

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS CURSO
DE AGRONOMIA

Aline Daiane Balão

**Desenvolvimento do protocolo de micropropagação de poejo menta-pulégio (*Mentha
pulegium* L.)**

CURITIBANOS

2023

Aline Daiane Balão

**Desenvolvimento do protocolo de micropropagação de poejo menta-pulégio (*Mentha
pulegium* L.)**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Agronomia Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia

Orientador: Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco

Curitibanos

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Balão, Aline Daiane

Desenvolvimento do protocolo de micropropagação de poejo
menta-pulégio (*Mentha pulegium* L.) / Aline Daiane Balão ;
orientador, Lirio Luiz Dal Vesco, 2023.

43 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2023.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Agronomia. 3. Micropropagação. 4.
Mentha pulegium. 5. Aclimatização. I. Dal Vesco, Lirio Luiz
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-4174 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

ALINE DAIANE BALÃO

Desenvolvimento do protocolo de micropropagação de poejo menta-pulégio (*Mentha pulegium* L.)

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Engenheiro Agrônomo” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 01 de junho de 2023.



Documento assinado digitalmente
Douglas Adams Weiler
Data: 14/06/2023 15:36:17-0300
CPF: ***.111.820-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Douglas Adams Weiler
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
Lírio Luiz Dal Vesco
Data: 14/06/2023 14:58:04-0300
CPF: ***.824.819-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Adriana Terumi Itako
Data: 14/06/2023 16:49:20-0300
CPF: ***.130.099-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Dra. Adriana Terumi Itako,
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Elis Borcioni
Data: 15/06/2023 08:38:41-0300
CPF: ***.176.390-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Dra. Elis Borcioni,
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

*Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e
os seus planos serão bem-sucedidos.*

Provérbios 16:3

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, o qual eu recorri incansavelmente em todos os momentos difíceis da minha vida e nunca fui desamparada. Grata por ter me dado forças, coragem, sabedoria durante todo esse percurso. Graças a Ele estou conseguindo realizar esse sonho.

Aos meus pais, Mauro Balão e Luci Mari M. Balão, pelo constante incentivo, apoio, paciência, carinho, encorajamento e principalmente por todo suporte fornecido. Meus professores de uma vida toda.

Ao meu irmão Jean Balão, minha cunhada Jéssica Engel, e meus sobrinhos Jorge Balão e Valentina Balão por tornarem a minha vida mais completa e feliz.

Ao meu orientador Dr. Prof. Lírio Luiz Dal Vesco, pela oportunidade e confiança na realização desse trabalho. Pelo suporte, correções, incentivos e ensinamentos transmitidos durante minha jornada nesta universidade.

A todos os professores da UFSC- Campus Curitibanos, especialmente aos membros da minha banca, Profa. Dra. Elis Borcioni e Profa. Dra. Adriana Terumi Itako, por todos os ensinamentos transmitidos para minha formação profissional.

Aos técnicos Renata Schmidt e Gabriel F. Olivo, pela prestatividade e apoio que tornaram a rotina mais leve e agradável.

As minhas amigas Taila Wendt e Patrícia Pereira, Rosana Griten, Sandrielle Karvat por todo incentivo, apoio, carinho e compreensão, vocês são a família que a vida me permitiu escolher.

A todos meus amigos da faculdade, em especial a Andressa Telma, Bruna Pereira, Dalila Ascari. Obrigada por estarem comigo nos momentos de alegria e tristeza.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado, saibam que foram essenciais para o meu engrandecimento pessoal e profissional.

RESUMO

A espécie *Mentha pulegium* conhecida popularmente por poejo, possui inúmeras características benéficas como antissépticas, medicinais, alimentícias e cosméticas. Multiplica-se facilmente por estacas de ramos, rizomas e eventualmente por sementes. A micropropagação, caracterizase por ser um método que vem se difundindo entre as técnicas de propagação, além de promover rápida multiplicação, garante boa sanidade e uniformidade das mudas. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação de *M. pulegium*, baseado na organogênese direta, utilizando diferentes fitorreguladores além de avaliar diferentes substratos na aclimatização *ex vitro* das mudas. Para o estabelecimento *in vitro* segmentos nodais, utilizados como explantes, foram desinfestados em soluções com Tween 20; imersão em álcool (70%); imersão em hipoclorito de sódio (1%) e; três enxágues em água tipo 2 e autoclavada, sempre sob agitação. Após a assepsia, efetuou-se a excisão das extremidades, com o intuito de retirar as partes com necroses e uniformizar o tamanho dos segmentos nodais e a inoculação em diferentes meios de cultura. Foram efetuados dois ensaios sucessivos, a fim de superar os problemas de contaminação *in vitro*. Para o estabelecimento e a indução *in vitro* testou-se utilizando um delineamento inteiramente casualizado (DIC), o meio MS, suplementados com fitorreguladores ANA (0 e 1 μM) em combinação com BAP (0 e 1 μM). Avaliações semanais foram efetuadas para coletar dados de porcentagem de sobrevivência, de contaminação, de indução de brotos e de calo. Para a multiplicação *in vitro*, foi utilizado um fatorial 2x3, testando o meio de cultura básico MS, suplementados com diferentes concentrações dos fitorreguladores ANA (0 e 2 μM) em combinação com BAP (0; 2 e 4 μM). Quinzenalmente, foram coletados dados de números de brotos, de nós e raízes e altura das brotações. Brotações alongadas, de 5 cm e 3 cm, foram submetidas ao processo de aclimatização em ambiente *ex vitro*, com o transplante em diferentes substratos comerciais, contendo casca de pinus, casca de arroz, turfa e vermiculita. Dados de números de brotos e nós, altura de plantas, tiveram avaliações quinzenais aos 15, 30 e 45 dias, formação e tamanho de raízes foram coletados somente na última avaliação aos 45 dias. Na fase de indução, foi possível observar que o meio de cultura MS isento de fitorreguladores, destacou-se no parâmetro altura, não havendo diferença estatística entre os demais parâmetros. Na fase de multiplicação *in vitro* em concentrações de 2 μM e 4 μM de BAP, bem como, 2 μM de BAP + 2 μM de ANA, suplementados ao meio básico MS, resultou nos melhores valores de número de brotos, de nós e altura das brotações. Não havendo diferença estatística para formação de raízes em nenhum tratamento. Brotações de 5 cm em substrato Turfa fértil® e Turfa fértil® mais Carolina soil® se sobressaíram em todos os parâmetros em relação aos demais substratos utilizados.

Palavras chaves: Aclimatização, cultivo *in vitro*, organogênese, substratos.

ABSTRACT

The *Mentha pulegium* species, popularly known as pennyroyal, has numerous beneficial characteristics such as antiseptic, medicinal, food and cosmetics. Multiplied by branch cuttings, rhizomes and eventually by seeds. Micropropagation, characterized by being a method that has been spreading among propagation techniques, in addition to promoting rapid multiplication, guarantees good health and uniformity of the seedlings. This work aimed to establish a micropropagation protocol for *M. pulegium*, based on direct organogenesis, using different phytohormones, in addition to evaluating different substrates in the *ex vitro* acclimatization of seedlings. For the *in vitro* establishment nodal segments, used as explants, were disinfested in solutions with Tween 20; immersion in alcohol (70%); immersion in sodium hypochlorite (1%) and; three rinses in type 2 water and autoclaved, quickly and always under agitation. After asepsis, the extremities were excised in order to remove the parts with necrosis and to standardize the size of the nodal segments and inoculation in different culture media. Two successive tests were carried out in order to overcome the problems of *in vitro* contamination. For *in vitro* establishment and induction, a completely randomized design (CRD) was tested using MS medium, supplemented with NAA phytohormones (0 and 1 μM) in combination with BAP (0 and 1 μM). Weekly evaluations were carried out to collect data on percentage of survival, contamination, shoot induction and callus. For *in vitro* multiplication, a 2x3 factorial was used, testing the MS basic culture medium, supplemented with different concentrations of NAA phytohormones (0 and 2 μM) in combination with BAP (0; 2 and 4 μM). Biweekly, data were collected on the number of shoots, nodes and roots, and height of shoots. Elongated shoots, measuring 5 cm and 3 cm, were submitted to the acclimatization process in an *ex vitro* environment, with transplantation in different commercial substrates, containing pine bark, rice husk, peat and vermiculite. Data on numbers of shoots and nodes, plant height, were evaluated fortnightly at 15, 30 and 45 days, formation and size of roots were collected only in the last evaluation at 45 days. In the induction phase, it was possible to observe that the MS culture medium free of phytohormones stood out in the height parameter, with no statistical difference between the other parameters. In the *in vitro* multiplication phase at concentrations of 2 μM and 4 μM of BAP, as well as 2 μM of BAP + 2 μM of NAA, supplemented with basic MS medium, resulted in the best values for number of shoots, nodes and height of shoots. There was no statistical difference for root formation in any treatment. Shootings of 5 cm in substrate Turfa fértil® and Turfa fértil® plus Carolina soil® excelled in all parameters in relation to the other substrates used.

Keywords: Acclimatization, *in vitro* culture, organogenesis, substrates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estabelecimento das culturas <i>in vitro</i> de <i>Mentha pulegium</i>	23
Figura 2 - Composição de diferentes substratos comerciais	25
Figura 3 - Procedimento de aclimatização de mudas de <i>Mentha pulegium</i>	26
Figura 4- Estabelecimento e indução <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais de <i>Mentha pulegium</i> no primeiro ensaio.	29
Figura 5. Porcentagem média de sobrevivência e contaminações (fungos e bactérias) <i>in vitro</i> em resposta aos dois ensaios sucessivos, a partir de segmentos nodais de <i>Mentha pulegium</i> . .	29
Figura 6 - Processo de indução de brotos <i>in vitro</i> em <i>Mentha pulegium</i> , em diferentes meios de cultura, em diferentes tempos após a inoculação, no segundo ensaio.	30
Figura 7 - Porcentagem média de indução <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais de <i>Mentha pulegium</i> após primeira e quarta semana de cultivo	31
Figura 8 – Evolução, pela análise de regressão, da indução <i>in vitro</i> de brotos de <i>Mentha pulegium</i>	33
Figura 9 - Porcentagem de indução de calos em <i>Mentha pulegium</i> em relação aos diferentes meios de cultivo	33
Figura 10 - Multiplicação de brotos <i>in vitro</i> de <i>Mentha pulegium</i> em diferentes meios de cultura	34
Figura 11 - Evolução, pela análise de regressão, da multiplicação <i>in vitro</i> de brotos de <i>Mentha pulegium</i>	35
Figura 12 - Resultados obtidos durante o processo de aclimatização de <i>Mentha pulegium</i> aos 45 dias após transplante	37
Figura 13 - Altura média (cm) das mudas em relação aos diferentes substratos, durante o processo de aclimatização de <i>Mentha pulegium</i>	38
Figura 14 - Número médio de brotos em relação aos diferentes substratos ambiente <i>ex vitro</i> .	39
Figura 15 -Número e tamanho de raízes das mudas de <i>Mentha pulegium</i> , em relação aos diferentes substratos.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Abreviaturas dos meios de cultura elaborado.....	24
Tabela 2 - Valores médios de número de brotos, de nós e de raízes e altura (cm) na indução <i>in vitro</i> de brotos de <i>Mentha pulegium</i>	31
Tabela 3 - Número médios de brotos, de nós, de raízes e altura média (cm) dos brotos no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Mentha pulegium</i>	34
Tabela 4 - Valores médios de número de brotos, de nós e de raízes, altura de mudas (cm) e tamanho de raízes (cm) das mudas aclimatizadas de <i>Mentha pulegium</i> em diferentes substratos	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA: ácido 1-naftalenoacético

BAP: 6-benzilaminopurina

MS: meio básico da formulação salina de Murashige e Skoog (1962).

