



MARCELLA CARVALHO CHAVES

**LEDS NO CULTIVO *in vitro* E NA PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Lippia filifolia* Mart. & Shauer**

LAVRAS – MG

2020

MARCELLA CARVALHO CHAVES

**LEDS NO CULTIVO *in vitro* E NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE
Lippia filifolia Mart. & Shauer**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal para obtenção do título de mestre.

Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery

Orientadora

Prof. Renato Paiva, PhD.

Dra. Débora de Oliveira Prudente

Coorientadores

LAVRAS – MG

2020

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

Chaves, Marcella Carvalho.

Leds no cultivo *in vitro* e na produção de compostos voláteis de
Lippia filifolia Mart. & Shauer / Marcella Carvalho Chaves. - 2020.
45 p. : il.

Orientador(a): Fernanda Carlota Nery.

Coorientador(a): Renato Paiva , Débora de Oliveira Prudente.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Eucaliptol. 2. Cerrado. 3. Óleos Essenciais. I. Nery,
Fernanda Carlota. II. , Renato Paiva. III. Prudente, Débora de
Oliveira. IV. Título.

MARCELLA CARVALHO CHAVES

**LEDS NO CULTIVO *in vitro* E NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE
Lippia filifolia Mart. & Shauer**

**USE OF LEDS IN *in vitro* CULTURE AND IN THE PRODUCTION OF VOLATILE
COMPOUNDS OF *Lippia filifolia* Mart. & Shauer**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal para obtenção do título de mestre.

APROVADA em 08 de fevereiro de 2020.

Dra. Fernanda Carlota Nery UFSJ

Dra. Ana Hortência Fonseca Castro UFSJ

Dra. Michele Valquíria dos Reis UFLA

Orientadora

Dra. Fernanda Carlota Nery UFSJ

LAVRAS – MG

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda força e bençãos durante esses dois anos de mestrado.

Agradeço à minha família que foi a peça fundamental ao dar apoio em todas as situações.

Ao programa de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pela estrutura concedida que tornou possível a realização desse trabalho, ao Prof. Renato Paiva, ao pós-doutorando Dr. Diogo Pedrosa e a todos os membros do laboratório.

Ao Laboratório de Bioquímica e Metabolismo de Plantas pela contribuição na realização de todas as análises, especialmente ao professor Dr. Paulo Marchiori, à doutoranda Beatriz e à Dra. Lissa.

À minha orientadora professora, Dra. Fernanda Nery, por toda orientação e contribuição durante o mestrado.

Aos meus coorientadores, professor Renato Paiva, PhD, e à pesquisadora Dra. Débora Prudente, pelas contribuições e disponibilidade.

Ao professor Dr. Richard Grazul e ao departamento de química da Universidade Federal de Juíz de Fora pela realização das análises dos óleos essenciais.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao doutorando Jober por toda contribuição e direcionamento. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Guilherme por toda ajuda e acompanhamento em todas as análises e estudos.

À minha amada professora Dra. Ilisandra que me incentivou a fazer o mestrado enquanto ainda estava na graduação.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Lippia filifolia Mart. & Shauer é pertencente à família Verbenaceae e é endêmica do Cerrado. Essa espécie apresenta potencial medicinal devido a produção de compostos voláteis que constituem seu óleo essencial. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da qualidade luminosa com uso de diodos emissores de luz (LEDs) sobre o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de *L. filifolia* e na produção de compostos voláteis. Quatro tratamentos foram elaborados de acordo com o comprimento de onda dos LEDs branco (controle), azul, vermelho e combinação vermelho/azul. Após 45 dias de experimento, parâmetros biométricos e bioquímicos foram analisados. A qualidade da luz influenciou o crescimento e o metabolismo das plântulas. As plântulas apresentaram maior altura sob luz vermelha e branca e maior acúmulo de biomassa, brotações e entrenós sob a combinação dos LEDs vermelho/azul. O maior conteúdo de carboidratos total foi observado na combinação dos LEDs vermelho/azul, enquanto a luz branca proporcionou maior conteúdo de pigmentos fotossintetizantes. Foi observado pouca influência da qualidade da luz sobre a composição do óleo essencial, onde a concentração do composto majoritário não foi alterada. Eucaliptol, com alto valor econômico, foi o composto com maior concentração no óleo essencial de *L. filifolia in vitro*.

Palavras-chave: Eucaliptol. Cerrado. Planta aromática. Óleos Essenciais.

ABSTRACT

Lippia filifolia Mart. & Shauer belongs to the Verbenaceae family and is endemic to the Cerrado biome. This species has medicinal potential due to the production of volatile compounds that constitute its essential oil. The objective of this study was to evaluate the effects of light quality using light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* growth and development of *L. filifolia* and on the production of volatile compounds. Four treatments were developed according to the wavelength of the white (control), blue, red and red/blue combination of LEDs. After 45 days, biometric and biochemical parameters were analyzed. The quality of light influenced on seedling growth and metabolism. The seedlings showed higher heights under red and white light and greater accumulation of biomass, shoots and internodes under the combination of red/blue LEDs. The highest total carbohydrate content was observed in the combination of red/blue LEDs, while the white light provided a higher content of photosynthetic pigments. There was little influence of the quality of light on the composition of the essential oil, in which the concentration of the major compound was not changed. Eucalyptol, with high economic value, was the compound with the highest concentration in the essential oil of *in vitro* *L. filifolia*.

Keywords: Eucalyptol. Cerrado. Aromatic plant. Essential oils.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	9
1. INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 <i>Lippia filifolia</i> Mart. & Schauer	12
2.2 Óleos Essenciais	13
2.3 <i>Light-emitting diode</i> (LED)	14
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO II	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1 Condições gerais do experimento e estabelecimento <i>in vitro</i> da cultura	24
2.2 Comprimento de onda	25
2.3 Análises Biométricas	25
2.4 Análises Bioquímicas	25
2.4.1 Pigmentos Fotossintetizantes	26
2.4.2 Conteúdo de proteínas e atividade da enzima Fenilalanina amônialiase (PAL)	26
2.4.3 Peroxidação Lipídica	27
2.4.4 Análises de carboidratos	28
2.4.5 Análise química do óleo essencial	29
2.5 Análises Estatísticas	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1 Análises Biométricas	29
3.2 Análises Bioquímicas	32
3.2.1 Pigmentos fotossintetizantes	32
3.2.2 Atividade da enzima PAL	34
3.2.3 Peroxidação Lipídica	35
3.2.4 Teores de carboidratos	36
3.2.5 Composição do óleo essencial	38
4. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

CAPÍTULO I

REVISÃO GERAL

LAVRAS

2020

1. INTRODUÇÃO

A família Verbenaceae engloba importantes espécies com potencial econômico devido suas características aromáticas, especialmente as pertencentes ao gênero *Lippia*, com destaque para produção dos óleos essenciais que confere às espécies propriedades medicinais (OLIVEIRA et al., 2014). *Lippia filifolia* Mart. & Shauer é uma espécie endêmica dos campos rupestres, localizada na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, com a vegetação do tipo cerrado (lacto sensu) e solo pobre e rochoso (BRASIL, 2020). Campos Rupestres apresentam vegetações altamente diversificadas devido às suas condições ambientais extremas e a grande diferença espacial de onde se encontram, sendo evidente uma elevada concentração de espécies endêmicas (RAPINI et al., 2008). *L. filifolia* além de endêmica, apresenta importância medicinal reconhecida devido a produção de metabólitos essenciais que compõem o óleo essencial (PEIXOTO et al., 2006), sendo assim uma importante espécie que pode ser utilizada nos hospitais públicos como fitoterápicos (SOUSA et al., 2008).

