produção de óleo essencial, concordando com os demais estudos que verificam influência da época de avaliação e da concentração do elemento a que as plantas de menta foram submetidas.

**Tabela 9.** Comparação entre médias do rendimento de óleo essencial, em g 100 g<sup>-1</sup> matéria seca, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	1,83 aB	2,01 aB	2,88 aA	2,37 aAB	1,84 aB	2,19
160	1,58 aAB	1,46 abB	2,34 aA	2,18 aA	1,87 aA	1,89
120	1,73 aB	1,63 aB	2,61 aA	2,20 aA	1,90 aAB	2,01
80	1,32 aB	2,05 aA	2,20 abA	2,32 aA	1,90 aAB	1,96
40	1,76 aA	0,79 bB	1,89 bA	2,07 aA	1,66 aA	1,63
<b>médias colheitas</b>	1,64	1,59	2,38	2,23	1,84	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 10.** Rendimento de óleo essencial, em g 100 g<sup>-1</sup> matéria seca, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.

## **Composição química do óleo essencial**

A análise cromatográfica do óleo essencial de *Mentha piperita* cultivada com variação de cálcio revelou a detecção de 28 substâncias (tabela 10), sendo duas não identificadas. Dentre as substâncias identificadas optou-se por avaliar limoneno, pulegona, mentona, mentofurano + neo-mentol, mentol, acetato de mentila e 1,8-cineol, uma vez que, a soma de seus teores corresponde a 90,7% do total das 28 substâncias identificadas no óleo. A coluna capilar de sílica fundida DB-5 utilizada no cromatógrafo a gás (GC-FID) não permitiu quantificar separadamente os teores de mentofurano e neo-mentol, substâncias representadas por um único pico nos cromatogramas, o que levou, portanto, a avaliação conjunta dos teores desses dois componentes.

**Tabela 10.** Composição química do óleo essencial, em %, das plantas de *Mentha piperita* L. cultivadas em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>. Médias das colheitas realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 DAT.

Substâncias (%)	Níveis de cálcio (mg L <sup>-1</sup> )					Média (%)	IKcal	IKlit
	200	160	120	80	40			
α-pineno	0,61	0,52	0,56	0,55	0,48	0,54	929	939
sabineno	0,51	0,44	0,48	0,48	0,42	0,47	968	975
β-pineno	1,01	0,89	0,93	0,94	0,82	0,92	972	979
mirreno	0,24	0,21	0,23	0,21	0,20	0,22	985	990
α-terpineno	0,12	0,13	0,13	0,13	0,11	0,12	1012	1017
limoneno	1,32	1,30	1,21	1,24	1,05	1,22	1023	1029
1,8-cineol	5,18	4,38	5,00	5,40	4,35	4,86	1026	1031
trans-β-ocimeno	0,21	0,21	0,21	0,22	0,18	0,21	1052	1050
γ-terpineno	1,61	1,53	1,75	1,67	1,57	1,63	1060	1059
linalol	0,26	0,23	0,27	0,32	0,25	0,26	1094	1095
ni	0,17	0,27	0,16	0,18	0,18	0,19	1139	-
mentona	24,79	22,98	22,91	21,23	18,80	22,14	1147	1152
mentofurano + neo-mentol	22,36	22,40	21,10	21,08	20,95	21,58	1157	1164
mentol	26,87	32,63	31,73	34,66	34,78	32,13	1167	1171
terpin-4-ol	0,56	0,57	0,61	0,64	0,52	0,58	1171	1177
iso-mentol	0,36	0,49	0,48	0,46	0,51	0,46	1177	1182
neo-iso-mentol	0,29	0,26	0,33	0,17	0,18	0,24	1183	1186
α-terpineol	0,15	0,18	0,16	0,23	0,20	0,18	1184	1188
pulegona	4,15	2,69	2,89	2,63	2,77	3,03	1232	1237
piperitona	0,20	0,21	0,21	0,21	0,19	0,20	1247	1252
neo-acetato de mentila	0,76	0,84	0,66	0,50	0,85	0,72	1269	1273
acetato de mentila	5,06	6,15	6,15	5,06	6,19	5,72	1287	1295
iso-acetato de mentila	0,40	0,47	0,37	0,24	0,36	0,37	1302	1305
trans-cariofileno	0,81	0,90	0,88	0,98	1,25	0,96	1413	1419
trans-β-farneseno	0,16	0,17	0,17	0,17	0,29	0,19	1450	1456
γ-gurjuneno	1,35	1,44	1,42	1,53	2,18	1,58	1474	1477
biciclogermacreno	0,15	0,16	0,15	0,17	0,23	0,17	1489	1500
ni	0,27	0,32	0,30	0,36	0,62	0,37	1584	-

ni: substância não identificada. IKcal: índice de retenção de Kovats calculado. IKlit: índice de Kovats da literatura.

## Limono

A variação do teor de limono no óleo essencial de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 11.

O teor de limono durante o ciclo de desenvolvimento da menta manteve-se mais elevado nas plantas cultivadas com os diferentes níveis de cálcio a partir dos 85 DAT. Além disso, as plantas cultivadas com 80 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram teores elevados de limono a partir dos 65 DAT.

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 11, revela que não houve diferença do teor de limono nas colheitas realizadas aos 85, 105 e 140 DAT. Aos 45 DAT, o teor de limono das plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio não diferiu daquele das plantas nutridas com 80 e 120 mg L<sup>-1</sup> e foi menor que o das plantas cultivadas com 160 e 200 mg L<sup>-1</sup> que, por sua vez, não diferiram entre si. Aos 65 DAT as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram, de maneira geral, menor teor de limono que as demais. Dessa forma, o nível de cálcio influenciou mais o teor de limono nas avaliações realizadas no início do ciclo, quando a produção de limono foi menor. É interessante notar que aos 45, 65, 85 e 105 DAT, de maneira geral, o teor de limono diminuiu ou tendeu a diminuir com a diminuição do nível de cálcio.

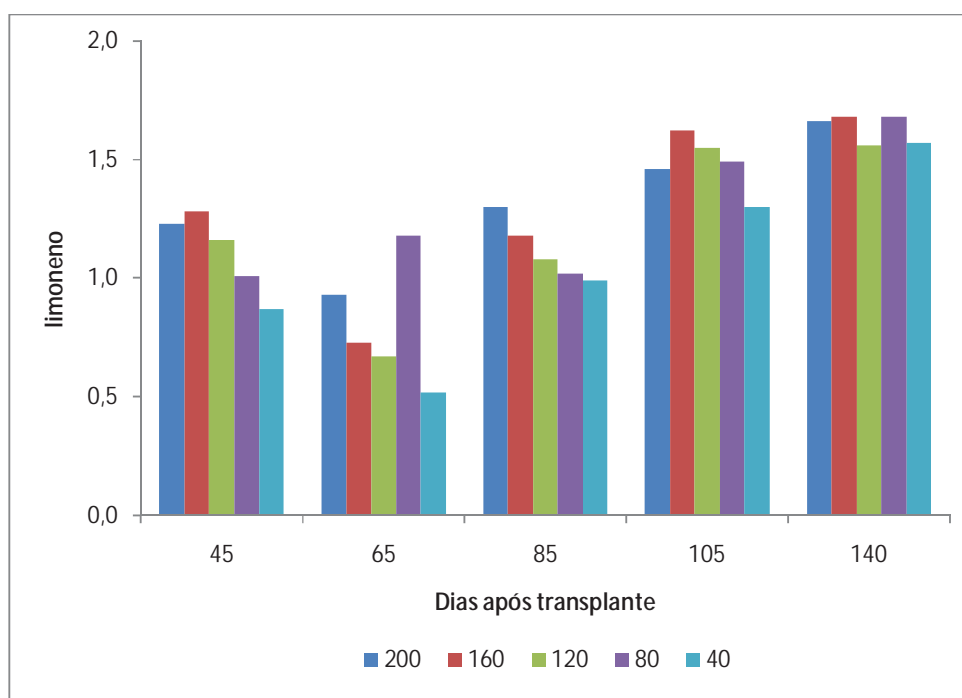
Tomando-se como referência o teor de limono das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que houve efeito da variação do nível de cálcio.

Os resultados do presente estudo concordam com os observados por Maia et al. (2001) que, cultivando *Mentha arvensis* em solução nutritiva contendo 100, 200 (controle) e 400 mg L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> verificaram que o aumento do cálcio elevou o teor de limono, enquanto sua redução para 100 mg L<sup>-1</sup> diminuiu o teor desta substância.

**Tabela 11.** Comparação entre médias do teor de limoneno, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	1,23 aBC	0,93 abC	1,30 aB	1,46 aAB	1,66 aA	1,32
160	1,28 aBC	0,73 bD	1,18 aC	1,62 aAB	1,68 aA	1,30
120	1,16 abB	0,67 bcC	1,08 aB	1,55 aA	1,56 aA	1,21
80	1,01 abC	1,18 aBC	1,02 aC	1,49 aAB	1,68 aA	1,28
40	0,87 bC	0,52 cD	0,99 aBC	1,30 aAB	1,57 aA	1,05
<b>médias colheitas</b>	1,11	0,81	1,12	1,48	1,63	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 11.** Teor de limoneno, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.



## Pulegona

A variação do teor de pulegona no óleo essencial de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 12.

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 12, revela que houve diferença do teor de pulegona em todas as épocas de colheita. Aos 45 DAT, o teor de pulegona das plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio foi maior que o daquelas cultivadas com os demais níveis, enquanto nas demais épocas de colheita, de maneira geral, as plantas cultivadas com 200 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram maior teor de pulegona.