μM: concentração em micro molar

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

ANOVA: Análise de Variância

NaOH: Hidróxido de Sódio

HCl: Ácido Clorídrico

TF = Turfa fértil MP

= MecPlant

C= Carolina soil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo geral.....	14
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
1.2	JUSTIFICATIVA	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	DESCRIÇÃO BOTÂNICA E UTILIZAÇÃO	16
2.2	PROPAGAÇÃO	17
2.3	TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO	17
2.4	ACLIMATIZAÇÃO	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	MATERIAL VEGETAL, AMBIENTE DE CULTIVO E LOCALIZAÇÃO.....	21
3.2	ENSAIOS DE ESTABELECIMENTO E INDUÇÃO <i>IN VITRO</i>	21
3.2.1	Preparação do meio de cultivo para a indução dos explantes	21
3.2.2	Coleta e desinfestação dos explantes	22
3.3	ENSAIO DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	23
3.4	ENSAIO DE ACLIMATIZAÇÃO EM AMBIENTE <i>EX VITRO</i>	25
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1	ESTABELECIMENTO E INDUÇÃO DE BROTAÇÕES	28
4.2	MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	33
4.3	ACLIMATIZAÇÃO	36
5	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Mentha* da família Lamiaceae abrange mais de 1000 espécies pelo mundo, entre eles *M. x piperita* L. (hortelã pimenta), *M. spicata* (hortelã verde), *M. arvensis* (hortelã doce), *M. pulegium* (poejo menta-pulégio) entre outras. A hortelã verde e hortelã pimenta, são as mais cultivadas no Brasil (WATANABE *et al.*, 2006). Muitas espécies da família Lamiaceae são conhecidas pela produção de inúmeros metabólitos secundários de interesse econômico pela qualidade do óleo essencial (BENLARBI *et al.*, 2014), para fins terapêuticos e condimentares.

A espécie *M. pulegium*, também conhecida como poejo, poejo menta-pulégio, menta selvagem entre outras, é uma erva rasteira, de folhas e flores pequenas (LORENZI; MATOS, 2021). Prefere locais com alta umidade e de solo ácidos, planta de clima temperado, não resiste a geadas e ao calor excessivo (GUEDES, 2015; MATHIAS *et al.*, 2013). Podem ser propagadas por rizomas, segmentos de ramos (estaquias), sementes ou pelo método de micropropagação por segmentos nodais e gemas apicais (BENLARBI *et al.* 2014; ZARKI; ELMTILI, 2012).

As plantas apresentam características antissépticas, sendo tradicionalmente utilizada na forma de chás ou misturas para infusões, para o tratamento de uma série de doenças desde resfriados comuns até sinusite, bronquite, tuberculose, intoxicação alimentar e cólera. Pode ser usada também como antiflatulento, expectorante, antitussígeno e diurético (MAHBOUBI; HAGHI, 2008). Na gastronomia é utilizada como tempero em saladas, decorações de pratos, aromatizar sucos naturais e também é utilizado na fabricação de licor, que auxilia na digestão e combate a constipação (MATHIAS; BLANCO, 2013).

A utilização na forma de óleo essencial, vem crescendo cada vez mais no mercado de aromaterapia. *M. pulegium* é uma planta muito visada, uma vez que, caracteriza-se por conter alto conteúdo de óleo essencial, aproximadamente 4% do peso seco (BENLARBI *et al.*, 2014). Apresenta como principal componente a pulegona acompanhado de mentol, isomentona, flavonóides, fósforo, ferro, magnésio, cálcio, potássio, cobre, ômega 3, e complexo vitamínico entre outros, porém, pode haver diferença de composição química entre plantas de diferentes climas e habitats (AYAZ; MENON, 2021; BENLARBI *et al.*, 2014; LORENZI; MATOS, 2021; MONTENEGRO *et al.*, 2020; WATANABE *et al.*, 2006). Contudo deve-se ficar atento aos efeitos colaterais do óleo essencial pois doses acima de 10mL/humano pode ser tóxico causando hepatotoxicidade, insuficiência cardiovascular (DOMINGUES; SANTOS, 2019) e para gestantes pode ser abortivo (BENLARBI *et al.*, 2014). Estima-se uma extração anual de óleo essencial de *M. pulegium* de 7,0 toneladas no Marrocos e 3,0 toneladas na Espanha e Turquia (DOMINGUES; SANTOS, 2019).

Além disso, há uma forma bastante promissora para uso desta planta rica em pulegona e mentol, os biocidas. Desta forma, uma alternativa e ecológica que vem sendo estudada é a utilização de extratos ou óleos essenciais, para controlar fungos, bactérias, leveduras, ácaros, nematoides, pragas e até mesmo plantas daninhas (MONTENEGRO *et al.*, 2020). Segundo Domingues e Santos (2019) os biocidas apresentam a mesma eficácia que os pesticidas sintéticos, porém com menor toxicidade a mamíferos, e menor permanência no ambiente, em contrapartida devem ser aplicadas constantemente, através de métodos de fumigação (casa de vegetação), pulverizações ou uso em armadilhas no caso de insetos. Por outro lado, um uso curioso e inovador do óleo essencial de *M. pulegium* é a proteção do aço através do seu efeito inibidor de corrosão.

Devido todas as propriedades benéficas dessa planta aromática e medicinal, a demanda por produção da mesma vem aumentando (GUEDES, 2015). A comercialização ocorre geralmente por vendas diretas ao consumidor final, em feiras livres e pequeno varejo. Porém, já existem casos de venda em maiores quantidades para grandes empresas, a exemplo das fabricantes de óleos essenciais (MATHIAS; BLANCO, 2013). Nesse último caso há uma exigência maior em qualidade da matéria prima e estrutura da propriedade. Nesse momento destaca-se a micropropagação estabelecendo mudas homogêneas em larga escala, de alto vigor, sadias de alta qualidade fitossanitária livres de pragas e doenças assim como mudas com alta competência em metabolitos secundários (MORAIS *et al.*, 2012; ZARKI; ELMTILI, 2012).

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a capacidade de regeneração *in vitro* de *M. pulegium* em diferentes doses dos fitoreguladores BAP (6- Benzilaminopurina) e ANA (ácido α -naftalenoacético), utilizando segmentos nodais. Buscou-se determinar as concentrações de BAP e ANA mais responsivas para a regeneração de brotos e avaliar a aclimatização das brotações regenerados em diferentes misturas de substratos comerciais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação de *Mentha pulegium*, baseado na organogênese direta, utilizando diferentes fitoreguladores.

1.1.2 Objetivos específicos

Extrair e desinfestar segmentos nodais a partir de plantas matrizes para o estabelecimento *in vitro*;

Promover a multiplicação de brotações utilizando diferentes concentrações e combinações dos fitorreguladores BAP e ANA em meio de cultura;

Avaliar aclimatização *ex vitro* das mudas em diferentes misturas de substratos comerciais.

1.2 JUSTIFICATIVA

A espécie *M. pulegium* é uma erva aromática e medicinal, largamente utilizada na forma de chás/misturas para infusões, na culinária, na indústria de medicamentos, de alimentos (bala, chicletes, etc). Amplamente aceita na fabricação de cosméticos, repelentes, óleos essenciais e os atuais biocidas. Tudo isso ocorre devido a qualidade do óleo essencial da planta em ser rico em pulegona e mentol, principais metabólitos secundários extraídos para uso industrial (BENLARBI *et al.*, 2014, GUEDES, 2015).

Devido essa alta demanda de mercado nos diversos usos, a propagação *in vitro* tornase viável produzindo em larga escala, mudas sadias de alta qualidade fitossanitária e fisiológica, possibilitado uma plantação uniforme com possibilidade de colheita padronizada.

Além do mais a micropropagação pode ser uma forma de conservação de germoplasma da planta, protegendo da colheita excessiva e das intempéries climáticas, do ponto de vista que a planta não tolera geadas nem calor excessivo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA E UTILIZAÇÃO

A espécie *Mentha pulegium* L. pertence à família Lamiaceae, no Brasil essa família consta com 26 gêneros e mais de 350 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). No entanto, mundialmente, esta família contém aproximadamente 7.300 espécies, distribuídas em 236 gêneros (ANTAR *et al.*, 2020). Além disto, na espécie *M. pulegium*, de acordo com The Plant List (2013) esta espécie possui 41 diferentes subespécies, variedades ou formas. Não é uma planta típica do Brasil, porém, com distribuição geográfica e possíveis ocorrências em todas as regiões brasileiras (ANTAR; HARLEY, 2020). É nativa da Europa, Ásia e Península Arábica, no entanto é cultivada em todos os países temperados (LORENZI; MATOS, 2021)

Popularmente pode ser conhecida como, poejo, poejo menta-pulégio, poejo das hortas, hortelã-dos-pulmões, poejo-real, poejinho, menta selvagem, erva de São Lourenço ou hortelãpimenta (GUEDES, 2015; LORENZI; MATOS, 2021).

Erva rasteira, perene e de crescimento prostrado, seu tamanho varia até 10 cm, possuindo muitas raízes rizomatosas. É uma planta bastante ramificada, e seu caule tem formato quadrangular recoberto por indumentos. As folhas são pequenas (aproximadamente 1 cm de comprimento), e estão dispostas opostamente ao longo do caule, apresentam formato elípticooblôngas, podem ser dentadas ou lisas, pilosas ao menos na parte abaxial, seu pecíolo é curto, são bastante aromáticas e sua cor varia entre diferentes tons de verde. As flores da *M. pulegium* são minúsculas de coloração rosa ou roxo pálido, se dispõem em inflorescência globosas nas axilas das plantas com entre nós visíveis (GUEDES, 2015; LORENZI; MATOS, 2021). São plantas que preferem locais com água abundante, de alta umidade, próximos a cursos fluviais, lagoas, locais de alagamento temporário. Além disso, se adaptam melhor em solos mais ácidos (GUEDES, 2015).

A planta pode ser amplamente utilizada, na forma de chá utilizando as folhas, na gastronomia pode ser usado ramos e flores, nas indústrias alimentícias e de cosméticos (MATHIAS; BLANCO, 2013). Na área de extração de óleo usa-se as folhas. O método de extração de óleo mais indicado para *M. pulegium* é a hidrodestilação em aparelho de Clevenger (AMARAL, 2020; DOMINGUES; SANTOS, 2019). Além do mais vem sendo estudada como biocidas no controle de pragas, através de controle populacional afetando na fase larval de alguns insetos, em fungos como *Monilinia sp* e *Botrytis cinerea* em frutíferas, como acaricidas, controlador de plantas daninhas e nematoides. (DOMINGUES; SANTOS, 2019).

2.2 PROPAGAÇÃO

Os métodos de propagação das espécies do gênero *Mentha* comumente é através dos rizomas e segmentos de ramos. Estes devem ser cortados com aproximadamente 10 centímetros, e plantados direto em canteiros ou recipientes para obtenção de mudas. Estes propágulos devem ser enterrados em uma profundidade de 2 a 3 centímetros e manter a umidade do solo para promover o enraizamento e desenvolvimento das mudas (MATHIAS; BLANCO, 2013). De acordo com estes autores, as mudas devem ser produzidas na época do ano que as temperaturas sejam amenas, pois o poejo é uma planta adaptada ao clima subtropical e temperado, não tolerando geadas severas ou calor excessivo. É indicado a produção das mudas em locais sombreados, sem a incidência direta do sol.

Além da propagação por estacas vegetativas e através de estolões pode ser realizado a produção de mudas por sementes, porém, elas apresentam baixa germinação e viabilidade, conforme as condições de clima do local de cultivo (GUEDES, 2015). Ademais, a propagação pode ser realizada através da micropropagação, garantindo mudas de qualidade e favorecendo a produção de mudas em larga escala em qualquer época do ano, com economia de espaço e tempo, permitindo a uniformidade no desenvolvimento das mudas no campo e possibilitando a sincronização da colheita (PAULETTI, 2005)

2.3 TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação é um método de propagação vegetal e está inserida dentro da cultura de tecidos. Possibilita obter várias plantas a partir de um único explante inicial. (BARRUETO CID, 2015). Os explantes recebem a nutrição necessária, através de meio de cultivo. Essa técnica é possível devido a potencialidade celular, ou seja, a capacidade de uma célula formar outros tecidos vegetais. Quando uma célula é capaz de formar todas as células que compõe um organismo denominamos de totipotencialidade, se ela formar alguns tecidos e outros não, ela é considerada pluripotente e quando é capaz de formar apenas um tipo de tecido exclusivo chamamos de unipotentes (PAIVA, *et al.*, 2001).