Terpenos, principalmente monoterpenos, são os metabólitos secundários encontrados em maiores concentrações nas folhas de *L. filifolia*, como por exemplo a cânfora e o limoneno (SINGULANI et al., 2012). A cânfora é relacionada a ação anti-inflamatória em humanos (BORGES et al., 2017), enquanto o limoneno é responsável por diferentes funções medicinais, como ação contra tumores em mamíferos, além de ser um importante medicamento nas terapias contra câncer (DE RESENDE et al., 2015). Plantas produtoras desses compostos podem ser propagadas em ambientes controlados com a finalidade de aumentar sua produção. O cultivo *in vitro* facilita a produção de compostos de interesse, já que o fotoperíodo, irradiância e os comprimentos de onda podem ser ajustados de diferentes formas (SÁEZ et al., 2013).

A micropropagação é uma importante ferramenta para produção em larga escala de plântulas de variadas espécies, colaborando assim para propagação de espécies medicinais, onde estudos com uma grande variedade de indivíduos com o mesmo material genético são necessários para a melhor compreensão da produção de seus compostos (ROUT, SAMANTARAY, 2000; MORAIS et al., 2012). No cultivo *in vitro*, a luz é um dos fatores mais relevantes que exerce forte influência no crescimento e regeneração das plântulas (FARHADI et al. 2017). Além disso, a luz afeta direta e indiretamente a produção de compostos em espécies medicinais, que estão associados à síntese de metabólitos secundários que compõem os óleos essenciais, já que estes são oriundos de compostos do metabolismo

primário (LAZZARINI et al., 2018). Os Diodos Emissores de Luz (LEDs), principalmente o LED azul e o LED vermelho, possuem ação registrada no melhoramento do crescimento vegetal, na morfogênese e na indução de maior produção de compostos voláteis em comparação com as plantas cultivadas sob luzes fluorescentes, que são comumente utilizadas nas salas de crescimento (ANDRADE et al., 2015; MANIVANNAN et al., 2017). Quando, por exemplo, o efeito da qualidade da luz sobre o conteúdo de metabólitos secundários de uma espécie medicinal, *Myrtus communis* L., foi avaliado, o maior conteúdo de flavonoides foi observado no tratamento com luz vermelha (CIOĆ et al., 2018).

Dessa forma, o LED é uma importante ferramenta para estudar o funcionamento da planta além das análises convencionais de pigmentos fotossintéticos, que estão diretamente relacionados com a luz. É possível analisar também o efeito da qualidade luminosa sobre o conteúdo de malondialdeído (MDA) e da atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase (PAL). Estudar o conteúdo de MDA é importante por ser o principal indicativo para mensurar a extensão da peroxidação lipídica (MA et al., 2017), onde provavelmente o aumento do seu conteúdo está relacionado com a ocorrência de estresse oxidativo (HENDGES et al., 2015). Enquanto isso, a PAL é uma enzima chave que está envolvida na via dos fenilpropanoides e na consequente formação de flavonoides (DLUGOSZ-GROCHOWSKA et al., 2016). Os flavonoides, além de estarem envolvidos na defesa da planta (AZUMA et al., 2012), proporcionam ações benéficas para saúde humana no tratamento contra diversas doenças (CIANCOLINI et al., 2013). Diante disso, o uso de LEDs combinado com a técnica de propagação *in vitro* pode ser uma ferramenta importante para proporcionar o aumento na produção de compostos de interesse em espécies endêmicas com importância medicinal e econômica.

Considerando que espécies endêmicas ocorrem em populações geralmente pequenas e que a área de sua habitação sofre ações antropológicas e ambientais severas (MENEZES, GIULIETTI, 1986), a propagação em larga escala via cultivo *in vitro* de *L. filifolia*, uma espécie endêmica pouco explorada e com importante potencial medicinal, requer uma atenção maior. Tal campo de pesquisa se torna ainda mais explorável quando há a possibilidade de agregar técnicas biotecnológicas promissoras, como o uso de LEDs. Portanto, objetivou-se estudar o uso de lâmpadas LEDs coloridas, como fonte luminosa monocromática e dicromática, na propagação *in vitro* e produção de compostos voláteis de *L. filifolia*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Lippia filifolia* Mart. & Schauer

A família Verbenaceae compreende cerca de 36 gêneros e 1000 espécies de plantas distribuídas pelas regiões tropicais (SOUZA, LORENZI, 2012), sendo o Brasil o país com maior diversidade de táxons, com aproximadamente 16 gêneros e 290 espécies vegetais (SALIMENA, MÚLGURA, 2015). As plantas pertencentes a essa família geralmente apresentam forma de arbustos ou subarbustos (COSTA et al., 2017).

Entre todos os gêneros que pertencem a família Verbenaceae, destaca-se *Lippia*, integrando cerca de 200 espécies com marcante aparência e odor agradável (OLIVEIRA et al., 2006). A cadeia do Espinhaço, localizada no estado de Minas Gerais, e na Chapada Diamantina, no estado da Bahia, são os dois principais centros de diversidade do gênero (PEIXOTO et al., 2006). Esse gênero apresenta importante utilidade medicinal popular, como efeito em distúrbios gastrointestinais e doenças respiratórias (PASCUAL et al., 2001 ; DE ALMEIDA et al., 2018), devido a produção de óleos essenciais que são utilizados como agentes antifúngicos, antimicrobianos, larvicidas e anestésicos (LINDE et al., 2010).

Com características aromáticas, *L. filifolia* é um arbusto com altura variando de 0,5 a 1 metro, possui ramos glabrosos ou glandulares, as folhas são densamente glandulares e as flores possuem coloração amarela ou alaranjada (PEIXOTO et al., 2006) (Figura 1). Suas sementes são as únicas reportadas como fotoblásticas negativas do gênero *Lippia*, com alta taxa de germinação nessa condição, além disso, o florescimento da espécie ocorre no período chuvoso entre os meses de janeiro e agosto (PIMENTA et al., 2007). Dessa forma, métodos que preservem e proporcionem maior taxa de produção da espécie são necessários.