Tomando-se como referência o teor de pulegona das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que houve efeito da variação do nível de cálcio.

Deve ser destacado que aos 85 DAT, a diminuição do nível de cálcio, diminuiu ou tendeu a diminuir o teor de pulegona. Já aos 105 e 140 DAT, apenas o nível de cálcio igual a 200 mg L<sup>-1</sup> elevou esse teor.

A pulegona é acumulada quando a planta encontra-se em condições de estresse (Croteau et al., 2005), podendo-se inferir que o cultivo da menta com o nível de cálcio mais elevado e igual a 200 mg L<sup>-1</sup> desencadeou estresse nas plantas. Elevados teores desta substância diminuem a qualidade do óleo essencial e podem desviar a rota de produção do mentol, pela síntese do mentofurano, por ação da enzima mentofurano sintase (Croteau et al., 2005). Segundo Croteau et al. (2005) a síntese de mentofurano é um processo irreversível, ao contrário do que ocorre na síntese de neo-mentol, onde este pode ser transformado novamente em mentona, podendo vir a formar o mentol.

Segundo Simões & Spitzer (2007) a pulegona é um componente indesejável devido a sua ação hepatotóxica. No entanto, é um monoterpene apontado como principal componente inseticida, apresentando atividade contra ovos, larvas e adultos de drosófilas (Addor, 1994).

David (2003) avaliou *M. piperita* em solução nutritiva com variação do nível de fósforo e verificou que o menor nível de fósforo e igual a 57,5 mg L<sup>-1</sup>, no início do ciclo, elevou o teor de pulegona, quando as plantas foram comparadas às cultivadas com o nível de fósforo completo, igual a 115 mg L<sup>-1</sup>. Esses resultados estão em concordância com os do presente estudo, quando as plantas de menta foram cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio e apresentaram o maior teor de pulegona, aos 45 DAT.

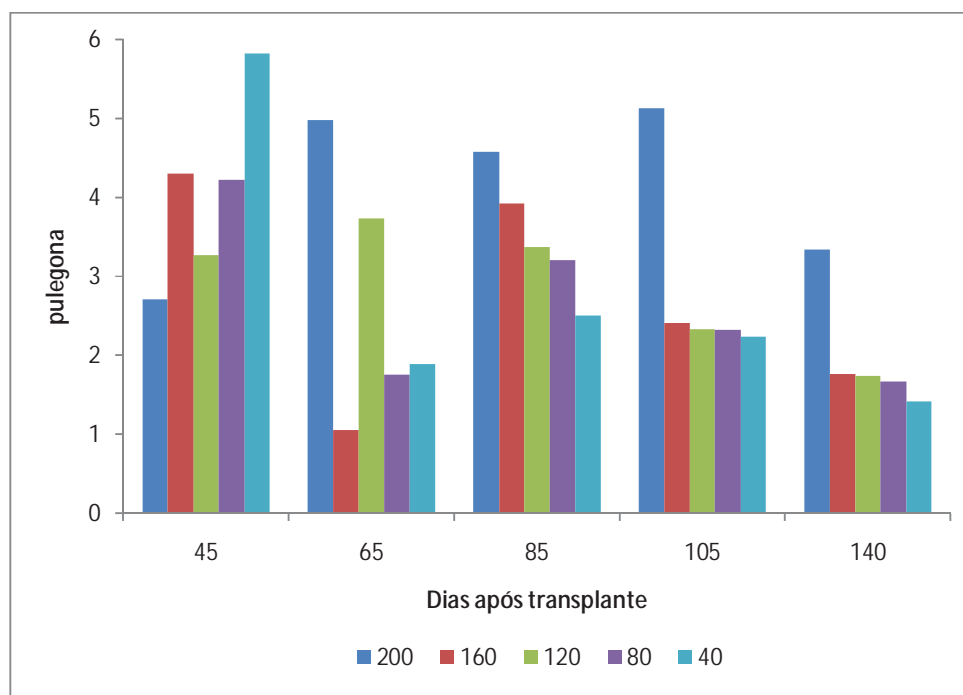
Da mesma forma, Leal (2001) cultivou *Mentha piperita*, em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon com diferentes níveis de nitrogênio e observou que o cultivo com 263 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio, 25% acima do nível proposto na solução completa, aumentou o teor de pulegona, quando comparado ao das plantas cultivadas com a solução completa, contendo 210 mg L<sup>-1</sup> de N. Esses resultados concordam com os obtidos no presente estudo em que as plantas cultivadas com o maior nível de cálcio e igual a 200 mg L<sup>-1</sup>, a partir dos 65 DAT, apresentaram, de maneira geral, os maiores teores de pulegona.

Embora os trabalhos acima citados tenham avaliado a menta cultivada com variação de fósforo e nitrogênio, os resultados demonstram que níveis mais baixos e mais elevados dos minerais podem conduzir a aumento do teor de pulegona.

**Tabela 12.** Comparação entre médias do teor de pulegona, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	2,71 cB	4,98 aA	4,57 aA	5,13 aA	3,34 aB	4,15
160	4,30 bA	1,06 cC	3,92 abA	2,41 bB	1,76 bBC	2,69
120	3,27 cA	3,73 bA	3,37 bA	2,33 bB	1,74 bB	2,89
80	4,22 bA	1,75 cC	3,20 bcB	2,32 bC	1,67 bC	2,63
40	5,82 aA	1,89 cBC	2,50 cB	2,23 bB	1,42 bC	2,77
<b>médias colheitas</b>	4,07	2,68	3,51	2,88	1,99	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 12.** Teor de pulegona, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.

## Mentona

A variação do teor de mentona no óleo essencial de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 13.

O teor de mentona durante o ciclo de desenvolvimento da menta manteve-se, de maneira geral, mais elevado nas plantas cultivadas com os maiores níveis de cálcio. Esse teor diminuiu consideravelmente com a idade das plantas, independente do tratamento a que foram submetidas, resultados concordantes com as observações de Lima & Mollam (1952) e David (2007) que, ao cultivarem respectivamente *M. arvensis* e *M. piperita*, verificaram diminuição no teor de mentona durante o desenvolvimento das plantas.

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 13, revela que só não houve diferença do teor de mentona aos 140 DAT.

Tomando-se como referência o teor de mentona das plantas cultivadas com  $160 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que houve efeito da variação do nível de cálcio. Em especial, as plantas cultivadas com  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , apresentaram menor teor de mentona, até os 85 DAT, épocas em que o maior nível, igual a  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , de maneira geral, não alterou ou elevou o teor de mentona. Além disso, até 65 DAT, a diminuição do nível de cálcio na solução de cultivo, em geral, reduziu a mentona.

Croteau et al. (2005) referem qualidade do óleo essencial quando é elevado o teor de mentol, intermediário o de mentona e reduzido o de mentofurano. Essa condição foi verificada no presente estudo aos 65 e 85 DAT, épocas em que as plantas submetidas aos diferentes tratamentos apresentaram baixo teor de mentofurano, teor intermediário de mentona e elevado de mentol.

Maia et al. (2001), cultivaram *Mentha arvensis* L. em solução nutritiva contendo 100, 200 (controle) e  $400 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$  e verificaram que o aumento do cálcio elevou o teor de mentona, enquanto sua redução para  $100 \text{ mg L}^{-1}$  diminuiu esse teor. Esses resultados concordam com os obtidos no presente estudo, aos 45 DAT, época em que o cultivo das plantas com 40, 80 e  $120 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio diminuiu o teor de mentona, quando comparado ao verificado para as plantas cultivadas com o nível completo e igual a  $160 \text{ mg L}^{-1}$ . Aos 65 DAT, o aumento do nível de cálcio para  $200 \text{ mg L}^{-1}$  elevou o teor de mentona.

Leal (2001) avaliou *Mentha piperita*, cultivada em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon com diferentes níveis de nitrogênio e observou que  $263 \text{ mg L}^{-1}$  do nutriente, 25%

acima do nível proposto na solução completa, igual a  $210 \text{ mg L}^{-1}$ , aumentou o teor de mentona, quando comparado com o das plantas cultivadas em solução completa. Esses resultados concordam com os do presente estudo, em que as plantas cultivadas com  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio apresentaram, ao longo do desenvolvimento, teor de mentona igual ou pouco maior que o das cultivadas com o nível completo e igual a  $160 \text{ mg L}^{-1}$ .

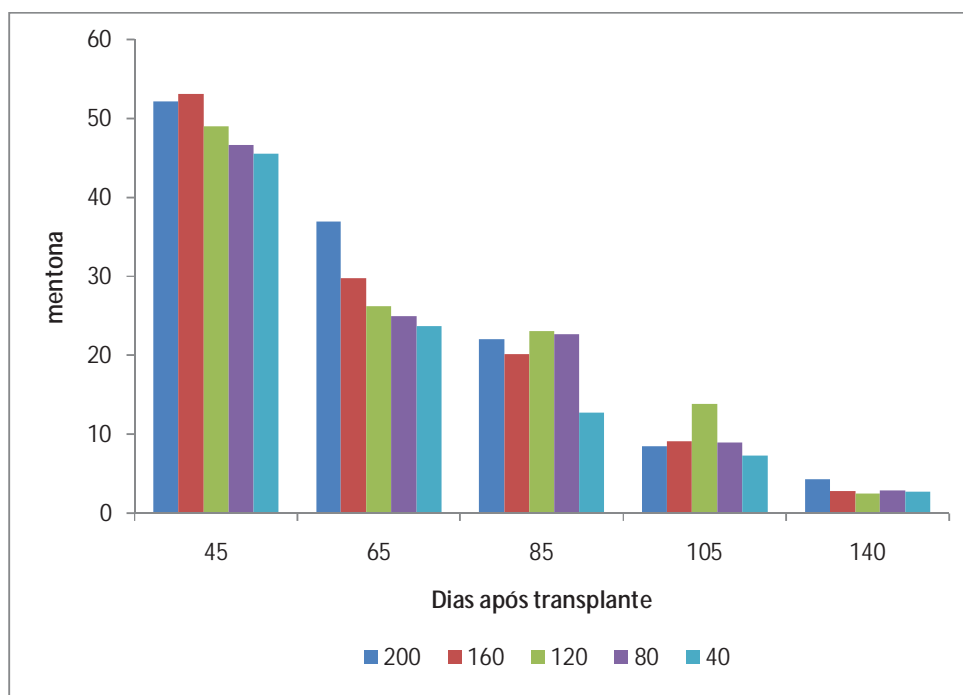
Embora os trabalhos acima citados tenham avaliado diferentes espécies de menta cultivada com variação de cálcio e nitrogênio, os resultados demonstram que níveis mais baixos e mais elevados dos minerais podem conduzir a alteração do teor de mentona.