Outro fundamento essencial para desenvolvimento da cultura de tecidos é a competência celular, capacidade de as células formar novos tipos de células, através de sinais específicos, essa habilidade pode ser dada por: ativação (modelo direto) indução (modelo indireto). O modelo direto forma clones da planta, mantendo sua identidade genética, enquanto

que o indireto produz uma massa calo, podendo haver variações genéticas no material produzido (PAIVA, *et al.*, 2001).

Essa tecnologia vem sendo usada nos últimos tempos pois se mostra eficaz na formação de plantas livres de agentes causadores de doenças, a exemplo dos vírus. Também se mostra vantajosa na propagação massal de mudas de alta uniformidade, além de produzir em condições independentes das condições climáticas. Por fim, pode-se ter aplicabilidade na conservação do germoplasma por longos períodos (JUNGHANS; ALBERTO; OLIVEIRA, 2013).

O processo de regeneração *in vitro* ocorre por duas rotas distintas, a embriogênese somática e a organogênese. A embriogênese somática é a formação de embriões somáticos que se diferenciam a partir de células somáticas. A indução através dessa rota pode ser feita de diversos tipos de tecidos das plantas, levando em consideração o genótipo, idade, determinação existentes no meristema, condições fisiológicas estacionais, estabilidade genética, metabolismos oxidativo, entre outros fatores relacionados a planta matriz (BARRUETO CID, 2015; CAMPOS, 2019).

Esse processo de formação de embrião somático pode ocorrer de maneira direta, onde ele é formado diretamente a partir do explante, e a forma indireta com formações de calos no explante primário. A maneira direta ocorre devido as células do tecido utilizado serem competentes e/ou pré-embrionárias, facilitando todas as etapas do processo. Quando a rota é embriogênese somática indireta, ocorre uma sequência de desdiferenciação celular de forma a reorganizar o metabolismo e sua expressão genica do embrião. Em alguns casos nessa rota são utilizadas algumas auxinas fortes como é o caso do 2,4D para ajudar na formação de calos. (BARRUETO CID, 2015; CAMPOS, 2019).

Ao tratarmos de organogênese, dizemos que é o processo de regeneração da planta através de tecidos meristemáticos (agrupamentos de células meristemáticas com alta capacidade de divisão e diferenciação). Tecidos de diversas partes das plantas podem ser usadas nessa rota, como gemas apicais e axilares, segmentos nodais, segmentos de raízes, discos basais entre outros. Assim como na embriogênese somática na organogênese também temos processos diretos e indiretos. Na organogênese direta o órgão vegetal, que contém gemas pré-existentes, forma-se diretamente resultando clones. Ao passo que a indireta há formação de calos antes do desenvolvimento dos brotos (ANDRADE, 2002; BARRUETO CID, 2015).

Para realizarmos a micropropagação das plantas, necessitamos de um meio de cultivo adequado nas fases de indução e multiplicação. Os meios de cultivo buscam suprir as exigências

nutricionais do explante para obter a resposta da morfogênese desejada. Assim como, fornecer suporte na medida que a brotação vai se desenvolvendo (CARVALHO *et al.*, 2006). Entre os meios de culturas temos, os semissólidos, o líquido e a dupla fase. Para sua composição é utilizado: a água filtrada e destilada para não conter impurezas; os nutrientes minerais como o Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Enxofre, Cálcio, Magnésio, Ferro, Boro, Molibdênio, Cobre, Cloro, Zinco, Manganês e Cobalto; os constituintes orgânicos como o carboidrato (fonte de energia), os aminoácidos, vitaminas que são essenciais para o metabolismo celular. Alguns compostos como agente geleificantes e carvão ativado podem ou não ser utilizados dependendo do meio de cultura (CARVALHO *et al.*, 2006; GUERRA *et al.*, 2016). A composição do meio também é ditada pela espécie que será micropopagada, pois cada uma possui exigências exclusivas para seu desenvolvimento. O meio MS de Murashige e Skoog (1962) é muito utilizado na cultura de tecidos e demonstra bons resultados na maioria das culturas (PAIVA *et al.*, 2001). De acordo com Zarki e Elmtili (2012) os macrosais de MS são eficazes para a maioria das espécies medicinais.

Há alguns meios nutritivos que recebem os chamados fitorreguladores, substâncias sintéticas, compostas por hormônios vegetais. São utilizadas para influenciar positivamente ou negativamente no desenvolvimento da planta. Além disso os fitorreguladores podem influenciar no aroma, na formação de metabolitos secundários, alterar quimiotipos assim como inibir ou eliminar a formação de substâncias indesejáveis. (LYCZKO *et al.*, 2020). Entre eles estão as auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Para o experimento foram utilizados dois fitorreguladores, um indutor de brotos e outro indutor de raízes, tanto na etapa de indução quanto multiplicação. (CARVALHO *et al.*, 2006)

O BAP (6-Benzilaminopurina) é uma citocinina, e na cultura de tecidos vegetais tem a função de induzir microbrotos, porém podem inibir a formação de raízes. Além disso está ligada a outras respostas na planta como abertura de estômatos, quebra de dominância apical, expansão foliaraumento de conteúdo de clorofilas. (BARRUETO CID, 2015).

O ANA (ácido α -naftalenoacético) é uma auxina, e atua principalmente na formação de raízes em segmento nodais e também em estacas. (CAMPOS, 2009). Além disso, apresentam funções como alongamento celular, divisão celular, diferenciação dos tecidos vasculares (xilema e floema), dominância apical. (MORAIS *et al.*, 2012).

2.4 ACLIMATIZAÇÃO

Após os processos realizados em laboratório inicia-se a etapa de adaptação das futuras mudas cultivadas *in vitro* para as condições do ambiente externo, *ex vitro*. Neste estágio, há a necessidade de mudanças anatômicas-fisiológicas para a sobrevivência, etapa da qual é denominada de aclimatização. Porém, para obter êxito nessa etapa devem ser considerados alguns fatores: como temperatura, umidade em excesso, baixa capacidade fotossintética, desidratação (falta de umidade) e absorção de nutrientes. (CARVALHO *et al.*, 2006; SKREBSKY; NICOLOSO; FERRÃO, 2004).

Outro fator que deve ser considerado é a utilização de substratos comerciais ou misturas. O substrato comercial é muito utilizado na fase de aclimatização de plântulas, principalmente por ser um material descontaminado. É um material poroso, nutritivo, que substitui o solo, sendo muito utilizado no processo germinação ou cultivo de plantas. (ARAÚJO NETO *et al.*, 2009).

Considerando o enraizamento e desenvolvimento das plantas a escolha de qual substrato utilizar deve ser cautelosa, pois há variação nas suas características físicas e químicas. Um substrato ideal deve passar por processo de limpeza e descontaminação afim de que não apresentem agentes fitopatogênicos e sementes de plantas indesejáveis. Além de apresentar características físicas, químicas e pH, favoráveis para o bom desenvolvimento da planta. Portanto, é difícil encontrar em um único substrato comercial todas essas características, para isso são feitas misturas com diferentes compostos orgânicos, tais como casca de arroz, casca de pinus, partículas de carvão vegetal, etc. (ARAÚJO NETO *et al.*, 2009).

O substrato contendo casca de pinus, é mais denso e menos poroso, logo deve ser usado com cautela. Geralmente apresenta alta capacidade de retenção de água e baixa porosidade podendo ocasionar falta de oxigênio e problemas na formação das raízes devido à má drenagem. Já o substrato contendo casca de arroz em sua composição possui alta porosidade e baixa densidade quando comparada com casca de pinus. Portanto, ao utilizar esse material deve-se ficar atento a irrigação pois a retenção de água é menor e pode causar déficit hídrico as plantas. A formulação de misturas entre diferentes materiais resultam em propriedades diferentes das encontradas nos materiais de origem (ZORZETO *et al.*, 2014).

3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 MATERIAL VEGETAL, AMBIENTE DE CULTIVO E LOCALIZAÇÃO

As plantas matrizes de *M. pulegium* cultivadas em vasos (Fig. 1A), mantidas em ambiente de casa de vegetação aclimatizada no primeiro ensaio, e em ambiente de laboratório no segundo ensaio serviram de fonte de explantes para a introdução *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Curitibanos, situada a uma latitude de 27°16'58" sul e uma longitude de 50°35'04" oeste, sua altitude é de 1100 metros.

As duas primeiras etapas do experimento foram desenvolvidas no laboratório de Biotecnologia Vegetal, no qual, foi possível realizar a indução e multiplicação das brotações, nos períodos de fevereiro e abril de 2023.

O meio de cultura básico utilizado no cultivo *in vitro* foi composto pela formulação salina MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionados de 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,5 g L⁻¹ de Agar-agar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, a 1,3 atm., por 15 minutos. O processo de inoculação das culturas foi realizado em uma câmara de fluxo laminar. A incubação das culturas foi em ambiente de sala de crescimento, com temperatura de 25 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz, com o uso de lâmpadas fluorescentes brancas e densidade de fluxo de fótons de 50 µmol m⁻² s⁻¹.

A etapa de aclimatização foi realizada na casa de vegetação com controle de temperatura e umidade relativa do ar, que é realizado com auxílio de exaustores e sistema de turno de irrigação intermitente controlado por temporizadores, tal etapa aconteceu nos meses de março e abril de 2023.

3.2 ENSAIOS DE ESTABELECIMENTO E INDUÇÃO *IN VITRO*

3.2.1 Preparação do meio de cultivo para a indução dos explantes

A partir das soluções estoques da formulação salina de MS foi elaborado três diferentes meios de culturas:

- 1) Meio de cultura MS isento de fitorreguladores (controle);
- 2) Meio de cultura MS suplementado com 1µM de BAP (B₁) e;
- 3) Meio de cultura MS suplementado com 1µM de BAP + 1µM de ANA (B₁A₁).

Em seguida foi ajustado o pH de cada uma das soluções para 5,8 com auxílio de NaOH e HCl e adicionado agente geleificante Agar (7,5 g L⁻¹). Para a dissolução do Agar, o meio de cultura foi aquecido aproximadamente dois minutos no micro-ondas, até o líquido estar totalmente translúcido. Cada tratamento foi composto por 15 tubos de ensaio, contendo 10 mL do meio de cultura, utilizando um delineamento inteiramente casualizado. Ao final os tubos foram tampados com tampa plástica no Ensaio 1 e com papel alumínio no Ensaio 2, vedados com parafilme (PVC) e autoclavados (15 minutos a 121°C e 1,3 atm). O uso de diferentes materiais para vedar não alteram os resultados.