Levando em conta que a cadeia do espinhaço possui histórico de destruição pela atividade de mineradoras e garimpos, atividade comum na região (MENEZES, GIULIETTI, 1986), e que por isso muitas espécies endêmicas correm risco de extinção, estudos com espécies do gênero *Lippia*, com importância econômica e medicinal já conhecida, colaboram para maior propagação e conservação de espécies endêmicas (PEIXOTO et al., 2006). *L. filifolia*, além de nativa e endêmica do Brasil, apresenta uma distribuição confirmada em um bioma com características específicas, além de ser medicinalmente importante, no entanto suas sementes são recalcitrantes e fotoblásticas negativas, dificultando sua propagação pelos métodos convencionais (PEIXOTO et al., 2006).

Figura 1 - *L. filifolia* no seu habitat natural, Campos Rupestres - MG

Fonte: Cedido pelo Prof. Paulo H. P. Peixoto (2007)

2.2 Óleos Essenciais

Os metabólitos secundários, também denominados de fitoquímicos, são compostos químicos produzidos pelas plantas por meio de várias rotas metabólicas, com a principal função de defesa vegetal contra ataque de patógenos e herbívoros, além de estresses abióticos, como por exemplo, altos níveis de radiação ultravioleta (HOLOPAINEN et al., 2018). Uma classe dos diversos metabólitos secundários são os terpenos (KOPSELL, SAMS, 2013), que incluem pigmentos como os carotenoides e os compostos voláteis como os monoterpenos e sesquiterpenos, importantes constituintes dos óleos essenciais (HAJLAOUI et al., 2010).

Os óleos essenciais produzidos pelas plantas são oriundos do metabolismo secundário e são compostos ricos em substâncias bioativas (MEDEIROS et al., 2011). Para as plantas, funcionam com uma forma de atração de insetos ou animais polinizadores, ocasionando na disseminação de sementes ou até proporcionar uma defesa contra os ataques de herbívoros e patógenos (COSTA et al., 2015). Para o ser humano, efeitos benéficos já estão sendo relatados por meio de diversos estudos, como ação contra doenças gastrointestinais e

respiratórias, por exemplo (ALVARENGA et al., 2015; BATISTA et al., 2016; LAZZARINI et al., 2018).

Lippia alba apresenta diferentes monoterpenos na composição do seu óleo essencial (PANDELÓ et al., 2012), que possui diversos benefícios para saúde humana, como funções analgésica, anti-inflamatória e antifúngica (OLIVEIRA et al. 2014). Enquanto isso, o óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer apresenta atividades antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória, além de acaricida, principalmente pela presença de monoterpenos de timol e carvacrol na sua composição (SANTOS et al. 2016). Já em *L. filifolia* outros diversos monoterpenos constituem seu óleo essencial, como cânfora, canfene e limoneno (SINGULANI et al., 2012). Cada um dos compostos pode apresentar uma ação que confere à planta função medicinal, como por exemplo, o limoneno pode ser usado no tratamento contra o câncer (DE RESENDE et al., 2015), sendo dessa forma, importante a realização de estudos da produção alternativa desses compostos.

Pesquisas envolvendo o cultivo *in vitro* de plantas medicinais e aromáticas demonstram que a qualidade e intensidade luminosa influenciam a produção de compostos que estão relacionados diretamente com a biossíntese de metabólitos secundários e, conseqüentemente, podem alterar a formação e constituição dos óleos essenciais (BATISTA et al., 2016). Para *Lippia rotundifolia* Cham., por exemplo, as plântulas crescidas sob LED azul apresentaram maior conteúdo de mirceno e limoneno (DE HSIE et al., 2019), enquanto para *Myrtus communis* L., outra espécie medicinal, o maior conteúdo de flavonoides foi sempre observado sob luz vermelha, quando apenas o efeito da luz sobre o conteúdo de metabólitos secundários foi considerado (CIOĆ et al., 2018).

2.3 Light-emitting diode (LED)

Diferentemente das tradicionais lâmpadas utilizadas, como as fluorescentes, LEDs não utilizam um filamento ou descarga de gás (MITCHELL et al., 2015), sendo o movimento de elétrons por meio de um material semicondutor a fonte produtora da iluminação (HELD, 2009). Dessa forma, ao contrário das lâmpadas fluorescentes que devem ser substituídas periodicamente e apresentam alto consumo de energia elétrica enquanto geram calor (GUPTA, JATOTHU, 2013), os LEDs possuem a capacidade de produzir um fluxo luminoso alto com baixa emissão de calor e manter sua eficácia por anos (SINGH et al., 2015). Além disso, os LEDs apresentam a versatilidade de exibir apenas o comprimento de onda desejado,

sem necessidade de uso de filtros de cores como é exigido para a iluminação tradicional (GUPTA, JATOTHU, 2013).

Os LEDs podem ser brancos ou monocromáticos, sua cor é determinada pelo intervalo de energia do semicondutor utilizado e estão disponíveis em diversos comprimentos de onda, desde o ultravioleta (250 nm) até o infravermelho (1000 nm) (MITCHELL et al., 2015). Dessa forma, os LEDs podem ser modulados para promover uma iluminação mais uniforme e, devido seu comprimento de onda ser mais estreito e estável, podem ser combinados (exemplo: LED azul + LED vermelho) para produzir o espectro desejado (SHUKLA et al., 2017).

Embora os LEDs apresentem mais características positivas que negativas se comparados às lâmpadas tradicionais, como as fluorescentes, existem desvantagens que podem dificultar o seu uso. Um dos principais pontos negativos é que um elemento individual dentro do sistema de iluminação por LED não pode ser substituído como acontece nas lâmpadas tradicionais, assim, se uma das luzes LED se apagar, deve haver a troca de toda unidade (GUPTA, JATOTHU, 2013). No entanto, os LEDs continuam sendo considerados a fonte luminosa mais econômica, potente e eficiente (ALVARENGA et al., 2015).

A qualidade da luz apresenta maior influência no crescimento e desenvolvimento das plantas se comparado aos outros fatores ambientais, como fotoperíodo e intensidade luminosa (WANG et al., 2016). Em ambientes naturais, as plantas são adaptadas às variações na intensidade e composição espectral da luz do dia, onde a disponibilidade de luz visível na radiação fotossinteticamente ativa (PAR, 400-700 nm), com picos de absorbância nas regiões azul (420-490 nm) e vermelha (620-660 nm), é a principal responsável por induzir respostas de crescimento das plantas (HOLOPAINEN et al., 2018). A partir do aparecimento e avanço dos LEDs, o fornecimento de uma fonte luminosa alternativa promissora para o crescimento das plantas se tornou possível (YEH, CHUNG, 2009).