No entanto, Valmorbidia et al. (2006) ao avaliarem a *M. piperita* cultivada em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon, concluíram que a espécie pode ser cultivada com redução de 50 a 75% do potássio recomendado na solução nutritiva, e iguais respectivamente a  $117,0$  e  $58,5 \text{ mg L}^{-1}$ , sem alteração do teor de mentona em seu óleo essencial.

**Tabela 13.** Comparação entre médias do teor de mentona, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	52,13 aA	36,91 aB	22,05 abC	8,52 bD	4,34 aE	24,79
160	53,06 aA	29,71 bB	20,18 bC	9,13 bD	2,79 aE	22,97
120	48,96 bA	26,21 cB	23,06 aC	13,79 aD	2,52 aE	22,91
80	46,65 cA	24,95 cB	22,68 aC	8,90 bD	2,95 aE	21,23
40	45,53 cA	23,68 cB	12,77 cC	7,30 bD	2,70 aE	18,40
<b>médias colheitas</b>	49,27	28,29	20,15	9,53	3,06	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 13.** Teor de mentona, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.

## **Mentofurano + neo-mentol**

A variação do teor de mentofurano + neo-mentol no óleo essencial de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 14.

O teor de mentofurano + neo-mentol durante o ciclo de desenvolvimento da menta, variou de maneira discreta com a utilização dos diferentes níveis de cálcio, e aumentou com o desenvolvimento das plantas, independente do nível de cálcio utilizado.

Tomando-se como referência o teor de mentofurano + neo-mentol das plantas cultivadas com  $160 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observam-se discretas diferenças nos teores de mentofurano + neo-mentol variáveis com os níveis de cálcio, na dependência da colheita em que a avaliação foi realizada. No entanto, aos 85 DAT o teor de mentofurano + neo-mentol foi menor nas plantas cultivadas com 40, 80 e  $120 \text{ mg L}^{-1}$ . Dessa forma, para a qualidade do óleo quando se considera seu teor de mentofurano + neo-mentol, a diminuição do nível de cálcio foi melhor.

Como o teor de neo-mentol está somado ao de mentofurano no presente estudo, é necessário considerar que os teores de mentofurano apresentados na figura 14 e tabela 14 são, na verdade, um pouco menores. Além disso, deve-se destacar que segundo Croteau et al. (2005) a formação de neo-mentol, a partir da mentona, trata-se de um processo reversível, podendo o neo-mentol voltar a ser mentona, e formar mentol.

Segundo Croteau et al. (2005) elevados teores de mentofurano reduzem a qualidade do óleo essencial, já que sua síntese desvia a rota de produção do mentol, interferindo em seu teor.

Não foram encontrados, na literatura consultada, trabalhos que avaliem a influência da variação do nível de cálcio no teor de mentofurano em menta.

Leal (2001) estudando *Mentha piperita* L. em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon com diferentes níveis de nitrogênio, concluiu que o nível de nitrogênio igual a  $263 \text{ mg L}^{-1}$ , acima daquele recomendado na solução completa e igual a  $210 \text{ mg L}^{-1}$  diminuiu a qualidade do óleo essencial, que apresentou maior teor de mentofurano. Valmorbidia et al. (2006) ao avaliarem a mesma espécie cultivada em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon, registraram que a redução do nível de potássio para 50 e 25% do nível proposto na solução completa, que contém  $234 \text{ mg L}^{-1}$ , não influenciou o teor de mentofurano das plantas de menta. David (2003) cultivando *Mentha piperita* em solução nutritiva, com variação do

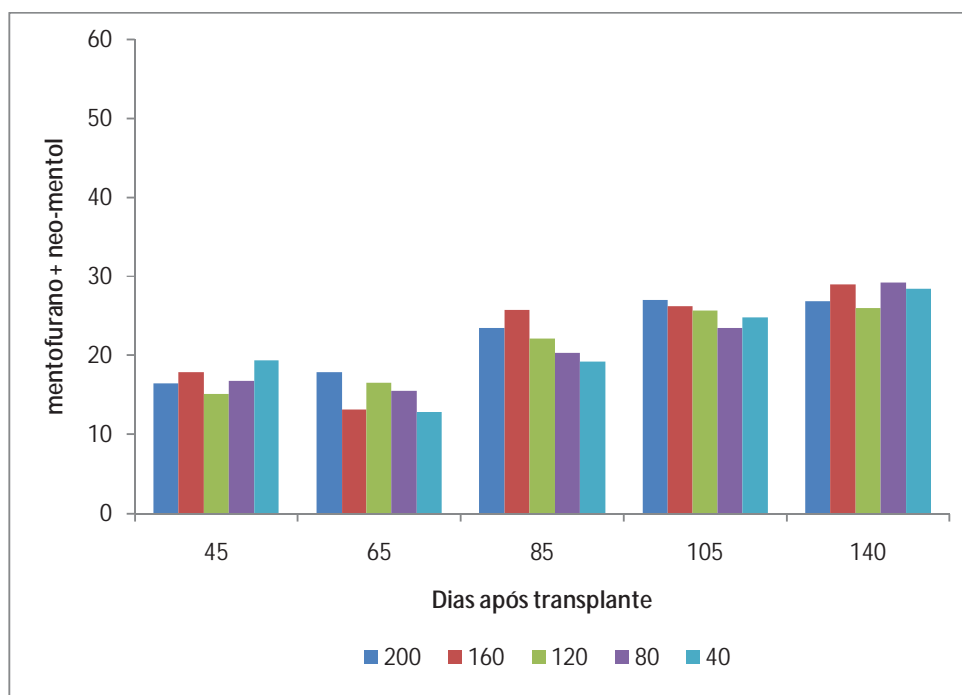
nível de fósforo, verificou que o cultivo das plantas com o menor nível e igual a  $57,5 \text{ mg L}^{-1}$  promoveu redução do teor de mentofurano. Os resultados do presente estudo, quando a menta foi cultivada com  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio, aos 85 DAT, e ocorreu redução do teor de mentofurano + neo-mentol, quando comparado ao das plantas cultivadas com o nível de cálcio completo e igual a  $160 \text{ mg L}^{-1}$ , estão em concordância com os de David (2003), ao cultivar menta com diminuição de fósforo.



**Tabela 14.** Comparação entre médias do teor de mentofurano + neo-mentol, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	16,49 abC	17,92 aC	23,49 abB	27,02 aA	26,87 abA	22,36
160	17,89 aC	13,14 bD	25,76 aB	26,20 aAB	29,01 aA	22,40
120	15,09 bC	16,57 aC	22,16 bcB	25,68 aA	25,98 bA	21,10
80	16,77 aD	15,56 abD	20,35 cC	23,47 bB	29,22 aA	21,08
40	19,40 aC	12,90 bD	19,28 cC	24,78 abB	28,40 aA	20,95
<b>médias colheitas</b>	17,13	15,22	22,21	25,43	27,90	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 14.** Teor de mentofurano + neo-mentol, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.

## Mentol

A variação do teor de mentol no óleo essencial de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 15.

O teor de mentol durante o ciclo de desenvolvimento da menta, manteve-se mais elevado, de maneira geral, nas plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, quando comparado com o daquelas cultivadas com 200 mg L<sup>-1</sup>, que apresentaram, de maneira geral, o menor teor desta substância. A partir dos 65 DAT os teores de mentol aumentaram nas plantas submetidas aos diferentes níveis de cálcio (figura 15).

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 15, revela que houve diferença do teor de mentol em todas as épocas de colheita. A partir dos 65 DAT as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram os maiores teores de mentol, enquanto aquelas cultivadas com 200 mg L<sup>-1</sup> deste nutriente apresentaram os menores teores.

Tomando-se como referência o teor de mentol das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que, a partir dos 65 DAT, o aumento do nível de cálcio na solução de cultivo foi prejudicial para a produção de mentol (tabela 15), provavelmente pelo elevado teor de pulegona produzido com a utilização dos maiores níveis de cálcio, em especial 200 mg L<sup>-1</sup>, a partir dos 85 DAT (figura 12). Considerando-se que as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram menor área foliar (figura 2) e matéria seca de lâminas foliares (figura 3), o maior teor de mentol pode ter ocorrido como resposta ao estresse causado pela baixa concentração de cálcio disponível na solução de cultivo. Segundo Taiz & Zeiger (2009), estresses nutricionais podem influenciar a composição química do óleo essencial, alterando o teor das substâncias que o compõem.