3.2.2 Coleta e desinfestação dos explantes

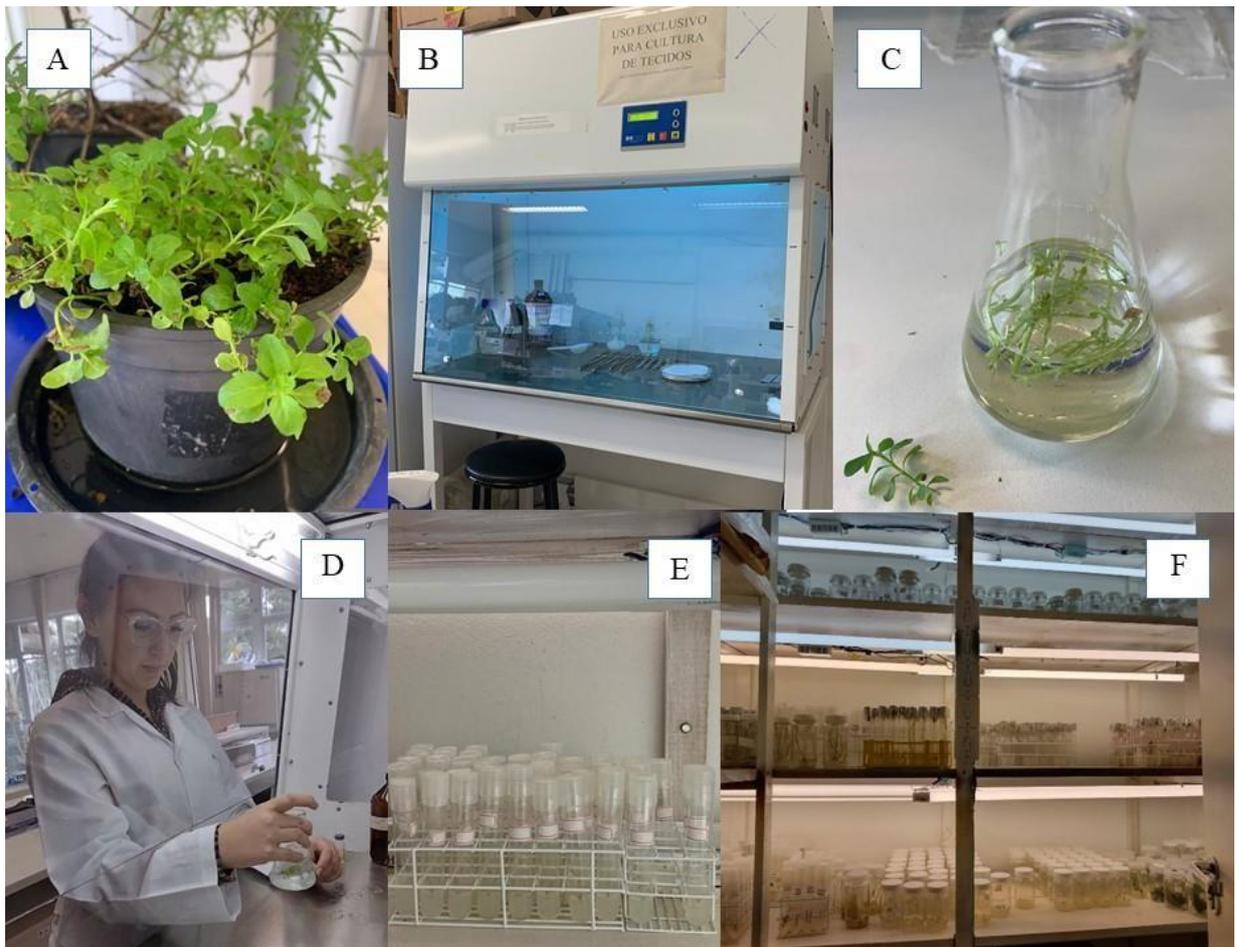
Segmentos nodais com 0,5 a 1,0 cm, com um nó, foram excisados de planta matriz e em Erlenmeyer (125mL), procedeu-se a lavagem em água tipo 2 com duas gotas do surfactante Tween 20[®] por dois minutos (Figura 1C). Em câmara de fluxo laminar foram submetidos a um processo de desinfestação, sob agitação álcool 70% (v/v) por 30 segundos; hipoclorito de sódio (1% v/v) juntamente com duas gotas Tween 20[®], por 15 minutos, sempre sob agitação, após foram lavados rapidamente com álcool 70% somente para tirar os resíduos do sabão neutro e espumas. Finalizando passaram por tríplice lavagem em água tipo 2 e autoclavada (Figura 1D). Após o processo de desinfestação, os explantes permaneceram submersos em água para mantê-las hidratadas garantindo assim sua viabilidade. Com auxílio de pinças e bisturis, e sobre papel branco autoclavado, efetuou-se a redução do tamanho dos explantes, pela retirada das extremidades e regiões necrosadas. Após este procedimento os explantes foram inoculados em meios nutritivos, descritos no item 3.2.1. Todo esse processo deve ser feito rapidamente visando a hidratação dos mesmos.

Cada tubo de ensaio contendo o meio nutritivo recebeu um explante, foram tampados com tampa plástica/papel alumínio e vedados com parafilme (PVC). Finalizado o processo de inoculação dos explantes e vedação, todos os tubos foram acomodados na sala de crescimento em anexo ao laboratório de Biotecnologia Vegetal, onde a temperatura e o fotoperíodo são controlados em 25 ±2 °C e 16h com lâmpadas fluorescentes brancas de densidade de fluxo de fótons de 50 μmol m⁻² s⁻¹. Ressaltando que nos 7 primeiros dias os tubos ficaram em uma bancada que não recebia luz direta, para que não houvesse a oxidação dos explantes. (Figura 1E)

Ao longo de quatro semanas na presença de luz (Figura 1F) foi realizado as análises semanais do experimento. As análises foram feitas visualmente, avaliando altura, formação e quantidade de brotos laterais, formação e quantidade de raízes.

No estágio de indução foram implementados dois experimentos iguais e sucessivos, em virtude da taxa de contaminação observado no primeiro ensaio.

Figura 1 - Estabelecimento das culturas *in vitro* de *Mentha pulegium*: (A) Planta matriz mantida em casa de vegetação, UFSC, Campus Curitibanos; (B-D) Assepsia e processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar: (B) Uso de luz UV; para assepsia da câmara e materiais; (C) Explantes excisados e submersos em água para posterior desinfestação; (D) Desinfestação dos explantes, sob agitação constante; (E-F) Incubação das culturas em sala de crescimento: (E) Manutenção das culturas em bancada na ausência de luz direta por uma semana e; (F) Bancadas com luz direta para a indução e multiplicação.



Fonte: Autora (2023).

3.3 ENSAIO DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

Segmentos nodais com 0,8 a 1,0 cm, contendo um nó e duas gemas, foram excisados de brotações estabelecidas *in vitro* e mantidas no laboratório de Biotecnologia Vegetal, do ensaio de indução, foram a fonte de explantes para o experimento. Para promover a multiplicação das brotações foram elaborados seis diferentes meios de cultura

O desenho experimental utilizado foi um esquema fatorial 2x3 com seis tratamentos: A suplementação ao meio de cultura básico MS com duas concentrações de ANA (0 e 2 μM) combinado com três de BAP (0, 2 e 4 μM). Cada unidade experimental foi constituída de um frasco de vidro (tipo conserva, de 340mL) contendo quatro explantes e repetidos três vezes.

Na elaboração do meio de cultura, cada tratamento recebeu suas respectivas concentrações de fitorreguladores, conforme descrito na Tabela 1. Após adicionar todos os componentes efetuou-se ajuste de pH para 5,8, e em seguida acrescentou-se o Ágar e aquecimento por aproximadamente 2 min, até que não houvesse nenhum vestígio do composto, apresentando um líquido totalmente translucido. Finalizando essa etapa todos os frascos foram tampados com tampa de plástico e levados para a autoclave por 15 minutos a 121°C e 1,3 atm.

Tabela 1 - Abreviaturas dos meios de cultura elaborado a partir da formulação salina MS suplementada com diferentes concentrações dos fitorreguladores ANA (0 e 2) em combinação com BAP (0; 2 e 4).

Concentração de ANA (μM)	Concentração de BAP (μM)		
	0	2	4
0	MS	B2	B4
2	A2	A2B2	A2B4

* A= ANA; B=BAP; 2 e 4 = μM .

Em câmara de fluxo as brotações foram retiradas dos frascos, com auxílio de uma pinça, e acomodadas em papel autoclavado e com auxílio de bisturi excisou-se as folhas e a separação do segmento nodal. Posteriormente em cada frasco de vidro contendo os meios nutritivos citados na Tabela 1, foram inoculados os quatro explantes. Imediatamente após foram tampados com tampa plástica e vedados com parafilme (PVC). Ao final dessa etapa todos os frascos com as culturas foram acomodados novamente na sala de crescimento na presença de luz direta.

Foram realizadas quatro análises quinzenalmente. Nessa etapa foi mensurado altura, número de nós formação, quantidade de brotos laterais assim como formação e quantidade de raízes. As análises foram feitas visualmente, em frascos com maiores números de brotos onde havia dificuldade de contagem houve necessidade do auxílio do estereoscópio. Dados relevantes durante das culturas foram registrados por fotos.

3.4 ENSAIO DE ACLIMATIZAÇÃO EM AMBIENTE *EX VITRO*

Brotações com 3-5 cm de altura, contendo 4-5 segmentos nodais, originadas do meio de cultura básico MS e isento de fitorreguladores, foram preparadas para o processo de aclimatização pela segmentação e retiradas das folhas para evitar a desidratação. As mini estacas foram transplantadas em bandeja de isopor com 72 células, com volume de 125 cm³ por célula, contendo misturas de substrato comercial, previamente umedecido. Para evitar a desidratação das mini estacas, durante o transplante, foram efetuadas regas com pulverizador manual.

O desenho experimental utilizado foi num esquema fatorial de 2x4, com oito tratamentos: Dois tamanhos de brotações combinados com quatro misturas de substratos, indicados na Figura 2, na proporção de: 1) MecPlant®; 2) Turfa Fertil®; 3) Turfa Fertil/ Carolina Soil® (1:3 v/v); 4) McPlant/Carolina Soil (1:3 v/v). Cada unidade experimental foi composta de três brotações/mudas, dispostas num delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

Figura 2 - Composição de diferentes substratos comerciais (A), MecPlant® (casca de pinus, vermiculita, corretivo de acidez e macro nutrientes); (B) Turfa Fertil® (turfa, casca de arroz carbonizada. Aditivado com N (0,04%), P₂O₅ (0,04%), K₂O (0,05%) e calcário calcítico (1,5%)); (C) Carolina Soil® (Turfa, vermiculita e calcário).



Fonte: Autora (2023).

As brotações foram acomodadas em uma bandeja contendo papel toalha úmido, para evitar a desidratação e de certa maneira ficarem menos expostas ao ambiente até que fossem transplantadas. Na antessala da casa de vegetação, as plântulas com altura de cinco centímetros foram enterradas dois centímetros abaixo da superfície e as menores acomodadas um centímetro abaixo da superfície. Essa medida foi feita adequadamente em todas as células para que não houvesse interferência nas análises subsequentes.

Após o transplante, a bandeja foi levada para dentro da casa de vegetação e colocada sob a bancada. A irrigação ocorreu todos os dias por aspersão, com período de rega de dois minutos nos seguintes horários: 9h, 10h, 11h, 12h, 13h, 15 h.

Figura 3 - Procedimento de aclimatização de mudas de *Mentha pulegium*: (A) Bandeja contendo as brotações e envolvidas com papel toalha umedecidos para manter hidratadas; (B) Medição das brotações para padroniza-las com 5 e 3 cm; (C) Plantio das brotações em bandeja de 72 células contendo os diferentes substratos; (D-G) Imagens da casa de vegetação número 4: (D) lado do exaustor ; (E) lado do umificador; (F) Túneis de nebulização com bancada, setor 4 e; (G) Interior com bancadas e subdivisões em túneis.



Fonte: Autora (2023).

As avaliações ocorrem quinzenalmente (15; 30; 45 dias), de maneira visual avaliando altura, quantidade de broto lateral, formação e tamanho de raízes. A avaliação de raízes ocorreu somente com 45 dias, para que não houvesse a necessidade de fazer a análise destrutiva de nenhuma planta e não interromper as outras análises. Durante tais análises as raízes foram lavadas em baldes contendo água limpa para retirada de resíduos dos substratos.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados de cada parâmetro foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste Scott-Knott a 5% de separação de médias. Quando necessário os dados

originais foram transformados em $(x+0,5)^{0,5}$ ou $\log(x+1)$, segundo as recomendações de Compton (1994), usando o software estatístico GExpDes versão web (KORMANN *et al.* 2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ESTABELECIMENTO E INDUÇÃO DE BROTAÇÕES

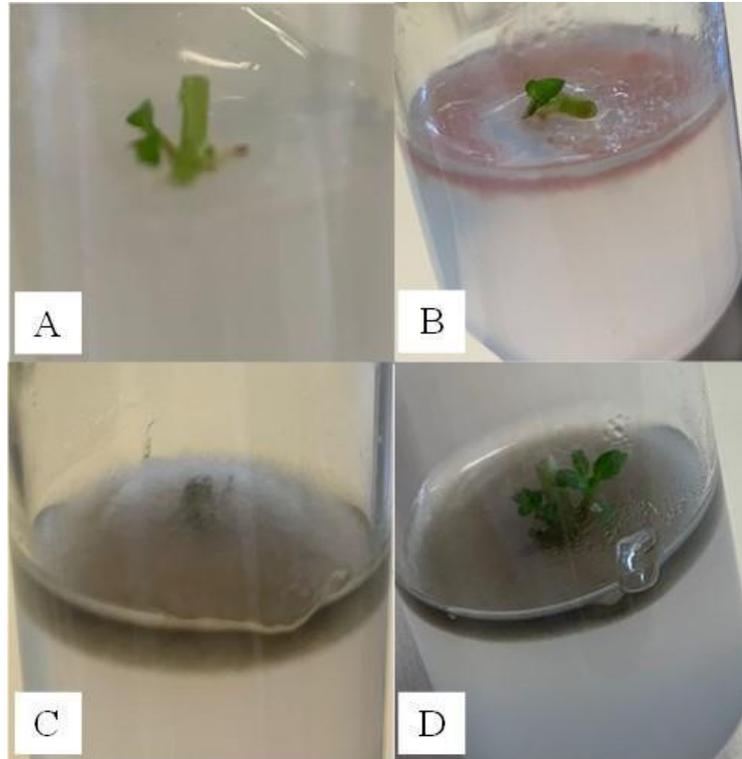
O estabelecimento e indução das culturas *in vitro*, a partir de segmentos nodais de *M pulegium*, foi observado já ao sétimo dia em cultivo, com o início da indução de brotos e livre de contaminações (Figura 4A). Nos dois ensaios de indução observou-se também que, em algumas brotações induzidas e que apresentavam contaminações, conseguiam se desenvolver (Figura 4B-D). Porém, as presenças de contaminação influenciaram em seu desempenho posterior que, por controle da assepsia no laboratório foram eliminadas e autoclavadas.