No cultivo *in vitro*, lâmpadas fluorescentes são comumente utilizadas para aumentar o nível de fluxo de fótons fotossintéticos, simulando a luz solar, no entanto sua irradiação máxima geralmente é fora dos picos de absorção da planta, além de não ser possível afirmar com precisão os comprimentos de onda utilizados (GUPTA, JATOTHU, 2013). Recentemente, com o avanço da tecnologia, o uso de LEDs como fonte luminosa para as plantas atraiu significativo interesse nas pesquisas.

A luz apresenta participação ativa nos processos metabólicos das plantas e o cultivo *in vitro* é uma importante ferramenta que possibilita a propagação em larga escala com produção de compostos de interesse, uma vez que apresenta versatilidade ao permitir alterar a qualidade

e intensidade luminosa, assim como o fotoperíodo (SAÉZ et al., 2013). Dessa forma, combinar essas duas vertentes possibilita a obtenção de interessantes resultados. Existem relatos que o uso de LEDs no cultivo *in vitro* proporciona respostas específicas do crescimento, desenvolvimento e produção de compostos ativos (ALVARENGA et al., 2015).

Muitos trabalhos são encontrados demonstrando que LEDs azuis monocromáticos proporcionam maiores conteúdos de pigmentos (MENGXI et al., 2011; PAWLOWSKA, 2017; LAZZARINI et al., 2018). Isso se deve ao fato da luz azul ter ação ativa sobre o desenvolvimento do cloroplasto, além de apresentar uma possível relação com a expressão de genes relacionados à síntese de clorofila (LI et al., 2017). Enquanto isso, a lâmpada LED vermelha é capaz de emitir espectro de luz próximo da absorbância da clorofila e fitocromos (MUNEER et al. 2014), o que pode ocasionar em maior crescimento para plântulas cultivadas *in vitro*, como foi observado no estudo com uma planta medicinal, *M. communis*, em que a maior altura das brotações foi registrada no tratamento com LED vermelho (CIOĆ et al., 2018).

É evidente que as luzes vermelha e azul apresentam impacto no crescimento e biossíntese de metabólitos secundários nas plantas, pois constituem as principais fontes de energia para a assimilação fotossintética de CO₂ (LIN et al., 2013). Dessa forma, a combinação do LED azul com o LED vermelho, em muitos estudos, apresentou os melhores resultados para as análises biométricas de forma geral, como maior acúmulo de biomassa e maior taxa de crescimento (LIU et al., 2014; HUNG et al., 2016; HSIE et al., 2019). Provavelmente esse fato ocorra porque a condutância estomática e, conseqüentemente, as taxas fotossintéticas tendem a aumentar quando a luz azul é complementada com a vermelha, resultando em maior crescimento e acúmulo de biomassa (TANAKA et al., 2009).

Apesar de cada tipo de luz ter sua ação já conhecida, as respostas morfológicas e fisiológicas das plantas crescidas sob LEDs diferem em relação ao comprimento de onda utilizado e a espécie escolhida, estágio de desenvolvimento e tipo do explante. Dessa forma, é extremamente importante novas pesquisas utilizando LEDs como fonte luminosa com diferentes espécies para melhor compreensão do efeito da qualidade da luz no crescimento e desenvolvimento vegetal, colaborando assim para futuras pesquisas.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, Ivan Caldeira Almeida et al. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.
- ANDRADE, H. B. et al. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit *in vitro* plantlets. In: **VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155**, p. 277-284, 2015.
- AZUMA, Akifumi et al. Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions. **Planta**, v. 236, n. 4, p. 1067-1080, 2012.
- BATISTA, Diego Silva et al. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, n. 3, p. 276-282, 2016.
- BORGES, Raphaelle Sousa et al. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 183-195, 2018.
- BRASIL, Flora do. em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115> (acesso em 08/06/2018), 2020.
- CIANCOLINI, Anna et al. Selection of Italian cardoon genotypes as industrial crop for biomass and polyphenol production. **Industrial crops and products**, v. 51, p. 145-151, 2013.
- CIOĆ, Monika et al. LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 3, p. 433-447, 2018.
- COSTA, Patrícia Silva et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 158-171, 2017.
- DE ALMEIDA, Wanessa Sales et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina* Cham. (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 236-240, 2018.
- DE HSIE, Bety Shiue et al. Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 198, p. 111577, 2019.
- DŁUGOSZ-GROCHOWSKA, Olga; KOŁTON, Anna; WOJCIECHOWSKA, Renata. Modifying folate and polyphenol concentrations in Lamb's lettuce by the use of LED supplemental lighting during cultivation in greenhouses. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 228-237, 2016.

- DO BRASIL, Lista. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v. 18, 2015.
- DOS SANTOS, Clesivan Pereira et al. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 205-210, 2016.
- FARHADI, Nasrin et al. Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot (*Allium hirtifolium*). **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 80-86, 2017.
- GUPTA, S. Dutta; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 211-220, 2013.
- HAJLAOUI, H. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of five Tunisian aromatic plants. **Italian Journal of Food Science**, v. 22, n. 3, p. 320-329, 2010.
- HELD, Gilbert. Introduction to light emitting diode technology and applications. **Auerbach Publications**, 2016.
- HOLOPAINEN, J. K.; KIVIMÄENPÄÄ, M.; JULKUNEN-TIITTO, R. New Light for Phytochemicals. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 7–10, 2018.
- HUNG, Cao Dinh et al. LED light for in vitro and ex vitro efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 6, p. 152, 2016.
- KOPSELL, Dean A.; SAMS, Carl E. Increases in shoot tissue pigments, glucosinolates, and mineral elements in sprouting broccoli after exposure to short-duration blue light from light emitting diodes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 138, n. 1, p. 31-37, 2013.
- LAZZARINI, Luiz Eduardo Santos et al. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, n. 3, p. 367-379, 2018.
- LIN, Kuan-Hung et al. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 86-91, 2013.
- LINDE, Johan H. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 1, p. 37-42, 2010.
- LIU, Mengxi et al. Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets in vitro under different light spectra. **Scientia horticulturae**, v. 174, p. 112-118, 2014.

MA, Dongyun et al. Physiological responses and yield of wheat plants in zinc-mediated alleviation of drought stress. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 860, 2017.

MANIVANNAN, Abinaya et al. Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of in vitro-grown carnations ‘Green Beauty’ and ‘Purple Beauty’. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 58, n. 1, p. 12-20, 2017.