Croteau et al. (2005) relataram que elevados teores de mentol favorecem a qualidade do óleo essencial e dessa forma, no presente estudo, os níveis mais baixos de cálcio seriam favoráveis.

A influência da variação de cálcio na solução de cultivo, sobre o teor de mentol, foi avaliada por Maia et al. (2001) que, cultivando *Mentha arvensis* L. em solução nutritiva contendo 100, 200 (controle) e 400 mg L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> verificaram que o aumento do cálcio reduziu o teor de mentol, enquanto sua redução para 100 mg L<sup>-1</sup> elevou o teor desta substância. Os resultados do presente estudo concordam os obtidos por Maia et al. (2001), pois observou-se redução do teor de mentol quando as plantas foram cultivadas com 200 mg L<sup>-1</sup> de cálcio,

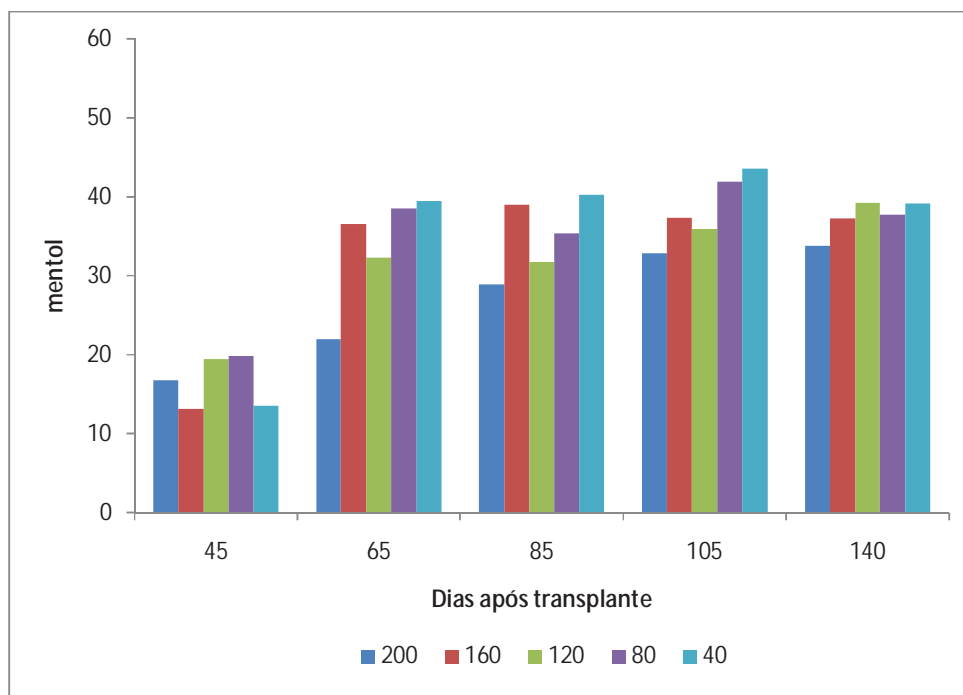
enquanto o cultivo com os menores níveis, em especial 40 e 80 mg L<sup>-1</sup> promoveu aumento no teor desta substância.

Outros estudos também foram realizados visando avaliar a influência da nutrição mineral no teor de mentol em plantas de menta. Entre eles, Leal (2001) trabalhando com *Mentha piperita* L., em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon com diferentes níveis de nitrogênio, concluiu que níveis de nitrogênio iguais a 263 e 315 mg L<sup>-1</sup>, acima daquele recomendado na solução completa e igual a 210 mg L<sup>-1</sup> interferiram com a qualidade do óleo essencial, que apresentou menor teor de mentol. David et al. (2006) trabalhando com a *Mentha piperita* L. em solução nutritiva contendo 31,0 mg L<sup>-1</sup> de fósforo, observaram que a redução de 50% do elemento, ou seja, 15,5 mg L<sup>-1</sup> na solução não foi deficiente para as plantas, com resultados satisfatórios para o teor de mentol. Valmorbidia et al. (2006) ao avaliarem a mesma espécie cultivada em solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon, concluíram que a menta pode ser cultivada com redução de 50 a 75% do potássio recomendado na solução nutritiva, e iguais respectivamente a 117,0 e 58,5 mg L<sup>-1</sup>, apresentando qualidade do óleo essencial, com elevado teor de mentol. Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os obtidos por Leal (2001), David et al. (2006) e Valmorbidia de al. (2006), pois a redução do nível de cálcio na solução de cultivo, em especial para 40 mg L<sup>-1</sup>, elevou o teor de mentol nas plantas de menta.

**Tabela 15.** Comparação entre médias do teor de mentol, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	16,80 abD	21,94 cC	28,92 cB	32,87 cA	33,78 bA	26,86
160	13,12 cB	36,57 aA	38,96 aA	37,26 bA	37,23 aA	32,63
120	19,47 aC	32,29 bB	31,76 cB	35,90 bcA	39,22 aA	31,73
80	19,79 aC	38,46 aAB	35,39 bB	41,88 aA	37,75 aB	34,66
40	13,52 bcC	39,41 aB	40,23 aAB	43,58 aA	39,17 aB	35,18
<b>médias colheitas</b>	16,54	33,73	35,05	38,30	37,43	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 15.** Teor de mentol, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.

## Acetato de mentila

A variação do teor de acetato de mentila no óleo essencial de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 16.

O teor de acetato de mentila durante o ciclo de desenvolvimento da menta aumentou, de maneira geral, nas plantas cultivadas com os diferentes níveis de cálcio. Esses resultados concordam com os obtidos por David (2003), que cultivou menta em solução nutritiva com variação de fósforo e discordam daqueles observados por Leal (2001) e Valmorbidia (2003), que cultivaram a espécie com variação, respectivamente, de nitrogênio e potássio na solução de cultivo.

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 16, revela que não houve diferença do teor de acetato de mentila aos 45 DAT. Aos 65 e 85 DAT, as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram os maiores teores de acetato de mentila, o que pode ser explicado pelos elevados teores de mentol nessas condições. Assim, essas plantas produziram o mentol e parte já foi degradada a acetato de mentila (Croteau et al., 2000).

Tomando-se como referência o teor de acetato de mentila das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que houve variação no comportamento das plantas cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, ao longo do ciclo de desenvolvimento, devendo ser destacado o aumento já referido aos 65 e 85 DAT para as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup>. Cumpre destacar ainda, que aos 85 DAT quanto maior o nível de cálcio utilizado para o cultivo das plantas, menor o teor de acetato de mentila (figura 16) e maior o teor de pulegona (figura 12).

O acetato de mentila é formado a partir da degradação do mentol (Croteau et al., 2000) e, portanto, o aumento do seu teor aos 140 DAT, no presente estudo, indica que esta época de colheita não é adequada para obtenção de óleo essencial de qualidade, pois o teor de mentol foi prejudicado.

Deve-se destacar que não foram encontrados, na literatura consultada, trabalhos que avaliem a influência da variação do nível de cálcio no teor de acetato de mentila em *M. piperita*.

No entanto, o estudo de David et al. (2006) avaliou a influência da variação de fósforo na produção de acetato de mentila em plantas de *M. piperita*. Os autores observaram que a

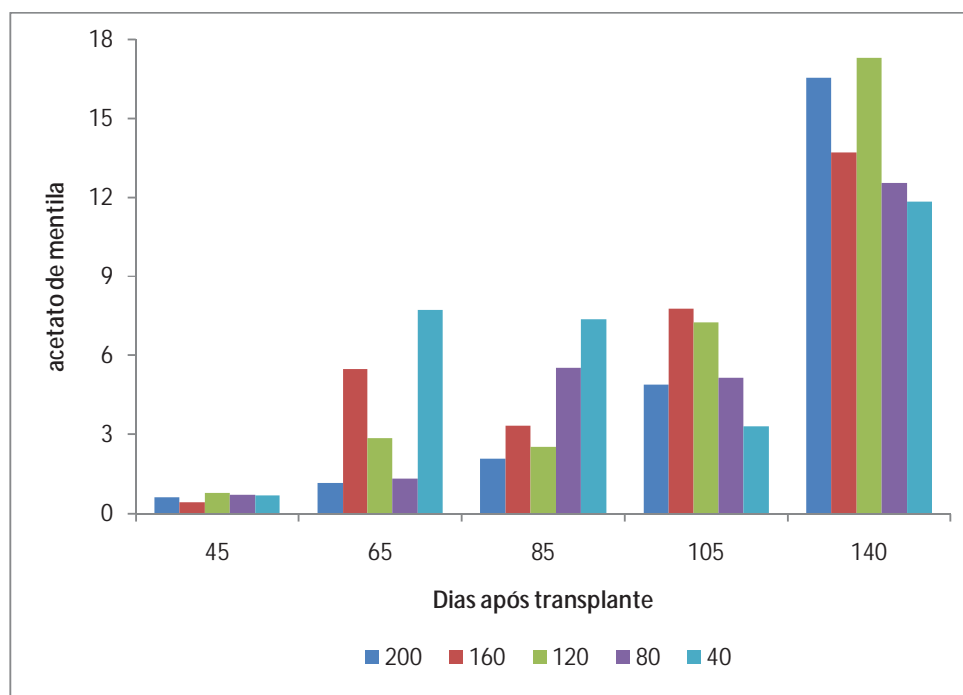
redução de fósforo para  $15,5 \text{ mg L}^{-1}$  não interferiu no teor de acetato de mentila das plantas de menta, quando comparado ao das plantas cultivadas com o nível completo e igual a  $31 \text{ mg L}^{-1}$ .