No primeiro ensaio de indução observou-se uma taxa de sobrevivência de 73%, com uma contaminação total de 27% e destes 18% foram por fungos e 9% por bactérias (Figura 5A). No segundo ensaio, implantado a partir de explantes extraídos de planta matrizes mantidas em ambiente do laboratório por 15 dias, sob cuidados mais rigoroso, quanto a irrigação e controle fitossanitários resultou em maior porcentagem (89%) de indução (Figura 5B). Observou-se também que, nestas condições e cuidados resultou em menor número de contaminações (Figura 4B).

As primeiras respostas para o ensaio surgiram na primeira semana de cultivo com indução de brotos laterais, a partir de gemas existentes nos segmentos nodais (Figura 6A). Nas semanas seguintes houve desenvolvimento dos brotos formados, assim como crescimento de novos brotos e raízes (Figura 6D).

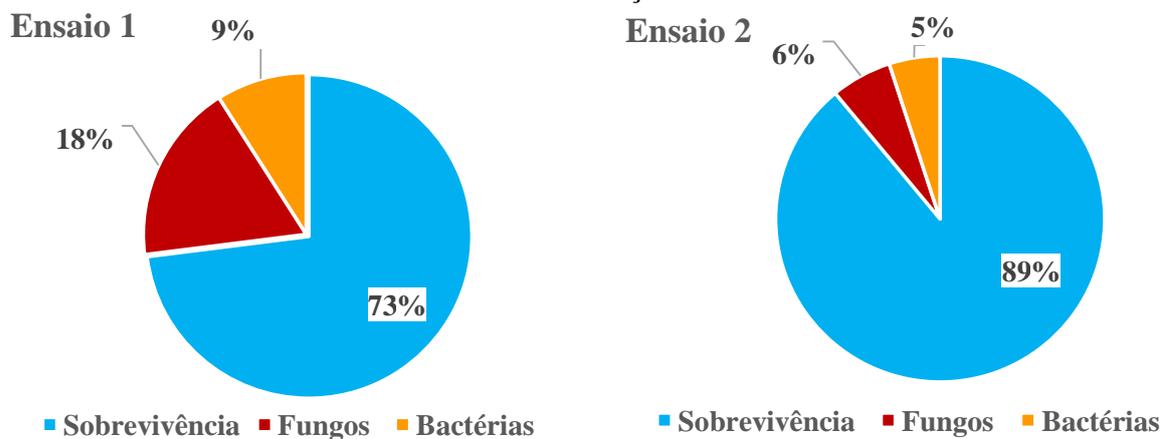
Os procedimentos de desinfestação dos explantes, no presente trabalho, foram executados com base no protocolo consolidado para este tipo de explantes e utilizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal. A provável causa pela ocorrência de contaminações, no estabelecimento *in vitro* das culturas, pode estar relacionado com os cuidados com as plantas matrizes. Entre estes fatores, o local de permanência da planta matriz e o sistema de irrigação adotado. No primeiro ensaio, as plantas matrizes encontravam-se em ambiente de casa de vegetação aclimatizada (ver Figura 3G), sob todos os cuidados de irrigação diretamente no substrato e evitando a irrigação da parte aérea. Enquanto que, a planta matriz escolhida para o segundo ensaio foi retirada da casa de vegetação e levada para cuidados em ambiente do laboratório (ver Figura 1A).

Figura 4- Estabelecimento e indução *in vitro* a partir de segmentos nodais de *Mentha pulegium* no primeiro ensaio: (A) Início da indução de brotos e livre de contaminações ao sétimo dia em cultivo; (B) Indução de broto com presença de bactérias; (C-D) Presença de contaminação por fungos:(C) sem indução e; (D) com desenvolvendo de brotos na presença de fungos.



Fonte: Autora (2023)

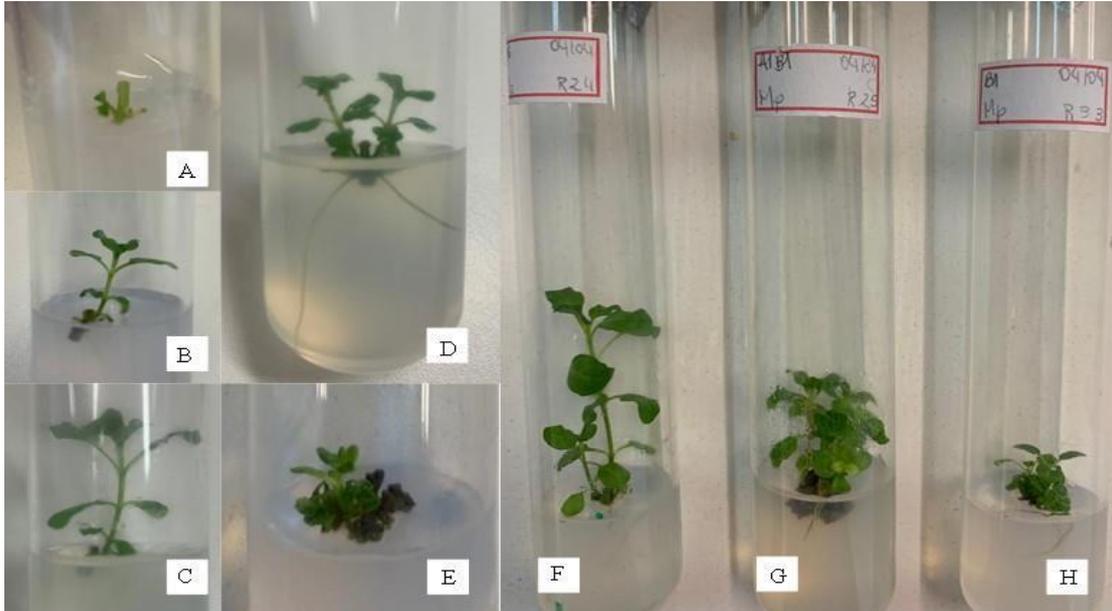
Figura 5. Porcentagem média de sobrevivência e contaminações (fungos e bactérias) *in vitro* em resposta aos dois ensaios sucessivos, a partir de segmentos nodais de *Mentha pulegium*, cultivado em diferentes meios de cultura: (A) 1º Ensaio e; (B) 2º ensaio, após uma semana da inoculação



Fonte: Autora (2023).

Figura 6 - Processo de indução de brotos *in vitro* em *Mentha pulegium*, em diferentes meios de cultura, em diferentes tempos após a inoculação, no segundo ensaio: (A-C, F) Indução de brotos em meio MS: (A) Ao sétimo dia; (B) Aos 14 dias e; (C) Aos 21 dias; (D) Brotações emitindo

raízes, aos 21 dias; (E) Indução de massa calogênica formada na base dos brotos, aos 21 dias; (F-H) Diferenciação na altura entre os diferentes meios MS, B1 e A1B1, aos 28 dias.



Fonte: Autora (2023)

No presente trabalho, observou-se que, para as variáveis número de brotos, número de nós, e número de raízes, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2). Porém, para o parâmetro altura de brotos (cm) revelou diferença significativa ($p < 0,05$), com destaque para o meio de cultura MS, com maior crescimento médio (1,6 cm). Este fator, provavelmente, é resultante da composição do meio de cultura, por ser isento de fitorreguladores, favorece o crescimento dos brotos (Figura 6B, C e F). Enquanto, a presença de fitorreguladores induz a multiplicação de brotos (Figura 6D, G e H) e, observou-se também maior indução de calo na base dos explantes (Figura 6E e G)

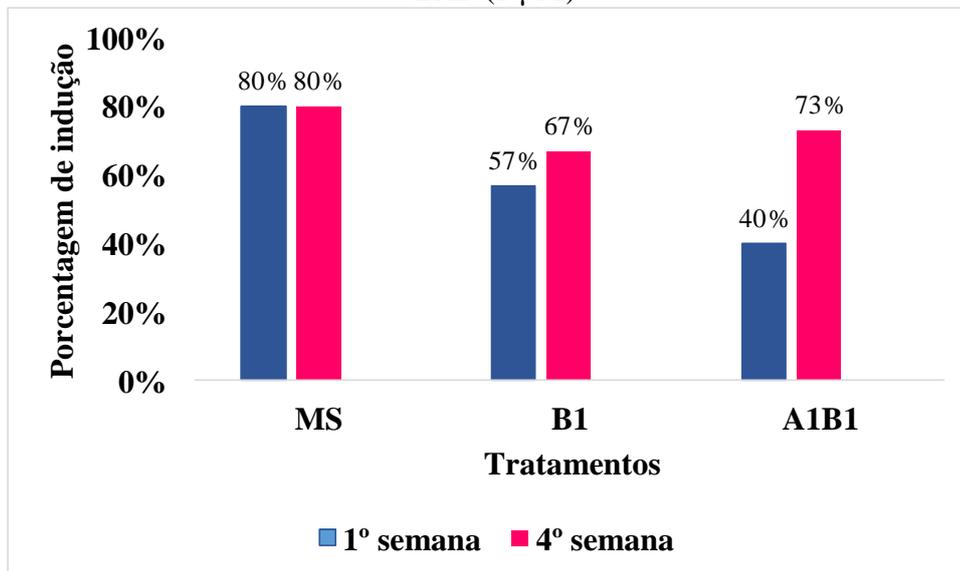
O cultivo dos segmentos nodais em meio de cultura MS, isento de fitorreguladores resultou em porcentagens média de indução de 80% de indução, após quatro semana da inoculação (Figura 7). Quando comparado com a utilização do meio de cultura B1 (MS suplementado com 1 μM de BAP), ou o uso do meio A1B1 (MS suplementado com 1 μM de ANA + 1 μM de BAP) observou uma maior taxa de indução de calos (Figura 6E, G e H).

Tabela 2 - Valores médios de número de brotos, de nós e de raízes e altura (cm) na indução *in vitro* de brotos de *Mentha pulegium*, em relação ao cultivo em diferentes meios de cultura: MS; B1= MS suplementado com BAP (1 μM) e; A1B1= MS com BAP (1 μM) + ANA (1 μM), após quatro semanas da inoculação.

Tratamentos	Nº de Brotos ^{NS}	Nº de Nós ^{NS}	Altura (cm)	Nº de Raízes ^{NS}
MS	1,6 a	5,2 a	1,6a	2,3a
B1	1,8a	4,3 a	0,8b	0,5a
A1B1	1,5a	2,9a	0,5b	1,7a
CV(%)	10,6	26,8	12,67	14,58

A= ANA; B=BAP; 1 = μM . Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). ^{NS*} não significativo; CV (%) – Coeficiente de variação.

Figura 7 - Porcentagem média de indução *in vitro* a partir de segmentos nodais de *Mentha pulegium* após primeira e quarta semana de cultivo em meio: MS - meio básico isento de fitorreguladores; B1 - MS suplementado com BAP (1 μM) e; A1B1 -MS com ANA (1 μM)+ BAP (1 μM) .



Fonte: Autora (2023).

Apesar de não existir diferença estatísticas para a variável número de brotos, observamos diferenças no desempenho dos diferentes tratamentos testados na quarta semana de cultivo, a suplementação de meio básico com ANA inibiu, inicialmente, a formação de brotos (Figura 8D) e apresentou boa resposta para formação de raízes (Figura 8D), confirmando as funções de indutor de raízes das auxinas.