MENEZES, Nanuza Luiza de; GIULIETTI, Ana Maria. Campos rupestres: paraíso botânico na Serra do Cipó. **Ciência Hoje**, v. 5, n. 25, p. 38-44, 1986.

MENGXI, Liu et al. Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 1, p. 1-10, 2011.

MITCHELL, Cary A. et al. Light-emitting diodes in horticulture. **Horticultural reviews**, v. 43, p. 1-87, 2015.

MORAIS, Tâmara Prado de, et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MUNEER, Sowbiya et al. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 4657-4670, 2014.

OLIVEIRA, Danilo R. et al. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 206-214, 2014.

OLIVEIRA, Danilo R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 103-108, 2006.

OLIVEIRA, Graziela Teixeira de et al. In vitro antifungal activities of leaf extracts of *Lippia alba* (Verbenaceae) against clinically important yeast species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 247-250, 2014.

PANDELÓ, Diego et al. Oil production at different stages of leaf development in *Lippia alba*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 497-501, 2012.

PASCUAL, Maria Elena et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

PAWŁOWSKA, Bożena et al. Impact of LED light sources on morphogenesis and levels of photosynthetic pigments in *Gerbera jamesonii* grown *in vitro*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 115-123, 2018.

PEIXOTO, Paulo Henrique Pereira et al. In vitro propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. and Schauer ex Schauer. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, n. 6, p. 558-561, 2006.

PIMENTA, Maiana R. et al. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia L.* (Verbenaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 2, p. 211-220, 2007.

POUDEL, Puspa Raj; KATAOKA, Ikuo; MOCHIOKA, Ryosuke. Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 92, n. 2, p. 147-153, 2008.

RAPINI Alessandro et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 16-23, 2008.

RESENDE, Cristiano Ferrara de et al. In vitro propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n. 3, p. 582-589, 2015.

ROUT, Gyana Ranjan; SAMANTARAY, Sanghamitra; DAS, Preraananda, K. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 2, p. 91-120, 2000.

SÁEZ, Pablo J. et al. ATP is required and advances cytokine-induced gap junction formation in microglia *in vitro*. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

SÁEZ, Patricia L. et al. Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant science**, v. 201, p. 12-24, 2013.

SALIMENA, Fátima Regina Gonçalves; MÚLGURA, Maria Ema. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p. 191-197, 2015.

SHUKLA, Mukund R. et al. Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems. **Plant Methods**, v. 13, n. 1, p. 6, 2017.

SINGH, Devesh et al. LEDs for energy efficient greenhouse lighting. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 139-147, 2015.

SINGULANI, Junya de Lacorte et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6(27), p. 4416-4422, 2012.

SOUSA, Francisca CF et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SOUZA, Vinicius Castro; LORENZI, Harri. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. [S.l: s.n.], 2012.

TANAKA, Toshiya; HARUYAMA, Shinichiro. New position detection method using image sensor and visible light LEDs. In: **2009 Second International Conference on Machine Vision**, IEEE., p. 150-153, 2009.

WANG, Jun et al. Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 250, 2016.

YEH, Naichia; CHUNG, Jen-Ping. High-brightness LEDs—Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 8, p. 2175-2180, 2009.

CAPÍTULO II

ARTIGO: LEDS NO CULTIVO *in vitro* E NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Lippia filifolia* Mart. & Shauer

Norma do periódico (versão preliminar)

LAVRAS

2020

RESUMO

Lippia filifolia Mart. & Shauer é uma espécie medicinal, endêmica do cerrado, aromática e produtora de óleos essenciais. Os terpenos são os compostos bioativos produzidos por essa espécie. Esse é um estudo pioneiro ao avaliar o efeito da qualidade luminosa no crescimento, desenvolvimento e na produção de compostos voláteis *in vitro* de *L. filifolia*. O efeito da qualidade da luz foi avaliado por meio dos tratamentos com LEDs: branco (controle), vermelho, azul e a combinação vermelho/azul. Aos 45 dias de experimento, parâmetros biométricos, conteúdo de pigmentos fotossintetizantes, atividade específica da enzima PAL, conteúdo de MDA, concentração de carboidratos e o perfil do óleo essencial foram analisados. A qualidade da luz influenciou significativamente o crescimento *in vitro* de *L. filifolia*, assim como o metabolismo das plântulas. A combinação dos LEDs vermelho/azul se destacou ao induzir, de forma geral, maior acúmulo de biomassa, número de brotações, entrenós e maior taxa de carboidratos para as plântulas cultivadas sob esse tratamento. Além disso, não alterou a concentração do composto majoritário do óleo essencial, eucaliptol, que apresenta reconhecido valor econômico.

Palavras-chave: Qualidade luminosa. Eucaliptol. Óleo Essencial.

1. INTRODUÇÃO

Lippia filifolia Mart. & Shauer é uma espécie endêmica dos campos rupestres, encontrada na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais. Com características aromáticas, essa espécie é um arbusto com altura aproximada de 1 metro, possui folhas densamente glandulares e as flores possuem coloração amarela ou alaranjada (PEIXOTO et al., 2006). Essa espécie possui características medicinais atribuídas a produção dos metabólitos secundários que constituem o óleo essencial, principalmente monoterpenos como cânfora e limoneno (SINGULANI et al., 2012). A cânfora possui ação anti-inflamatória (BORGES et al., 2017), enquanto o limoneno tem ação importante no tratamento do câncer (RESENDE et al., 2015). Dessa forma, técnicas que possibilitem aumentar a produção desses compostos são importantes para a indústria farmacêutica e comércio, além de aumentar a propagação de espécies endêmicas (SÁEZ et al., 2013).

A cultura de tecidos de plantas é uma forma utilizada para aumentar a produção de biomassa e metabólitos secundários e, combinada com o uso de LEDs, promove interessantes resultados, como, por exemplo, a utilização do LED azul, que aumenta o acúmulo de compostos bioativos em *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (Brahmi), uma importante espécie medicinal (WATCHARATANON et al., 2019). Além disso, é uma importante ferramenta para a rápida propagação e conservação de plantas raras e ameaçadas (GUPTA, JATOTHU, 2013). Isso é possível devido a versatilidade do cultivo *in vitro* de permitir alterar a qualidade e intensidade luminosa, assim como o fotoperíodo e temperatura (SAÉZ et al., 2013). Vários

fatores influenciam o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*, no entanto, dentre os diversos fatores, a luz é o mais importante (GUPTA, JATOTHU, 2013).

A luz constitui a fonte de energia primária para o crescimento vegetal e o diodo emissor de luz (LED) é uma importante fonte alternativa de iluminação artificial (DARKO et al., 2014). Os LEDs estão sendo cada vez mais utilizados como fonte luminosa nas salas de crescimento dos laboratórios de cultura de tecido devido a ampla gama de vantagens sobre o sistema de iluminação convencional, lâmpadas fluorescentes, como comprimento de onda específico, alta durabilidade e não emissão de calor (AGARWAL, GUPTA 2016; BELLO-BELLO et al., 2017; SHUKLA et al. 2017).