Os estudos demonstram que a variação dos componentes do óleo essencial de menta pode ocorrer de acordo com a época de avaliação, nutriente avaliado e seu nível na solução de cultivo.

**Tabela 16.** Comparação entre médias do teor de acetato de mentila, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	0,63 aD	1,16 dD	2,08 dC	4,88 bB	16,53 aA	5,06
160	0,42 aE	5,49 bC	3,34 cD	7,78 aB	13,69 bA	6,15
120	0,77 aD	2,87 cC	2,54 cdC	7,26 aB	17,30 aA	6,15
80	0,71 aD	1,33 dC	5,54 bB	5,16 bB	12,54 bcA	5,06
40	0,69 aD	7,73 aB	7,38 aB	3,30 cC	11,84 cA	6,19
<b>médias colheitas</b>	0,65	3,72	4,18	5,68	14,38	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 16.** Teor de acetato de mentila, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.

## 1,8-Cineol

A variação do teor de 1,8-cineol no óleo essencial de plantas de menta cultivadas com os diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, pode ser observada na figura 17.

O teor de 1,8-cineol, durante o desenvolvimento da menta, apresentou aumento quando as plantas foram cultivadas com os diferentes níveis de cálcio. Deve ser destacado que as plantas cultivadas com 80 mg L<sup>-1</sup> revelaram elevados teores desse componente durante todo o desenvolvimento, o que também foi verificado para as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup>, a partir dos 85 DAT.

A comparação de médias entre os tratamentos, que pode ser observada na tabela 17, revela que não houve diferença do teor de 1,8-cineol nas colheitas realizadas aos 105 e 140 DAT. Aos 85 DAT, as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram teor de 1,8-cineol igual ao das cultivadas com 120, 160 e 200 mg L<sup>-1</sup>.

Tomando-se como referência o teor de 1,8-cineol das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo, observa-se que a redução do nível de cálcio para 40 mg L<sup>-1</sup> manteve a produção de 1,8-cineol.

O 1,8-cineol é formado a partir do  $\alpha$ -terpineol por ação da enzima 1,8-cineol sintase (Kampranis et al, 2007) e, segundo Wise et al. (1998), apresenta propriedade antibacteriana, além de ser produzido pelas plantas como mecanismo de defesa contra ataque de pragas, patógenos e herbívoros.

Deve-se destacar que não foram encontrados, na literatura consultada, trabalhos que avaliem a influência da variação de cálcio no teor de 1,8-cineol de plantas medicinais e aromáticas.

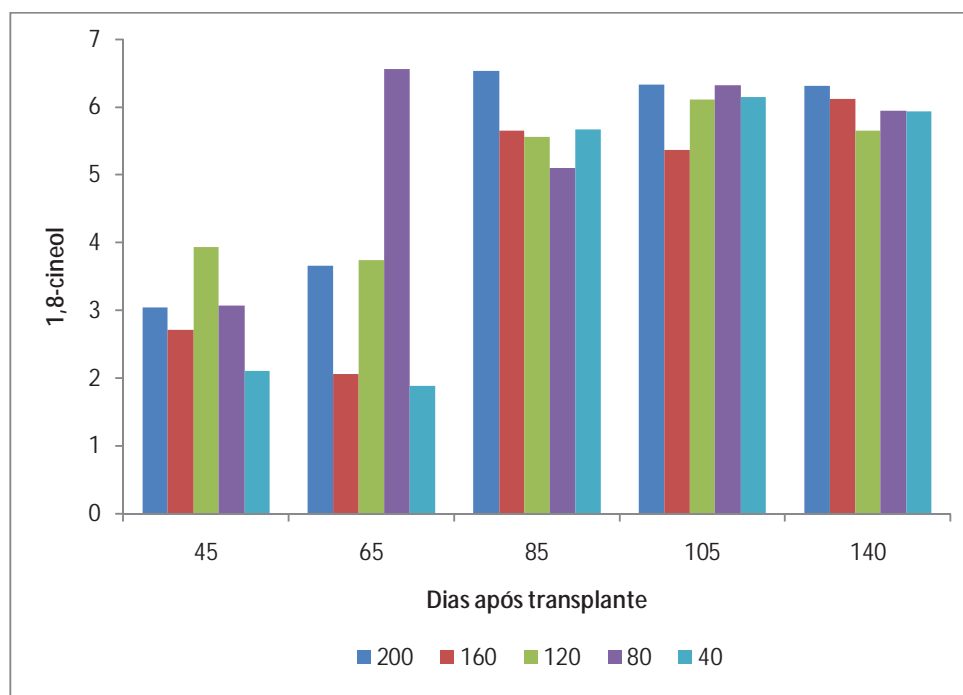
Valmorbida (2003) cultivando *M. piperita*, em solução nutritiva, com redução do nível de potássio para 50 e 75% e iguais a 117 e 58,5 mg L<sup>-1</sup>, verificaram que a variação deste nutriente na solução de cultivo não interferiu no teor de 1,8-cineol. Leal (2001) cultivando a mesma espécie, em solução nutritiva, com níveis de nitrogênio iguais a 210, 263 e 315 mg L<sup>-1</sup> relatou aumento do teor de 1,8-cineol com o desenvolvimento das plantas e maior teor desta substância quando as plantas foram cultivadas com 210 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio, correspondente ao nível completo. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os obtidos por Valmorbida (2003), aos 105 e 140 DAT, épocas em que a variação do nível de cálcio não influenciou o teor de 1,8-cineol e concordam com os resultados obtidos por Leal (2001) no que se refere ao aumento do teor desta substância ao longo do ciclo de desenvolvimento.



**Tabela 17.** Comparação entre médias do teor de 1,8-cineol, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo.

Níveis Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Colheitas (DAT)					médias níveis Ca <sup>2+</sup>
	45	65	85	105	140	
200	3,04 abB	3,66 bB	6,54 aA	6,33 aA	6,31 aA	5,18
160	2,71 bB	2,06 cB	5,65 aA	5,37 aA	6,12 aA	4,38
120	3,93 aB	3,74 bB	5,56 abA	6,11 aA	5,65 aA	5,00
80	3,07 aC	6,56 aA	5,10 bB	6,32 aA	5,95 aAB	5,40
40	2,11 bB	1,88 cB	5,67 aA	6,15 aA	5,93 aA	4,35
<b>médias colheitas</b>	2,97	3,58	5,70	6,06	5,99	

Letras maiúsculas nas linhas comparam diferenças entre épocas de colheita em cada nível de cálcio e minúsculas, nas colunas entre níveis de cálcio na época de colheita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 17.** Teor de 1,8-cineol, em %, de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, em mg L<sup>-1</sup>, nas diferentes épocas de colheita realizadas aos 45, 65, 85, 105 e 140 dias após o transplante (DAT) das mudas para a solução de cultivo. Médias de quatro repetições.

### **Avaliação do rendimento e composição química do óleo essencial, em seu conjunto**

Essa avaliação tem como referência o rendimento (figura 10 e tabela 9) e a composição química do óleo essencial (figuras 11 a 17 e tabelas 11 a 17) das plantas cultivadas com  $160 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo.

Dessa forma, o aumento do nível de cálcio para  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , correspondente a 25% acima do nível proposto na solução completa, não influenciou o rendimento de óleo essencial, o teor de limoneno e, de modo geral, também não influenciou o teor de mentofurano + neo-mentol. As plantas apresentaram elevados teores de pulegona, mentona e 1,8-cineol e menores teores acetato de mentila e mentol. Portanto, apesar das plantas cultivadas com este nível não apresentarem redução na quantidade do óleo essencial, sua qualidade foi prejudicada, devido aos elevados teores de pulegona e mentona e baixo teor de mentol.

A redução do nível de cálcio para  $120 \text{ mg L}^{-1}$ , correspondente a 75% do nível proposto na solução completa, não influenciou o rendimento de óleo essencial e o teor de limoneno. Essas plantas apresentaram óleo de qualidade aos 65 e 85 DAT, com teor elevado de mentol, intermediário de mentona e reduzido de mentofurano + neo-mentol.

O cultivo da menta com  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio não influenciou o rendimento de óleo e as plantas podem ser colhidas aos 65 ou 85 DAT, apresentando óleo de satisfatória qualidade, com teor elevado de mentol, intermediário de mentona e reduzido de mentofurano + neo-mentol. Porém, deve-se destacar que aos 65 DAT, o teor de acetato de mentila foi menor, indicando que o mentol ainda não havia sido degradado, o que pode ser favorável à colheita das plantas nessa época.

As plantas cultivadas com  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio apresentaram discreta redução no rendimento de óleo essencial e no teor de limoneno. O teor de 1,8-cineol não foi influenciado e o acetato de mentila aumentou de modo discreto. O elevado teor de mentol aos 65 DAT, o teor de mentona intermediário e o de mentofurano + neo-mentol reduzido é condição indicativa de óleo de qualidade satisfatória.

O desenvolvimento das plantas influenciou o rendimento e a composição química do óleo essencial de menta. No início do desenvolvimento, aos 45 DAT, as plantas apresentaram, de maneira geral, baixo rendimento de óleo, independente do nível de cálcio utilizado. Os teores de pulegona e mentona, de maneira geral, foram elevados e os de 1,8-cineol e mentol, baixos, o que talvez possa ser explicado devido a presença de folhas ainda jovens, que

produziram pouco mentol, o que pode ser confirmado pelo teor elevado de mentona e reduzido de acetato de mentila.

Aos 65 DAT, o rendimento de óleo se manteve próximo do obtido aos 45 DAT, porém, somente as plantas cultivadas com  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio não apresentaram óleo de qualidade, já que este apresentou elevado teor de mentona e baixo de mentol.