O uso do meio de cultura MS suplementado com 2,22 μM de BAP, também induziu a formação de brotos, a partir de segmentos nodais de *M. pulegium*, tanto em meio geleificado, quanto em meio líquido, sobre bolinhas de vidro (\varnothing 5 mm) utilizadas como suporte das brotações (BENLARBI *et al.*, 2014). Da mesma forma, Ayaz e Memon (2021) observaram que os meios com BAP (1 μM) se sobressai nesse parâmetro em relação aos outros meios, confirmando a eficácia da suplementação do BAP ao meio de cultura, na regeneração de brotos.

O meio de cultura básico MS foi o melhor para a indução de brotos *M pulegium*, pois teve uma boa indução inicial e crescimento em altura das brotações (Figura 6A, C, F) e não induziu a formação de calo (Figura 9). Porém, estudos com outras doses e combinações de BAP e ANA na indução podem ser testados para contrastar tais resultados, uma vez que, o uso de BAP na etapa de multiplicação podem resultar em maiores números de brotos.

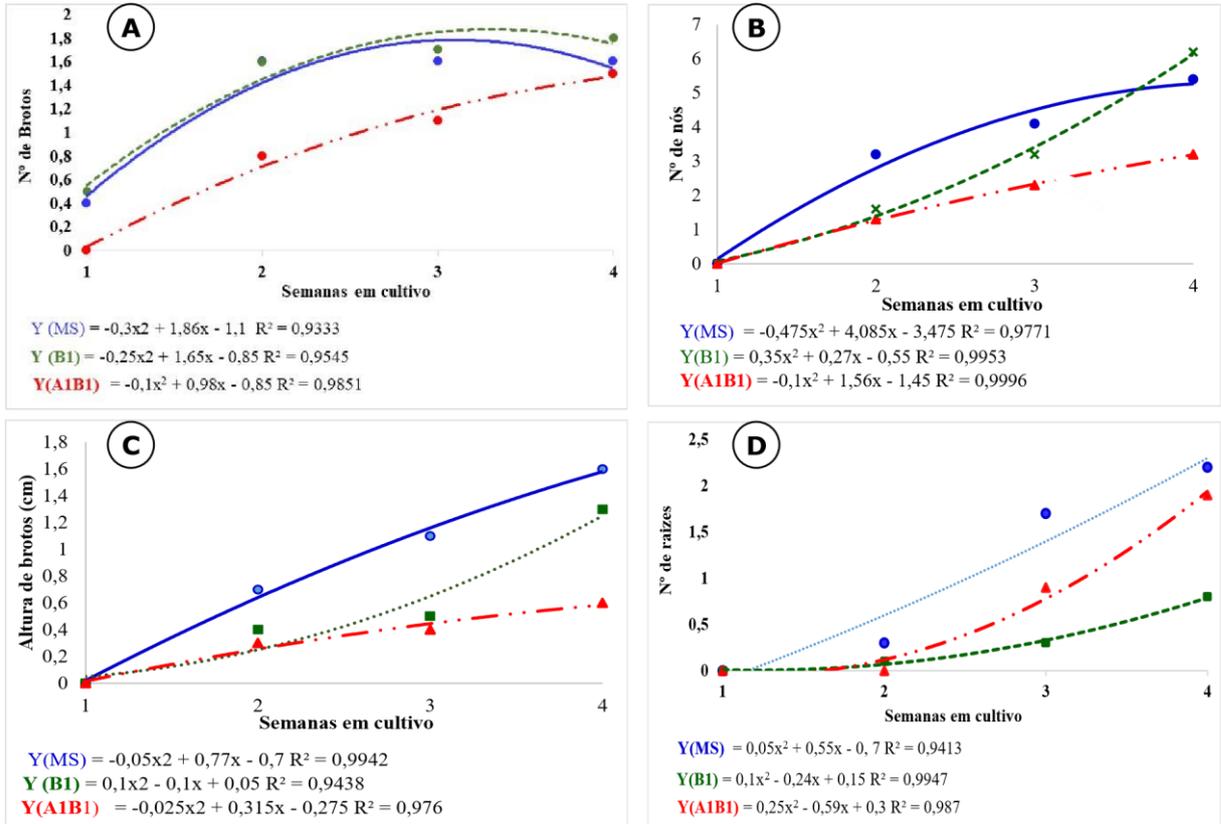
No presente trabalho, utilizou-se a análise de regressão para descrever a evolução da indução *in vitro* de brotos de *M. pulegium* em relação ao tempo de cultivo e aos três meios de cultura testados. Tal análise revelou que, o modelo quadrático foi o que melhor se ajustou, na evolução do número de brotos (Figura 8A), número de nós (Figura 8B), altura (cm) de brotos (Figura 8C) e no número de raízes (Figura 8D). Revelando, a partir disto, uma trajetória, dos valores calculados, com valores de r^2 significativos e superiores a 0,93. Estes valores de r^2 são considerados altos, uma vez que, para sistemas biológicos podem variar entre 0,5 e 0,9 (Compton, 1994).

Segundo Asmar *et.al.*, (2012), no cultivo *in vitro* de *Lippia alba* e Moraes, Asmar e Luz (2014), no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita*, relataram que a presença da citocinina, BAP suplementado em meio de cultura, pode reduzir a altura de brotos, porque este tipo de fitorregulador, não tem efeito em promover alongamento das brotações e sim favorecer a multiplicações. Isso confirma o que observamos no presente trabalhos que, na ausência de BAP no meio de cultura, observa-se maiores tamanhos de brotações (Figura 6F, G e H).

Quanto ao desenvolvimento de raízes, todos os meios de cultura apresentaram a mesma característica de evolução, começando a emitir as primeiras radículas a partir da segunda semana e aumentaram significativamente ao longo das semanas seguintes. Apesar de não encontrar diferença estatística entre eles o meio MS é que se destaca no gráfico.

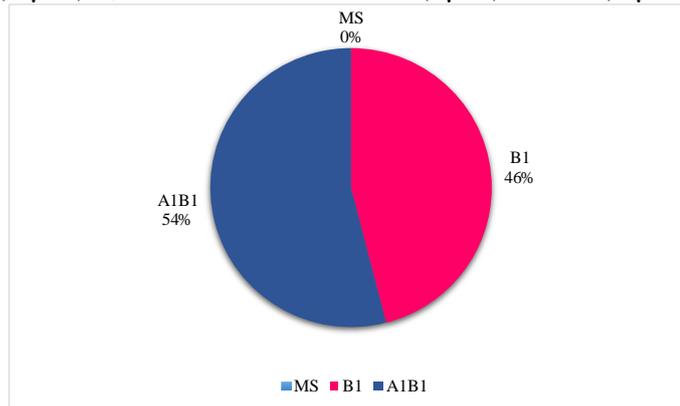
A formação de calogênese, nas culturas de *M. pulegium* está diretamente relacionado a suplementação da combinação de ANA e BAP, revelando 54% indução, o somente BAP com 46%, quando comparado com meios isento destes fitorreguladores, com 0% de calo (Figura 9). Quando as concentrações de ANA (auxina) e BAP (citocinina), são equivalentes ocorre formação de calo, corroborando com Ayaz e Memon (2021) onde cita que concentrações de BAP e ANA equivalentes resultam em maior percentual.

Figura 8 – Evolução, pela análise de regressão, da indução *in vitro* de brotos de *Mentha pulegium*: A) Número médio de brotos; B) Número médio de nós por brotos; C) Altura dos brotos (cm) e; D) Número médio de raízes por broto, a partir do cultivo em diferentes meios de cultura: MS - meio básico MS isento de fitorreguladores; B1 - MS suplementado com BAP (1 μ M) e; A1B1 -MS com ANA (1 μ M)+ BAP (1 μ M), em relação as semanas em cultivo.



Fonte: Autora (2023).

Figura 9 - Porcentagem de indução de calos em *Mentha pulegium* em relação aos diferentes meios de cultivo: MS - meio básico isento de fitorreguladores; B1 - MS suplementado com BAP (1 µM) e; A1B1 -MS com ANA (1µM)+ BAP (1 µM) ,



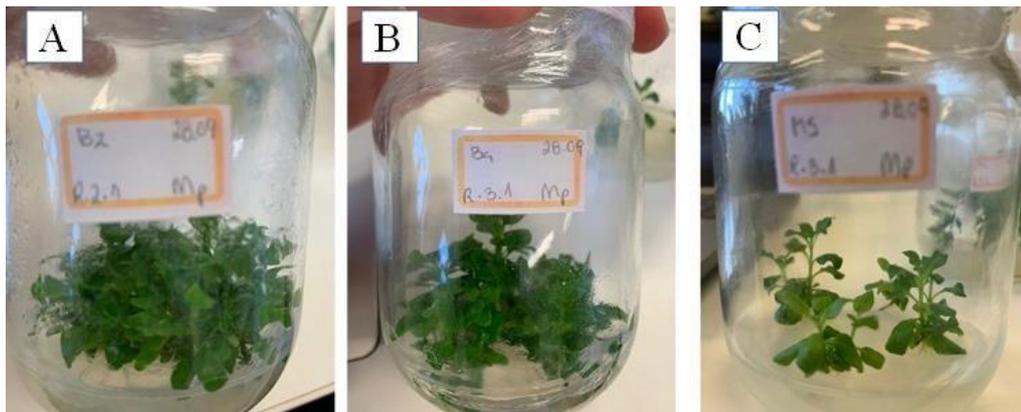
Fonte: Autora (2023)

4.2 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

A multiplicação *in vitro* de brotos de *M. pulegium* foram visivelmente favorecidas quando se suplementou ao BAP meio de cultura MS (Figura 10A, B) ou em combinação de BAP com ANA (Tabela 3), quando comparado ao meio de cultura MS isento de fitorreguladores

(Figura 10C). Observou-se também que, a maior número médio de brotos por explantes (7,7 brotos) ocorreu com a suplementação de 4 μM de BAP (B4), porém, não se diferenciou significativamente entre si com o meio B2, com uso de 2 μM de BAP (6,9 brotos), e nas suas combinações com 2 μM de ANA (A2B2 e A2B4) (Tabela 3).

Figura 10 - Multiplicação de brotos *in vitro* de *Mentha pulegium* em diferentes meios de cultura: (A-B) Regeneração múltipla de brotos: A) em meio de cultura B2 (MS e suplementado com 2 μM de BAP; B) em meio de cultura B4 (MS e suplementado com 4 μM de BAP; C) Brotos regenerados em meio de cultura MS e isento de fitorreguladores, após 21 dias da inoculação;



Fonte: Autora (2023)

Tabela 3 - Número médios de brotos, de nós, de raízes e altura média (cm) dos brotos no cultivo *in vitro* de *Mentha pulegium* em resposta a suplementação ao meio MS básico com ANA (0 e 2 μM) combinados com BAP (0, 2 e 4 μM), após dois meses em cultivo.