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da qualidade da luz utilizando LEDs coloridos como fonte luminosa monocromática e dicromática na propagação *in vitro* da *L. filifolia*, visando entender o crescimento e desenvolvimento dessa espécie nessas condições e na produção de compostos voláteis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condições gerais do experimento e estabelecimento *in vitro* da cultura

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecido de Plantas, situado no setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. Todas as plantas utilizadas durante o estudo foram oriundas da coleção *in vitro* do Laboratório de Fisiologia Vegetal, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). A coleção é constituída de plantas coletadas no Campo Rupestre – Minas Gerais (lat: -18.297 167 e long: -43.839 WGS84), sob número do voucher CESJ 49008, depositado no herbário Leopoldo Krieger na UFJF. Este trabalho foi registrado na plataforma SisGen (Registro C6A094D) do banco de *Lippias*, de acordo com a Lei da Biodiversidade Brasileira nº. 13.123/2015.

Para o estabelecimento *in vitro* das plantas, foi seguido o protocolo descrito e detalhado por Peixoto e colaboradores (2006) com modificações, sem o uso de reguladores de crescimento, onde segmentos caulinares (1 a 2 cm) foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de ágar ($7,0 \text{ g L}^{-1}$) e sacarose (30 g L^{-1}). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$; 1,1 atm durante 21 min. Em seguida as plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$

± 2 °C, fotoperíodo de 16 h com 36 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz fornecida por quatro lâmpadas LEDs brancas. As plântulas cresceram por 45 dias nas salas de crescimento.

2.2 Comprimento de onda

Segmentos nodais (1 a 2 cm) de plântulas pré-estabelecidas foram cultivados em meio MS sem uso de reguladores de crescimento.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos, com 100 plântulas cada, utilizando lâmpadas de LED sob diferentes comprimentos de onda monocromáticos ou em combinação medidos com um espectroradiômetro (Figura 1), detalhados a seguir:

Tratamento 1 (controle): Lâmpadas de LED brancas (400-700 nm);

Tratamento 2: Lâmpadas de LED azul (pico em 450 nm);

Tratamento 3: Lâmpadas de LED vermelho (pico em 650 nm);

Tratamento 4: Lâmpadas de LEDs vermelho (2 lâmpadas) e azul (1 lâmpada) combinados na proporção de 67% de luz vermelha e 33% de luz azul.

A intensidade luminosa média estabelecida para todos os tratamentos foi de 36 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medida por meio do *Infrared Gas Analyser* (IRGA).

2.3 Análises Biométricas

As análises biométricas das plântulas constaram da avaliação, após 45 dias de cultivo *in vitro*, das seguintes variáveis: comprimento da plântula, número de brotações e entrenós, assim como acúmulo de biomassa fresca por meio da massa em gramas. Para essas análises, 21 plântulas foram fotografadas e as variáveis foram medidas pelo programa *ImageJ*®.

2.4 Análises Bioquímicas

Partes aéreas inteiras frescas de cada plântula (folhas e caules) foram utilizadas para todas as análises e os dados enzimáticos foram expressos de acordo com a atividade específica de cada enzima (ou seja, com base no teor de proteínas de cada amostra). As amostras vegetais foram armazenadas a - 80 °C até o momento de suas análises. Para cada análise, 12 repetições foram utilizadas.

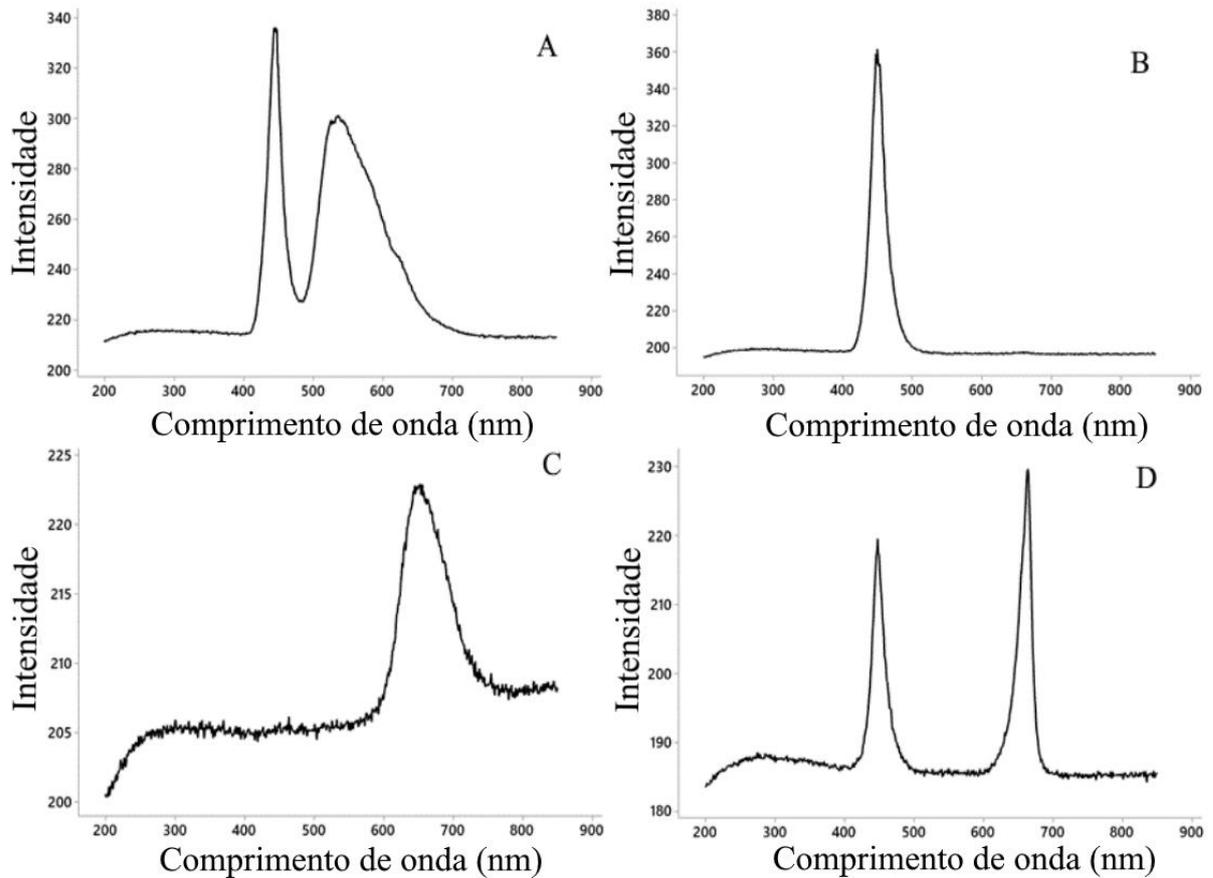


Figura 1: Caracterização espectral dos diodos emissores de luz (LEDs): (a) Tratamento 1 (controle): Lâmpadas de LED brancas (400-700 nm); (b) Tratamento 2: Lâmpadas de LED azul (450 nm); (c) Tratamento 3: Lâmpadas de LED vermelho (650 nm); (d) Tratamento 4: Lâmpadas de LED com combinação de 2 (duas) vermelha: 1(uma) azul.