A partir dos 85 DAT, os teores de 1,8-cineol, mentol, mentofurano + neo-mentol, limoneno e o rendimento de óleo, de maneira geral, permaneceram constantes. Enquanto o teor de acetato de mentila, de maneira geral, aumentou com a idade das plantas, os de pulegona e mentona, diminuíram. Deve-se destacar que os elevados teores de acetato de mentila e de mentofurano + neo-mentol e o baixo teor de mentona, aos 140 DAT, sugerem que esta época não é a mais adequada para a colheita da menta, quando se busca satisfatório rendimento e qualidade de óleo. Os teores de seus componentes, não condizem com os estabelecidos para qualidade do óleo de menta, que segundo Croteau et al. (2005) são elevado teor de mentol, intermediário de mentona e reduzido de mentofurano e acetato de mentila (Croteau et al., 2000).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Mentha piperita* foi cultivada por De Fazio (2007), em solução nutritiva contendo 160, 80 e 16 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, respectivamente, nível completo de cálcio e sua redução para 50% e para 10% na solução de cultivo e pulverizadas com 0, 100, 200 e 400 mg L<sup>-1</sup> de ethephon. Ao avaliar as plantas submetidas aos diferentes níveis de cálcio e não pulverizadas com ethephon, observou-se que as plantas cultivadas com 80 mg L<sup>-1</sup> de cálcio apresentaram desenvolvimento e rendimento de óleo essencial próximos aos das cultivadas com o nível completo de cálcio e igual a 160 mg L<sup>-1</sup>. Já as plantas cultivadas com o menor nível de cálcio e igual a 16 mg L<sup>-1</sup>, apresentaram drástica redução no desenvolvimento e no rendimento de óleo essencial, pois a parte aérea dessas plantas apresentou pequeno desenvolvimento. Nelas, as folhas mostraram sinais de deficiência de cálcio, tornando-se cloróticas, pequenas e com as bordas queimadas. As raízes ficaram curtas e acastanhadas e o ápice caulinar morreu, devido a baixa disponibilidade de cálcio na solução de cultivo, levando assim, ao surgimento de novas brotações que também morriam pouco depois.

Com base no estudo realizado por De Fazio (2007), verificou-se a necessidade de avaliar o cálcio, sem a interação com ethephon, e em níveis intermediários entre 160 e 40 mg L<sup>-1</sup>, uma vez que o nível de 30 mg L<sup>-1</sup> foi definido insuficiente para *M. crispata*, em estudo prévio (De Fazio et al., 2005), visando definir a concentração mínima de cálcio, na solução de cultivo, que possibilite o desenvolvimento da menta, sem manifestação de deficiência nutricional e com quantidade e qualidade satisfatória de seu óleo essencial. Além disso, a avaliação de um nível acima do completo poderá auxiliar o estudo do metabolismo do cálcio.

Essa avaliação tem como referência os índices fisiológicos (figuras 2 a 4 e tabelas 1 a 3), as trocas gasosas (figuras 5 a 9 e tabelas 4 a 8) e o rendimento e composição química do óleo essencial (figuras 10 a 17 e tabelas 9, 11 a 17), das plantas cultivadas com 160 mg L<sup>-1</sup> de cálcio, que corresponde ao nível completo do nutriente na solução de cultivo.

Dessa forma, o nível de cálcio igual a 200 mg L<sup>-1</sup> aumentou as variáveis área foliar, matéria seca de lâminas foliares e matéria seca total, a partir dos 105 DAT. Esse nível não influenciou a assimilação de CO<sub>2</sub>, a transpiração e a condutância estomática, revelando variações na concentração interna de CO<sub>2</sub> e eficiência do uso da água. Assim, enquanto aos 65 DAT verificou-se aumento da concentração interna de CO<sub>2</sub> e diminuição da eficiência, aos 85 DAT, essa relação inverteu. Além disso, não influenciou o rendimento de óleo essencial, o teor de limoneno e, de modo geral, também não influenciou o teor de mentofurano + neo-

mentol. As plantas apresentaram elevados teores de pulegona, mentona e 1,8-cineol e menores teores acetato de mentila e mentol. Portanto, apesar do cultivo com  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio ter aumentado área foliar e matéria seca no final do desenvolvimento, sem interferir com a assimilação de  $\text{CO}_2$  e rendimento de óleo, este nível, diminuiu a qualidade do óleo, que apresentou elevados teores de pulegona e mentona e baixo teor de mentol.

A redução de cálcio para  $120 \text{ mg L}^{-1}$  elevou a área foliar no início do desenvolvimento e diminuiu no final. Embora, de maneira geral, tenha elevado a matéria seca de lâminas foliares e diminuído a matéria seca total, não influenciou a assimilação de  $\text{CO}_2$ , a transpiração e a condutância estomática, revelando poucas vezes nas avaliações realizadas, discretas diferenças de concentração interna de  $\text{CO}_2$  e eficiência do uso da água. Além disso, não influenciou o rendimento de óleo essencial e o teor de limoneno. Essas plantas apresentaram óleo de qualidade aos 65 e 85 DAT, com teor elevado de mentol, intermediário de mentona e reduzido de mentofurano + neo-mentol.

O cultivo da menta com  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio permitiu seu adequado desenvolvimento até os 85 DAT e as plantas apresentaram elevada área foliar, matéria seca de lâminas foliares e matéria seca total. No entanto, no final do desenvolvimento  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio não foram suficientes para manter os índices fisiológicos. Esse nível não influenciou a assimilação de  $\text{CO}_2$ , transpiração e condutância estomática e, embora tenham sido observadas discretas variações de concentração interna de  $\text{CO}_2$ , foram essas as plantas que apresentaram a melhor eficiência de uso da água. O rendimento de óleo não foi influenciado e as plantas podem ser colhidas aos 65 ou 85 DAT, apresentando óleo de satisfatória qualidade, com teor elevado de mentol, intermediário de mentona e reduzido de mentofurano + neo-mentol. Porém, deve-se destacar que aos 65 DAT, o teor de acetato de mentila foi menor, indicando que o mentol ainda não havia sido degradado, o que pode ser favorável à colheita das plantas nessa época.

As plantas cultivadas com  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de cálcio apresentaram diminuição de área foliar e matéria seca ao longo do desenvolvimento e, embora não tenha sido alterada a transpiração, na última avaliação houve diminuição da assimilação de  $\text{CO}_2$ , da condutância estomática, apresentando em média, menor concentração interna de  $\text{CO}_2$  e eficiência de uso da água. Esse nível reduziu de maneira discreta o rendimento de óleo essencial e o teor de limoneno, não influenciou o teor de 1,8-cineol e aumentou de modo discreto o acetato de mentila. O elevado teor de mentol aos 65 DAT, o teor de mentona intermediário e o de mentofurano + neo-mentol reduzido é condição indicativa de óleo de qualidade satisfatória.

Portanto, com base nessa avaliação conjunta, pode-se recomendar o cultivo da menta com níveis de cálcio iguais a 40 e 80 mg L<sup>-1</sup>, quando se busca plantas com quantidade e qualidade satisfatórias de óleo essencial. Para o atendimento dessas condições as plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> devem ser colhidas aos 65 DAT e aquelas com 80 mg L<sup>-1</sup>, aos 65 ou 85 DAT. No entanto, deve ser destacado o melhor desenvolvimento de área foliar e matéria seca das plantas cultivadas com 80 mg L<sup>-1</sup>.

No entanto, quando se objetiva elevado teor de mentol, independente do desenvolvimento da planta e do seu rendimento e qualidade de óleo, a menta pode ser cultivada com 40 mg L<sup>-1</sup> de cálcio e colhida aos 85, 105 e 140 DAT.

A colheita realizada aos 45 DAT revelou rendimento e composição insatisfatórios do óleo essencial e as plantas ainda jovens e pouco desenvolvidas produziram pouco óleo, que continha elevado teor de mentona e baixo teor de mentol.

Aos 105 e 140 DAT, apesar das plantas apresentarem elevada produção de matéria seca e adequado rendimento de óleo, a sua qualidade foi prejudicada, devido ao teor elevado de mentofurano + neo-mentol quando comparado ao de mentona. Além disso, aos 140 DAT as plantas revelaram elevado teor de acetato de mentila, indicativo de degradação do mentol.

## CONCLUSÕES

O cultivo da *Mentha piperita*, em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio, nas várias épocas de colheita, permitiu concluir que:

1. Os índices fisiológicos foram influenciados pela variação do nível de cálcio na solução de cultivo. O aumento de cálcio foi benéfico para desenvolvimento de área foliar e produção de matéria seca no final do desenvolvimento.
2. Níveis de cálcio abaixo do utilizado na solução nutritiva completa, ou acima dele, influenciaram de modo discreto as trocas gasosas.
3. A variação de cálcio na solução nutritiva influenciou de modo discreto o rendimento de óleo essencial, interferindo com a sua composição química, que também variou com o desenvolvimento da espécie.
4. Óleo essencial de menta em quantidade adequada e com qualidade satisfatória pode ser obtido com o seu cultivo em solução contendo 40 e 80 mg L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>. As plantas cultivadas com 40 mg L<sup>-1</sup> devem ser colhidas aos 65 DAT e aquelas com 80 mg L<sup>-1</sup>, aos 65 ou 85 DAT.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995. 468p.
- ADDOR, R.W. Inseticida. In: GODFREY, C.R.A. (Ed.). **Agrochemicals from natural products**. New York: Marcel Dekker, 1994.
- AMARO, A.C.E. **Efeitos fisiológicos de fungicidas no desenvolvimento de plantas de pepino japonês enxertadas e não enxertadas, cultivadas em ambiente protegido**. 2011. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011
- ANDERSEN, R.A.; HAMILTON-KEMP, T.R.; HILDEBRAND, D.F.; McCracken, C.T.Jr.; COLLINS, R.W.; FLEMING, P.D. Structure-antifungal activity relationships among volatile C6 and C9 aliphatic aldehydes, ketones, and alcohols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1563-1568, 1994.
- ARIMURA, G.; OZAWA, R.; KUGIMIYA, S.; TAKABAYASHI, J.; BOHLMANN, J. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)-beta-ocimene and transcript accumulation of (E)-beta-ocimene synthase in *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1976-1983, 2004.
- ATKINSON, C.J.; MANSFIELD, T.A.; KEAN, A.M.; DAVIES, W.J. Control of stomatal aperture by calcium in isolated epidermal tissue and whole leaves of *Commelina communis* L. **New Phytologisty**, v. 111, p. 9-17, 1989.
- BERRY, J.A.; DOWNTON, W.J.S. Environmental regulation of photosynthesis. Site-specific effects of osmotically induced stromal acidification. **Plant Physiology**, v.72, p. 1100-1109, 1983.