Meio de cultura (μM)	Nº de Brotos*	Nº de Nós*	Nº de Raízes *	Altura (cm)*
B4	7,7 a	19,1 a	13,5a	4,8a
B2	6,9 a	20,0 a	10,1a	2,7b
A2B2	4,7 a	18,6 a	8,5a	5,3a
A2B4	4,3 a	6,6 b	6,6a	6,4a
A2	2,6 b	3,2 b	8,2a	2,7b
MS	2,4 b	12,4 b	6,9a	2,8b
CV(%)	10,57	5,26	9,47	12,81

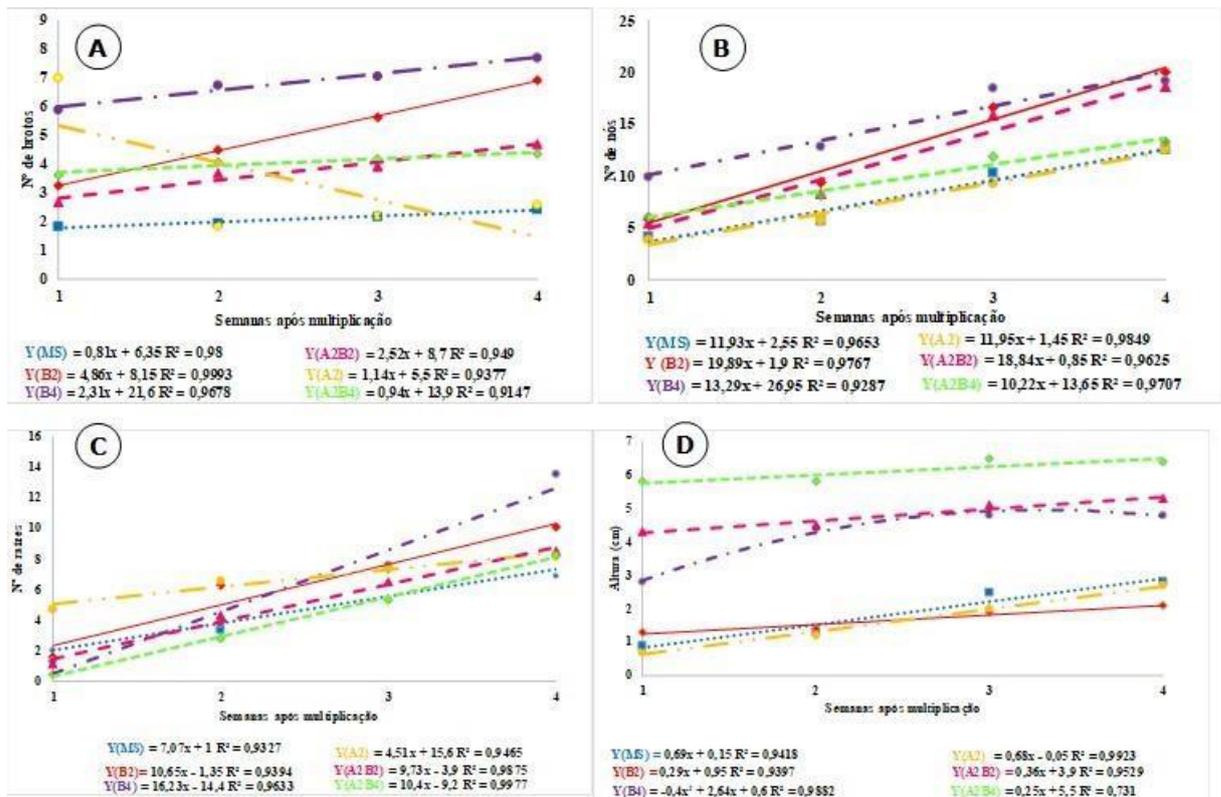
A= ANA; B=BAP; 2 e 4 = μM . Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). * Dados originais transformados em $(x+0,5)^{0,5}$ ou $\log(x+1)$; CV – Coeficiente de variação.

O uso dos meios de cultura MS básico suplementado com BAP (2 e 4 μM , B2 e B4) ou em combinação com ANA (2 μM , A2B2) promoveu um maior e significativo ($p < 0,05$) número de nós, quando comparado com os demais tratamentos, após quatro semanas em cultivo (Tabela 3; Figura 11). Segundo Pereira (2011), as maiores concentrações de BAP estimulam a formação de brotações, porém, reduzem a altura e o número de nós nos brotos no cultivo *in*

in vitro de *Physalis angulata*. No entanto, no presente trabalho, estes fatores não foram observados quando se suplementou aos meios de cultura 2 e 4 μM de BAP.

Os tratamentos que apresentaram maior altura dos brotos foram A2B4, A2B2 e B4, com alturas de 6,4; 5,3 e 4,8 cm respectivamente, após quatro semanas em cultivo (Tabela 3; Figura 11). Pereira (2011), também relata que, a adição de ANA juntamente com o BAP, equilibrarem o tamanho dos brotos, porém, promovem a formação de calos inicialmente nos explantes. Araújo, Siqueira e Cecon (2008) também encontrou resultados similares no número de brotos de abacaxizeiro ‘Smooth cayenne’ quanto utilizou ANA e BAP, porém também correu a formação de calos iniciais nos explantes antes de se diferenciarem em brotações.

Figura 11 - Evolução, pela análise de regressão, da multiplicação *in vitro* de brotos de *Mentha pulegium*: A) Número médio de brotos; B) Número médio de nós por brotos; C) Número médio de raízes por broto e; D) Altura dos brotos (cm), a partir do cultivo em diferentes meios de cultura: MS básico com ANA (0 e 2 μM) combinados com BAP (0, 2 e 4 μM), após dois meses em cultivo.



Fonte: Autora (2023)

Por fim, quanto ao número médio de raízes, não foi observado diferença significativa entre os meios avaliados e também não se observou relação com a suplementação da ANA no meio de cultura, em quatro semanas de cultivo (Tabela 3). Segundo Flores e Nicoloso (2006) a presença de ANA, com a ausência de BAP no meio de cultura, inibem o crescimento de brotos

e potencializam o desenvolvimento de raízes de *Pfaffia tuberosa*. Este fator não, não foi observado no presente trabalho, uma vez que, não se observou na formação de raízes, diferença estatística entre os tratamentos testados (Tabela 3). Desta forma, a presença ou ausência de ANA e BAP em nenhuma das concentrações não influenciou significativamente na formação de raízes, tanto influência positiva, quanto negativa.

4.3 ACLIMATIZAÇÃO

As melhores médias de desenvolvimento das mudas foram observadas quanto se utilizou os substratos TF= Turfa Fertil (1v) e a misturas TF+C = Turfa Fertil + Carolina Soil (1:3, v/v) (Tabela 4). Enquanto, para os demais parâmetros, não revelou diferença estatística entre si. A taxa de sobrevivência das mudas durante o processo de aclimatização foi superior a 95% (Figura 13A). No entanto, observou-se o início de senescência de algumas plantas na quarta semana após transplântio, quando se utilizou o substrato MP- MecPlant puro (Figura 12A - indicada pela seta vermelha), revelando também o mais baixo desempenho em todos os parâmetros avaliados (Tabela 4; Figura 12B).

Esse resultado está relacionado com a textura do substrato como citado anteriormente. Zorzeto et al. (2014) afirma que o substrato contendo casca de pinus é mais denso e menos poroso, podendo causar uma impedância mecânica na formação de raízes consequentemente o desenvolvimento mais lento das plantas (LUDWIG, 2020). Logo o substrato contendo casca arroz carbonizada possibilita o melhor desenvolvimento radicular das plantas, devido sua grande porosidade e baixa densidade, especialmente no caso de *M. pulegium* que apresenta raízes frágeis e sensíveis.

A mistura de C (Carolina Soil), na proporção de 3v (três volumes), tanto com TF- Turfa Fertil (1v), quanto com ao MecPlant (1v), revelou melhor desenvolvimento das mudas, em ambos os parâmetros avaliados, quando comparado com a composição única (Tabela 4; Figura 12D e E). Nos parâmetros número de brotos e tamanho de raiz houve uma melhora do desempenho de MP quando acrescido de C com médias de 1,33 para 3,94 e 8,83cm para 11,36cm respectivamente (Tabela 4; Figura 12E). Simplesmente pelo fato de que Carolina Soil ter em sua composição vermiculita, composto leve, com bastante porosidade que também facilita a penetração das radículas. Além disso a vermiculita consegue reter maior quantidade de água comparado como casca de arroz carbonizado o que pode ter auxiliado na mistura TF+C. (UGARTE; SAMPAIO; FRANÇA, 2008)

Figura 12 - Resultados obtidos durante o processo de aclimatização de *Mentha pulegium* aos 45 dias após transplântio:(A) Tratamentos dispostos em bandeja de 72 células; (B) Tratamento MP; (C) Tratamento TF; (D) Tratamento TF+C; (E) Tratamento MP+C.



Fonte: Autora (2023)

Tabela 4 - Valores médios de número de brotos, de nós e de raízes, altura de mudas (cm) e tamanho de raízes (cm) das mudas aclimatizadas de *Mentha pulegium* em diferentes substratos* após 45 dias em ambiente *ex vitro*

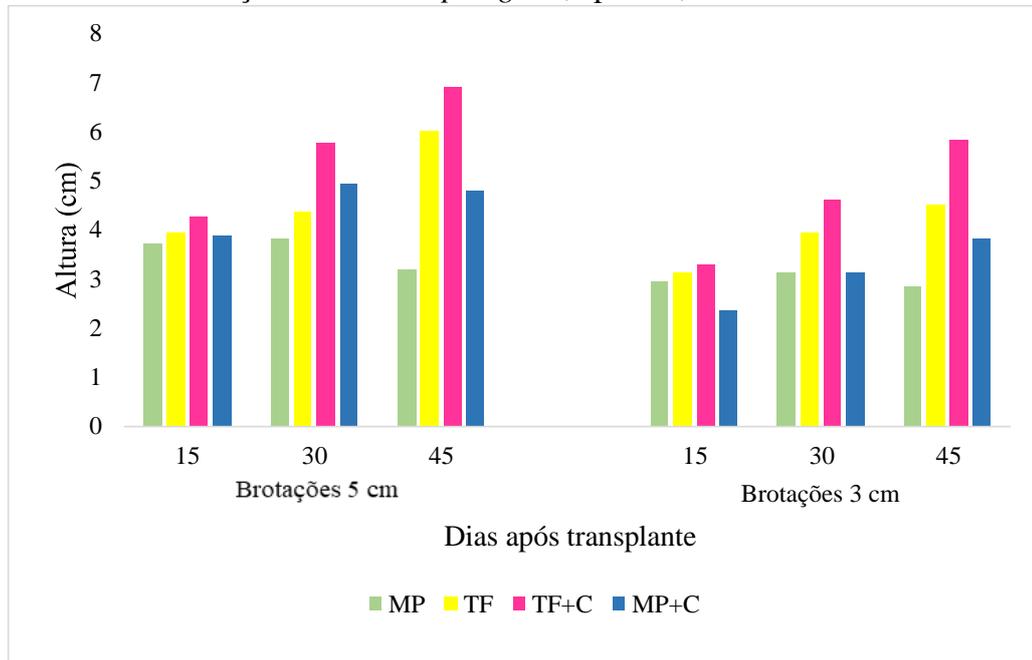
Substratos	Nº de Brotos**	Nº de Nós**	Altura de mudas (cm)**	Nº de Raízes**	Tamanho de raízes (cm)**
MP	1,33c	10,83b	2,99b	3,16b	8,83c
TF	6,61a	27,00a	5,25a	12,11a	13,36a
TF+C	7,50a	26,99a	6,38a	10,94a	14,50a
MP+ C	3,94b	14,44b	4,30b	11,36a	11,36b
CV (%)	17,11	17,44	10,37	7,8	14,64

*MP=MecPlant (1 v); TF= Turfa Fertil (1 v); TF +C= Turfa Fertil+Carolina Soil (1:3, v/v); MP+C= MecPlant+ Carolina Soil (1:3, v/v). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). CV – Coeficiente de variação. ** Dados originais transformados em $(x+0,5)^{0,5}$ ou $\log(x+1)$; CV(%) = Coeficiente de variação.

Quanto ao fator tamanho de mini estaca utilizada no transplântio (3 e 5 cm), as médias foram estatisticamente iguais no parâmetro de altura (cm). Porém para o restante dos parâmetros avaliados houve destaque para mini estacas transplântadas com 5 cm (Figura 13 e Figura 14).

Figura 13 - Altura média (cm) das mudas em relação aos diferentes substratos: MP=MecPlant (1

v); TF= Turfa Fertil (1 v); TF +C= Turfa Fertil + Carolina Soil (1:3 v/v); MP+C= MecPlant + Carolina Soil (1:3 v/v) combinados com diferentes tamanhos de microestacas (3 e 5 cm), durante o processo de aclimatização de *Mentha. pulegium*, após 15, 30 e 45 dias em ambiente *ex vitro*.