2.4.1 Pigmentos Fotossintetizantes

A extração e quantificação de clorofilas e carotenoides foi realizada de acordo com o método de Lichtenthaler e Buschmann (2001), com modificações. Para isso, 200 mg de matéria fresca foram imersas em 10 mL de acetona 80% (v/v) durante 15 dias. Ao final, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro: 663,2 nm para clorofila a, 646,8 nm para clorofila b e 470 nm para carotenoides.

2.4.2 Conteúdo de proteínas e atividade da enzima Fenilalanina amônia-ase (PAL)

A atividade da PAL foi determinada de acordo com o método estabelecido por Mehta e Bhavnarayana (1981). Inicialmente, 300 mg do material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido e PVPP. Em seguida, o macerado foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5). O extrato foi centrifugado a 14.000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e colocado em uma placa de Elisa UV, contendo o meio de reação,

em banho-maria a 38 °C por 60 minutos. O meio de reação foi composto por 19,8 µL de tampão Tris-HCl 40 mM (pH 8,8) e 9,8 µL de L-fenilalanina 87,5 mM, sendo 161 µL do meio de reação para cada amostra. Após o tempo de reação, foi adicionado 10 uL de HCl 6M em cada amostra para que a mesma fosse paralisada e, as leituras de absorvância das amostras realizadas no espectrofotômetro a 280 nm com uma alíquota de 9 uL.

A determinação das proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976). Para tanto, foram utilizados os reagentes: corante Comassie Blue G-250, H₃PO₄ 85% (v/v), e etanol 95% (v/v). Em seguida, foi utilizada uma alíquota de 6 µL do sobrenadante homogeneizado para determinação da PAL e 294 µL do reagente preparado. Logo após, a absorvância de cada amostra foi lida em um espectrofotômetro a 595 nm, sendo o teor de proteínas determinado por intermédio de curva de calibração, utilizando BSA (albumina de soro bovino) 1 mg mL⁻¹ como padrão.

2.4.3 Peroxidação Lipídica

Para a quantificação da peroxidação lipídica foi utilizado o método do ácido tiobarbitúrico, de acordo com o que foi descrito por Buege e Auye (1978), com modificações referentes a quantidade de matéria fresca utilizada. Dessa forma, 400 mg de cada uma das amostras vegetais foram maceradas em de nitrogênio líquido e PVPP. Em seguida, o resultante foi homogeneizado em 1500 uL de TCA 1% (v/v) e centrifugado a 12000 g por 15 min a 4 °C. Logo após, foi retirada a alíquota de 250 µL do sobrenadante e pipetada em eppendorf contendo 250 µL do meio de reação composto por ácido tiobarbitúrico 0,5% e TCA 20%. Após esta mistura, ambos foram mantidos em banho maria a 95 °C durante 30 min e, posteriormente, colocados em banho com gelo, visando a paralisação da reação. Em seguida, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. Por meio de cálculos específicos, a peroxidação lipídica foi expressa por ηmol MDA.

2.4.4 Análises de carboidratos

Para a quantificação dos açúcares solúveis (AST) totais foi utilizado o método da antrona (hidroxiantraceno) (YEMM e WILLIS, 1954). Para isto, foi pesado 40 mg de antrona e logo após foi adicionado 1,0 mL de água destilada. Posteriormente, foi adicionado 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). Foi adicionado 0,6 mL de extrato bruto e, depois, o reagente antrona. Após a preparação da solução, os tubos foram agitados em vortex

e levados a banho-maria 100°C por três minutos. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620nm.

Com o intuito de realizar a quantificação de açúcares redutores, foi utilizado o método do DNS, que contém os seguintes reagentes: ácido dinitrossalicílico (DNS), hidróxido de sódio, tartarato duplo de sódio (sal de Rochelle), glicose (10 mM). Para a realização das análises foram realizadas soluções estoque. Nesse sentido, foi adicionado 50 mL de hidróxido de sódio, 2,5g de DNS e 125 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi agitada até a sua total dissolução. Posteriormente, foram adicionados 75g de sal de Rochelle e completados em 250 mL com água destilada. Posteriormente, a solução foi submetida a banho-maria 100°C por cinco minutos. Após o resfriamento, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm.

A extração e a determinação do conteúdo de amido total foram realizadas através do método de McCready et al. (1950). Após uma segunda centrifugação com 2 mL de MCA, o sobrenadante foi descartado e foi usado o precipitado para a quantificação de amido. Foi adicionado ao precipitado 1 mL de álcool etílico 80%, aquecido a 50-60°C, para eliminação do conteúdo de açúcares solúveis totais que ainda estavam presentes nas amostras. Após centrifugação por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a extração do amido foi iniciada a partir do precipitado. O precipitado foi então acrescido de 1 mL de ácido perclórico 30% e centrifugado a 10000 rpm, por 15 minutos. Alíquotas de 1 mL das amostras foram adicionadas em 2mL de antrona 0,2%. Em seguida, as soluções foram agitadas e aquecidas em água fervente, por três minutos. Após resfriamento, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 620 nm. Como padrão foi utilizado glicose (Sigma® G 8270) diluída em ácido perclórico 30%.

2.4.5 Análise química do óleo essencial

Aproximadamente 300 mg de material vegetal fresco foram acondicionados em microtubos de centrífuga de 2 mL, com a adição de 500 µL de hexano. Os microtubos foram fechados e, em seguida, levados para um banho de ultrassom durante 10 minutos, para que houvesse uma melhor extração dos compostos do óleo essencial. Após essa etapa, foi adicionada uma pequena porção de Na₂SO₄ anidro em cada frasco para a remoção da água e foi feita a coleta do extrato utilizando-se uma micropipeta e algodão (que serviu como um filtro). O extrato foi acondicionado no vial de análise e reservado em geladeira até o momento de análise cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Plus;

Shimadzu). Foi utilizada uma coluna Rtx-5MS® (Restek) de 30 m x 0,25 mm. A programação da temperatura do forno começou numa temperatura inicial de 70 °C, mantida por 3 min, seguida por um aumento de 6 °C min⁻¹ até 300 °C. O injetor foi operado no modo split (1:10), à temperatura de 240 °C, a interface e o detector de massas operaram a 300 °C. Utilizou-se hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,53 mL min⁻¹. Uma mistura padrão de hidrocarbonetos lineares (C₉H₂₀; C₁₀H₂₂: ... C₂₅H₅₂ e C₂₆H₅₄) foi injetada nas mesmas condições das amostras. A identificação dos constituintes foi realizada comparando-se os espectros de massa obtidos com os do banco de dados da NIST 9.0 (correlação > 97%) e confirmado pelo seu índice de retenção calculado para cada constituinte e comparado aos dados na literatura (ADAMS, 2007). As concentrações de cada um dos compostos (expressas em porcentagem) foram calculadas de acordo com as áreas dos picos dos resultados.