- BERTEA, C.M.; SCHALK, M.; KARP, F.; MAFFEI, M.; CROTEAU, R. Demonstration that menthofuran synthase of mint (*Mentha*) is a cytochrome P450 monooxygenase: cloning, functional expression, and characterization of the responsible gene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 390, n. 2, p. 279-286, 2001.
- BETHKE, P.C.; GILROY, S.; JONES, R.L. Calcium and plant hormone action. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. 2.ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. Chap. D5, p. 298-317.
- BRADFIELD, E.G.; GUTTRIDGE, C.G. Effects of night-time humidity and nutrient solution concentration on the calcium content of tomato fruit. **Sci. Hortic.**, v. 22, p. 207-217, 1984.
- BRUN, N.; COLSON, M.; PERRIN, A.; VOIRIN, B. Chemical and morphological studies of the effects of ageing on monoterpene composition in *Mentha x piperita* leaves. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 10, p. 2271-2278, 1991.
- BUENO, M.A.S. **Níveis de fósforo no desenvolvimento e produção de óleo essencial de *Thymus vulgaris* L., cultivado em solução nutritiva**. 2004. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BÚFALO, J. **Efeito alelopático de extrato de *Leonurus sibiricus* L. em *Mentha piperita* L. Desenvolvimento, trocas gasosas e metabólitos secundários**. 2011. 103 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
- BUSH, D.S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 46, p. 95-122, 1995.
- CAEMMERER, S.V.; FARQUHAR, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, v. 153, n. 4, p. 376-387, 1981.

- CARMELLO, Q.A.C. Hidroponia. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 20, 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” – CENA, 1992, p. 355-68.
- CERIMELE, E. e RINGUELET, J.A. Aspectos agronômicos da produção de espécies aromáticas. In: BANDONI, A.L. e CZEPAK, M.P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores.** Vitória, ES: EDUFES, 2008. 623p.
- CLELAND, R.E.; VIRK, S.S.; TAYLOR, D.; BJORKMAN, T. Calcium, cell walls and growth. **Am. Soc. Plant Physiol. Symp. Ser.**, v. 4, p. 9-16, 1990.
- COLLIER, G.F.; HUNTINGTON, V.C. The relationship between leaf growth, calcium accumulation and distribution, and tipburn development in field-grown butterhead lettuce. **Sci. Hortic.**, v. 21, p. 123-128, 1983.
- CROTEAU, R.B.; DAVIS, E.M.; RINGER, K.L.; WILDUNG, M.R. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. **Naturwissenschaften**, v. 92, p. 562-577, 2005.
- CROTEAU, R.B.; GERSHENZON, J.; TURNER, W.G. Development of peltate glandular trichomes of peppermint. **Plant Physiology**, v. 124, p. 665-679, 2000.
- DANTAS, J.P.; BERGAMIN FILHO, H.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a nutrição mineral do feijão macassar (*Vigna sinensis* (L.) Endl.), IV. Exigências de macro e micronutrientes. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”**, São Paulo, v. 36, p. 425-433, 1979.
- DAVID, E.F.S. **Desenvolvimento, trocas gasosas, rendimento e composição de óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com variação dos níveis de N, P, K e Mg.** 2007. 132 p. Tese (Doutorado em Agronomia (Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

- DAVID, E.F.S. **Níveis de fósforo no desenvolvimento e produção de óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva.** 2003. 159 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- DAVID, E.F.S.; MISCHAN, M.M.; BOARO, C.S.F. Desenvolvimento e rendimento de óleo essencial de menta (*Mentha piperita* L.) cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. **Biotemas**, v. 20, p. 15-26, 2007.
- DAVID, E.F.S.; BOARO, C.S.F.; MARQUES, M.O.M. Rendimento e composição do óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. **Rev. Bras. Plantas Med.** v.8, p. 183-188, 2006.
- DE FAZIO, J.L. **Cálcio e ethephon no desenvolvimento e produção de óleo essencial de menta (*Mentha piperita* L.), cultivada em solução nutritiva.** 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- DE FAZIO, J.L.; BARREIRO, A.P.; FERRARI, T.B.; BONAMIN, F., BOARO, C.S.F. Análise de crescimento de hortelã (*Mentha crispa* L.) submetida a diferentes níveis de cálcio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 10., CONGRESSO LATINO AMERICANO DE FISILOGIA VEGETAL, 12., 2005, Recife. **Anais...** Recife, 2005. 1CD-ROM.
- DE FAZIO, J.L.; ZUCARELI, V.; BOARO, C.S.F. Desenvolvimento de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de cálcio. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 420-422, 2007.
- DEGEN, T.; DILLMANN, C.; MARION-POLL, F.; TURLINGS, T.C.J. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. **Plant Physiol.**, v. 135, n. 4, p. 1928-1938, 2004.

- DeMORAES, C.M.; MESCHER, M.C.; TUMLINSON, J.H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 577-580, 2001.
- DICKE, M.; VAN LOON, J.J.A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 97, n. 3, p. 237-249, 2000.
- DUDAREVA, N.; MARTIN, D.; KISH, C.M.; KOLOSOVA, N.; GORENSTEIN, N.; FALDT, J.; MILLER, B.; BOHLMANN, J. (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. **Plant Cell**, v. 15, n. 5, p. 1227-1241, 2003.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiol.**, v. 135, n. 4, p. 1893-1902, 2004.
- ENGELBERTH, J.; ALBORN, H.T.; SCHMELZ, E.A.; TUMLINSON, J.H. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 6, p. 1781-1785, 2004.
- EPSTEIN, E. & BLOOM, A.J. **Nutrição Mineral de Plantas: princípios e perspectivas**. 2 ed. Londrina: Planta, 2006. 403p.
- FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; JONES, C.A. Field Crops and mineral nutrition. In... **Growth and mineral nutrition of field crops**. 2nd edition, revised and expanded. Printed in the United States of American. 1997. p.1-10.
- FERRARI, T.B.; DE FAZIO, J.L.; BARREIRO, A.P.; CAMILLI, L.; BOARO, C.S.F. Desenvolvimento de hortelã (*Mentha crispa* L.) submetida a diferentes níveis de cálcio em solução nutritiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 10., CONGRESSO LATINO AMERICANO DE FISILOGIA VEGETAL, 12., 2005, Recife. **Anais**. Recife, 2005. 1CD-ROM.

- FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, Cap. 7, p. 123-146. 2004.
- FURLANI, P.R. **Instruções para o cultivo de hortaliças de folhas pela técnica de hidroponia**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, v. 168, p. 1-30, 1998.
- GERSHENZON, J.; McCONKEY, M.E.; CROTEAU, R.B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiol.**, v. 122, p. 205-213, 2000.
- GHANOTAKIS, D.F.; YOCUM, C.F. Photosystem II and the oxygenevolving complex. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 41, p. 255-276, 1990.
- GOTTILIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIN, M.R. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1996, 286p.
- GRATTAN, S.R.; GRIEVES, C.M. Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. In: PESSADRAKLI, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 203-206.
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 4, p. 853-860, 2003.
- HARBORNE, J.B. Alkaloids and other toxins of lupin. **Toxic factors in crop plants – Proceedings of the second spring conference**, 1991, p. 95-103.
- HAWKINS, H.J.; LEWIS, O.A. Effect of NaCl salinity, nitrogen form, calcium and potassium concentration on nitrogen uptake and kinetics in *Triticum aestivum* L. cv. Gamtoos. **New Phytol.**, v. 124, p.171-177, 1993.
- HEPLER, P.K. Calcium: a central regulator of plant growth and development. **Plant Cell**, v. 17, p. 2142-2155, 2005.

- HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes**. Sunderland: Sinauer Assoc., 1992. 607p.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water:** culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32p.
- HOBALLAH, M.E.; GUBITZ, T.; STURMAN, J.; BROGER, L.; BARONE, M.; MANDEL, T.; DELL'OLIVO, A.; ARNOLD, M.; KUHLEMEIER, C. Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. **Plant Cell**, v. 19, n. 3, p. 779-790, 2007.
- HUTERWALL. **Hidroponia, Cultivo de plantas sin tierra**. Buenos Aires: Albatros, 251 p. 1986.
- JAIN, R.; CHOWDHRY, L.; CHATTERJEE, C. Influence of calcium on growth, composition and yield of black gram (*Vigna mungo* L.). **Indian J. Plant Physiol.**, v. 2, n. 3, p. 221-224. 1997.
- JOLY, A.B. **Botânica:** introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. 777p.
- KAMPRANIS, S.C. et al. Rational Conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: structural insights into the evolution of terpene synthase function. **The Plant Cell**, v. 19, p. 1994-2005, 2007.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, v. 291, n. 5511, p. 2141-2144, 2001.
- KIM, M.C.; CHUNG, W.S.; YUN, D.J.; CHO, M.J. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. **Molecular Plant**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 2009.