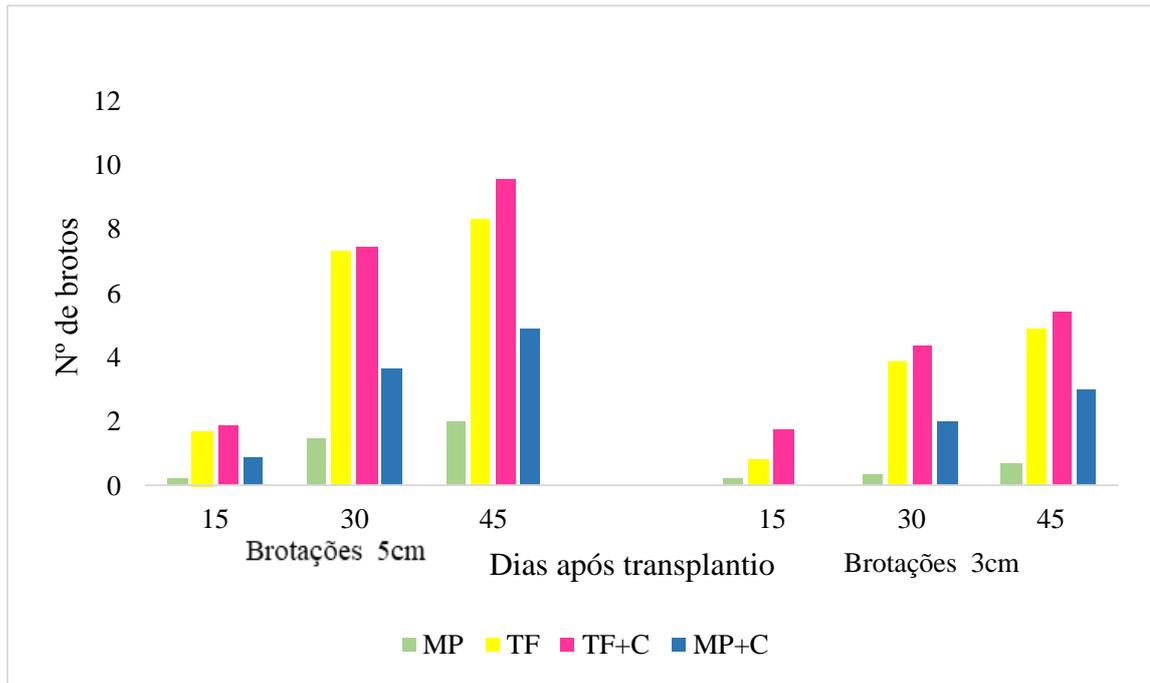


Fonte: Autora (2023)

No que se refere a números de brotos é nitidamente visível o destaque de TF+C e de TF em relação aos outros substratos, independente do tamanho das brotações transplantadas (Figura 14). Esse bom desenvolvimento de brotos está intimamente ligado ao desenvolvimento radicular que teve exatamente os melhores resultados em TF+C e TF (Figura 15).

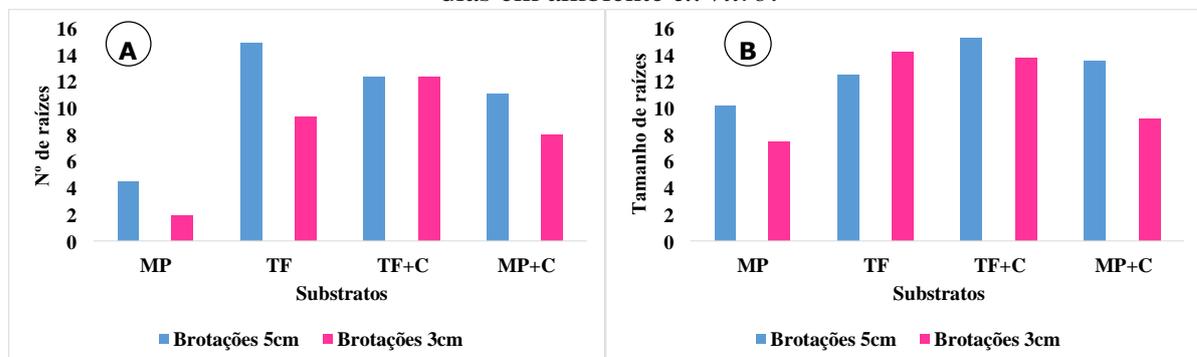
As raízes foram avaliadas somente aos 45 dias, mesmo assim constatou-se que os melhores substratos para desenvolvimento de raízes, em número e tamanho (cm) foram iguais fatores. TF destacou-se em números de raízes para brotações de 5cm e se igualou com TF+C em mini estacas de 3cm (Figura 15A). Em relação em tamanho de raízes o destaque foi para TF+C em brotações de 5cm, enquanto para o substrato TF as brotações de 3cm tiveram melhor crescimento radicular (Figura 15B).

Figura 14 - Número médio de brotos em relação aos diferentes substratos: MP=MecPlant (1 v); TF= Turfa Fertil (1 v); TF +C= Turfa Fertil + Carolina Soil (1:3 v/v); MP+C= MecPlant + Carolina Soil (1:3 v/v) combinados com diferentes tamanhos de microestacas (3 e 5 cm), durante o processo de aclimatização das mudas de *Mentha pulegium*, após 15, 30 e 45 dias em ambiente *ex vitro*.



Fonte: Autora (2023)

Figura 15 -Número e tamanho de raízes das mudas de *Mentha pulegium*, em relação aos diferentes substratos: MP=MecPlant (1 v); TF= Turfa Fertil (1 v); TF +C= Turfa Fertil + Carolina Soil (1:3 v/v); MP+C= MecPlant + Carolina Soil (1:3 v/v) combinados com diferentes tamanhos de microrestacas (3 e 5 cm), durante o processo de aclimatização, após 15, 30 e 45 dias em ambiente *ex vitro*.



Fonte: Autora (2023)

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se definir importantes etapas do protocolo de microporção de *M. pulegium*. Entre estes, observou-se a importância dos cuidados com planta matriz, para o sucesso no estabelecimento *in vitro* das culturas. Já na etapa

de indução o cultivo em meio de cultura MS e isento de fitorreguladores, revelou os melhores resultados. Indicando a possibilidade de novos estudos com outras doses e combinações de fitorreguladores.

No processo de multiplicação *in vitro* verificou-se que a suplementação de fitorreguladores BAP e ANA, no meio de cultura MS, nos tratamentos B2, B4 e A2B2, revelaram ser mais eficientes na proliferação de brotos.

O uso dos substratos Turfa Fertil (TF) e Turfa Fertil + Carolina Soil (TF+C), destacaram na aclimatização de mini estacas vindas de processos *in vitro*, proporcionando melhor desenvolvimento das mudas.

Ao longo desse trabalho observou-se que as brotações e mudas *M. pulegium* apresentam um rápido desenvolvimento, e em menor tempo, quando cultivada *in vitro* em relação a plantas expostas ao ambiente natural. Uma sugestão para melhorias no protocolo e a produção em larga escala seria a utilização de biorreatores. Uma vez que, além de possibilitar uma produção contínua, estará conservando germoplasmas, produzindo plantas livres de patógenos e sem ocorrência de fatores que alterem a composição de metabolitos secundários. Ressaltando que os metabolitos secundários é o foco da extração de óleos essenciais, nos seus diversos usos.

REFERÊNCIAS

AMARAL, Maria I. S. **Estudos preliminares da microencapsulação de extratos do poejo (*Mentha pulegium* L.)**. 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal, 2020.

ANDRADE, Solange R. M. de. **Princípio da cultura de tecidos vegetais**. 1.ed. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2002, 16p. (Documentos, 58).

ANTAR, G.M.; HARLEY, R.M. *Mentha* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em:

<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23330>. Acesso em: 26 mar. 2023.

ANTAR, G.M. *et al.*, 2020. *Lamiaceae* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB142>. Acesso em: 12 abr. 2023.

ARAÚJO, R.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R. Multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro ‘Smooth cayenne’ utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). **Ceres**, v. 55, n. 5, p. 455-460, 2008.

ARAÚJO NETO, Sebastião E. *et al.* Produção de muda orgânica de pimentão com diferentes substratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 1408-1413, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000099>.

ASMAR, S. A. *et al.* Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia alba* [(Mill.) NE Brown]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 149-153, 2012.

AYAZ, Emine; MEMON, Abdulrezzak. Development of the Aromatic Medicinal Plants, *Mentha x piperita* L. and *Mentha pulegium* L. through *in vitro* Callus Induction and Micropropagation. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 159-165, 2021.

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

CAMPOS, Catarina Alexandre **Mecanismo de ação do ácido 1-naftalenoacético (ANA) na monda de frutos de nespereira [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]**. 2009. Dissertação. (Mestre em Engenharia Agronômica)- Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2009.

CAMPOS, Pollyara Furtado **Aspectos histomorfológicos e bioquímicos na embriogênese somática em *Paubrasília echinnata* Lam E. Gagnon, H. C. Lima & G. P. Lewis (FABACEAE)**. 2019. Dissertação. (Mestre em Biotecnologia Vegetal)-Centro de Bociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2019.

CARVALHO, Julita M. F. C. *et al.* **Considerações gerais sobre organogênese**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006, 28p. (Documentos, 150).

BARRUETO CID, L. Pedro (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4.ed. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2015.

COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.37, p.217-242, 1994.

DOMINGUES, Patricia M.; SANTOS, Lucia. Essential oil of pennyroyal (*Mentha pulegium*): Composition and applications as alternatives to pesticides—New tendencies. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111534, 2019.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T. Efeito do ANA e BAP na calogênese e organogênese de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n.3, p.89-95, 2006.

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

GUERRA, M. P. *et al.* Apostila de Biotecnologia I. 44p. 2016.

JUNGHANS, T. G.; ALBERTO, A.; OLIVEIRA, R. **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2. ed. rev. e ampl., Brasília, DF: Embrapa. 2013. 407 p.

LORENZI, H; MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas**. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2021.

LUDWIG, Fernanda et al. Neutralização da acidez em substrato de casca de pinus com diferentes granulometrias. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, Santa Cruz do Sul, v. 6, n. 1, p. 1-8, , 2020

LYCZKO, Jacek et al. *Mentha piperita* L. micropropagation and the potential influence of plant growth regulators on volatile organic compound composition. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2652, 2020.

MATHIAS J. BLANCO M. C. S. G. **Como plantar poejo: a produção da planta medicinal pode ser feita em casa, num pequeno vaso, ou em plantios comerciais, como fonte de renda**. **Revista Globo Rural: Editora Globo**, dez., 2013. Disponível em: <https://globorural.globo.com/vida-na-fazenda/como-plantar/noticia/2013/12/como-plantarpoejo.html>. Acesso em: 18 mar. 2023.

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G. Atividade antimicrobiana e composição química do óleo essencial *Mentha pulegium* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, n.2, p.325-327, 2008.

MONTENEGRO, Iván *et al.* Antifungal activity of essential oil and main components from *Mentha pulegium* growing wild on the Chilean central coast. **Agronomy**, v. 10, n. 2, p. 254, 2020.

MORAIS, T. P. *et al.* Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 110-121, 2012.

- MORAIS, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo in vitro de *Mentha x Piperita* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 350-355, 2014.
- PAIVA, Renato *et.al.* **Cultura de tecidos: Textos Acadêmicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.
- PAULETTI, G. F. **Influência ambiental e de parâmetros agronômicos na produção de poejo (*Cunila galioides* Benth.)**. 2005. 115f. Tese. (Doutorado em Fitotecnia)- Faculdade de agronomia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- PEREIRA, D. M. **Cultivo in vitro e análise qualitativa da fisalina D em *Physalis angulata* L.** 2011. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana - BA, 2011.
- SKREBSKY, Etiane C.; NICOLOSO, Fernando T.; FERRÃO, Gregori da E.. Sacarose e período de cultivo in vitro na aclimatização ex vitro de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v. 34, p. 1471-1477, 2004.
- SOUZA, Vinicius C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2005, 640 p
- THE PLANT LIST. *Mentha pulegium* L. **version 1.1. Published on the internet, 2013**. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-125243>, Acesso em: 12 abr. 2023.
- UGARTE, José F. de O.; SAMPAIO, João A.; FRANÇA, Silvia C.A. **Vermiculita**. In: Rochas e Minerais Industriais. CETEM/MCTI, capítulo 38, 2008.
- WATANABE, C. H. et al. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 76-86, 2006.
- ZARKI, K. B. L.; ELMTILI, N. Micro-propagation of *Mentha pulegium* L. through highfrequency shoots-tip and nodal explants culture. **Moroccan Journal of Biology**, v.12, p. 8-9, 2012.
- ZORZETO, Thais Q. et al. Caracterização física de substratos para plantas. **Bragantia**, v. 73, p. 300-311, 2014.