- KNOBLOCK, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, M.; VIGENSCHOW, H. Action of terpenoids on energy metabolism. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da plantas ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Cap. 18, p. 473-474, 2003.
- KNUDSEN, J.T.; TOLLSTEN, L.; BERSTOM, L.G. Floral scents – a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. **Phytochemistry**, v. 33, n. 2, p. 253-280, 1993.
- KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 313-349, 1991.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2006. 550p.
- LEAL, F.P. **Desenvolvimento, produção e composição de óleo essencial da *Mentha piperita* L., cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de nitrogênio**. 2001. 148 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- LIMA, A.R.; MOLLAN, T.R.M. Nova variedade de *Mentha arvensis* L. **Bragantia**, v. 12, p. 277-284, 1952.
- LOPES, A.S. **Manual internacional de fertilidade do solo**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1998. 177p.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- LORETO, F.; PINELLI, P.; MANES, F.; KOLLIST, H. Impacto of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. **Tree Physiol.**, v. 24, n. 4, p. 361-367, 2004.

- LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiol.**, v. 127, n. 4, p. 1781-1787, 2001.
- MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14481-14486, 2003.
- MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p. 8915-8920, 2001.
- MAIA, N.B. Efeito da nutrição mineral na qualidade do óleo essencial da menta (*Mentha arvensis* L.) cultivada em solução nutritiva. In: MING, L.C. et al. (Coord.). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares, avanços na pesquisa agronômica**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, v. 2, p. 81-85, 1998.
- MAIA, N.B.; BOVI, O.A.; MARQUES, M.O.M.; GRANJA, N.doP.; CARMELLO, Q.A.C. Essential oil production and quality of *Mentha arvensis* L. grown in nutrient solution. **Acta Horticulturae**, v. 548, p. 181-187, 2001.
- MAIRAPETYAN, S.K. Aromatic plant culture in open – air hidroponics. **Acta Hort.**, Wageningen, n. 502, p.33-36, 1999.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. 2ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.



MARTINS, E.R. Estudos em *Ocimum selloi* Benth.: isoenzimas, morfologia e óleo essencial. In: MING, L.C.; SCHEFFER, M.C.; CORREA JUNIOR, C.; BARROS, I.B.I.; MATTOS, J.K.A (Coords.). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agronômica**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, 1998. v. 2, p. 97-125.

McCONKEY, M.E.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R.B. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. **Plant Physiol.**, v. 122, n. 1, p. 215-223, 2000.

McLafferty, F.W.; Stauffer, D.B. **The Wiley / NBS Registry of Matter Spectral Data**. New York: Wiley, 1989.

MERCKE, P.; KAPPERS, I.F.; VERSTAPPEN, F.W.A.; VORST, O.; DICKE, M.; BOUWMEESTER, H.J. Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. **Plant Physiol.**, v. 135, n. 4, p. 2012-2024, 2004.

MILLAWAY, R.M.; WIERSHOLM, L. Calcium and metabolic disorders. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v. 10, n. 1-2, p. 1-28, 1979.

MILTHORPE, F.L.; MOORBY, J. **An introduction to crop physiology**. London: Cambridge University Press, 1974.

MOLLER, I.M.; JOHNSTON, S.P.; PALMER, J.M. A specific role for Ca<sup>2+</sup> in the oxidation of exogenous NADH by Jerusalem-artichoke (*Helianthus tuberosus*) mitochondria. **Biochemistry**, v. 194, p. 487-495, 1981.

MOTHES, K. Historical introduction. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da plantas ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Cap. 18, p. 473-474, 2003.

- PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura. Departamento de Economia Rural. **Aspectos da cultura da menta no Paraná**. Curitiba, 1976. 39p.
- RABAK, F. The effect of cultural and climatic conditione on the yield and quality of peppermint oil. **Bull. Plant Ind.**, Washington, n. 80, p. 450-454, 1977.
- RAMALHO, J.C.; REBELO, M.C.; SANTOS, M.E.; ANTUNES, M.L.; NUNES, M.A. Effects of calcium deficiency on *Coffea arabica*. Nutrient changes and correlation of calcium levels with some photosynthetic parameters. **Plant and Soil**, v. 172, p. 87-96, 1995.
- RECH, J.C.; FRIZZO, C.D.; SERAFINI, L.A. Composição química do óleo essencial de menta (Italo-Mitchan) cultivada no sul do Brasil e no Uruguai. In: Simpósio Latino-Americano de Produção de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, São Pedro. Suplemento... Brasília: UNESP. p. 1008-1009, 2000.
- REINHARD, J.; SRINIVASAN, M.V.; GUEZ, D.; ZHANG, S.W. Floral scents induce recall of navigational and visual memories in honeybees. **J. Exp. Biol.**, v. 207, n. 25, p. 4371-4381, 2004.
- RENGEL, Z. Role of calcium in aluminium toxicity. **New Phytol.**, v. 121, p.499-513, 1992.
- RIOS-ESTEPA, R. et al. A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpenoid essential oil composition in peppermint. **PNAS**, v. 105, n. 8, p. 2818-2823, 2008.
- ROBERTS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.
- RODRIGUES, J.D.; RODRIGUES, S.D.; PEDRAS, J.F.; DELACHIAVE, M.E.A.; BOARO, C.S.F.; ONO, E.O. Diferentes níveis de cálcio e o desenvolvimento de plantas de estilosantes (*Stylosanthes guyanensis* (AUBL.) SW. CV "COOK"). **Sci. Agric.**, Piracicaba, v.50, n.2, p. 166-175, 1993.

- ROSOLEM, C.A. Interações do potássio com outros íons. In: **Potássio na agricultura brasileira**. Anais do simpósio sobre potássio na agricultura brasileira. Ed. Tsuioshi Yamada e Terry L. Roberts, Piracicaba, 2005. Capítulo 9, p. 239-256.
- SALISBURY, L.Y.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4.ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.
- SANTOS *et al.* Diferentes concentrações de solução nutritiva para a cultura de alfavaca (*Ocimum basilicum*) em sistema de cultivo hidropônico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42., 2002, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: Sociedade de Olericultura do Brasil, 2002. 1 CD-ROM.
- SAS/STAT User's Guide. In: SAS INSTITUTE. **SAS OnlineDoc. Version 8.1**. Cary, 2000.
- SHARKEY, T.D.; BADGER, M.R.; von CAEMMERER, S.; ANDREWS, T.J. Increased heat sensitivity of photosynthesis in tobacco plants with reduced Rubisco activase. **Photosynthesis Research**, v. 67, n. 1-2, p. 147-156, 2001.
- SHARKEY, T.D.; YEH, S.S. Isoprene emission from plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 407-436, 2001.
- SILVA, F., CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa: Arte Livros, 2000. 135p.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. p. 467-495.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

- SPRING, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. **Advances in Botanical Research**, v. 31, p. 153-174, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- TOPALOV, V.; ZHELJAZKOV, V. Effect of harvesting on the yield of fresh material, essential oil, and planting material from *Mentha piperita* L. and *Mentha arvensis* L.. **Herba Hung.**, v. 50, p. 60-67, 1991.
- TREWAVAS, A. Le calcium c'est la vie. Calcium makes waves. **Plant Physiol.**, v.118, p.1-6, 1999.
- TURNER, G.W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R.B. Development of peltate glandular trichomes of peppermint. **Plant Physiol.**, v. 124, n. 2, p. 665-679, 2000.
- VALMORBIDA, J. et al. Crescimento de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes doses de potássio. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 9, p. 27-31, 2007.
- VALMORBIDA, J. **Níveis de potássio em solução nutritiva, desenvolvimento de plantas e a produção de óleo essencial de *Mentha piperita* L.** 2003. 128 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- VALMORBIDA, J.; BOARO, C.S.F. Growth and development of *Mentha piperita* L. in nutrient solution as affected by rates of potassium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 379-384, 2007.
- VALMORBIDA, J.; BOARO, C.S.F.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva em diferentes concentrações de potássio. **Rev. Bras. Plantas Med.** v.8, p. 56-61, 2006.

- VANCANNEYT, G.; SANZ, C.; FARMAKI, T.; PANEQUE, M.; ORTEGO, F.; CASTANERA, P.; SANCHEZ-SERRANO, J.J. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 14, p. 8139-8144, 2001.
- VERDONK, J.C.; HARING, M.A.; van TUNEN, A.J.; SCHUURINK, R.C. ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. **Plant Cell**, v. 17, n. 5, p. 1612-1624, 2005.
- VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. Macmillan Press. Hong Kong, 1981.
- VOIRIN, B.; BRUN, N.; BAYET, C. Effects of daylength on the monoterpene composition of leaves of *Mentha x piperita*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 3, p. 749-755, 1990.
- WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. (ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990.
- WISE, M.L.; SAVAGE, T.J.; KATAHIRA, E.; CROTEAU, R.B. Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*). **The journal of biological chemistry**, v. 273, n. 24, p. 14891-14899, 1998.
- YANG, Z. Signal transducing proteins in plants: an overview. In: VERMA, D.P.S. (Ed.). **Signal transduction in plant growth and development**. New York: Springer-Verlag, 1996. p. 1-37.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. Englewood Cliffs: prentice-Hall, 1999. 718p.