2.5 Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para todos os experimentos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico RStudio. De acordo com os resultados da ANOVA, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises Biométricas

Os resultados obtidos sugerem que a qualidade da luz influenciou significativamente a altura das plântulas, número de brotações e entrenós, assim como o acúmulo biomassa (Figuras 2 e 3). Após 45 dias de experimento, as maiores médias de altura foram observadas no tratamentos Controle (LED branca) e no tratamento com LED vermelho (Figuras 2A, 3A e 3C). Enquanto isso, a combinação dos LEDs vermelho/azul induziu maior número de brotações e entrenós e maior ganho de biomassa fresca se comparado ao controle (Figuras 2B, 2C e 3D).

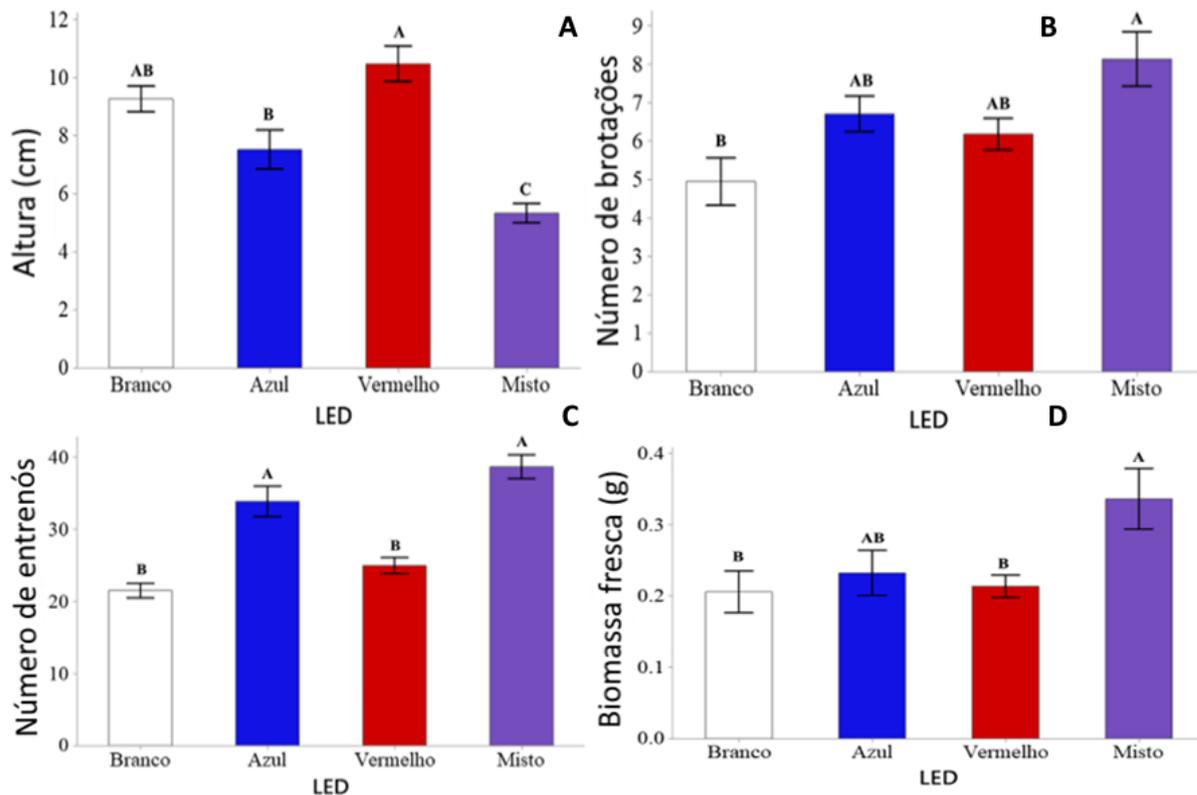


Figura 2: Efeito da qualidade da luz no crescimento e desenvolvimento da *L. filifolia* em um período de 45 dias com uso de diferentes LEDs (branco – 400 – 700 nm; azul – 450 nm; vermelho – 650 nm; combinação 2vermelho/1azul) como fonte luminosa. (A) Altura (cm) das plântulas, (B) número de brotações, (C) número de entrenós e (D) biomassa fresca das plântulas (g). Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Em um estudo com *Lippia gracilis* Schauer, cultivada *in vitro* sob intensidade luminosa de $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, as plântulas sob LEDs vermelho e branco apresentaram as maiores médias de altura, além de ser observado um efeito negativo da luz azul em relação ao crescimento (LAZZARINI et al., 2018). No presente trabalho, que é pioneiro ao testar o efeito da qualidade da luz por meio de LEDs coloridos no crescimento e desenvolvimento de *L. filifolia*, resultados semelhantes foram observados, já que o tratamento com LED vermelho e o controle apresentam as maiores alturas, enquanto o tratamento com LED azul e a combinação vermelha/azul resultaram nas menores médias se comparado ao uso da luz vermelha monocromática como fonte luminosa. Corroborando com esses resultados, HSIE et al., (2019) observaram para *Lippia rotundifolia* Cham. maior altura das plântulas no tratamento com LED vermelho à uma intensidade de $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto o LED azul e a combinação vermelho/azul apresentaram menor crescimento. Em contraste, em determinado estudo com uma espécie com propriedades medicinais, *Achillea millefolium* L., o

maior comprimento da parte aérea foi observado no tratamento com luz monocromática azul a uma intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ALVARENGA et al., 2015).



Figura 3: Plântulas após 45 dias de experimento. (a) Tratamento 1 (controle): Lâmpadas de LED brancas (400-700 nm); (b) Tratamento 2: Lâmpadas de LED azul (pico em 450 nm); (c) Tratamento 3: Lâmpadas de LED vermelho (pico em 650 nm); (d) Tratamento 4: Lâmpadas de LED com combinação de 2 (duas) vermelha: 1(uma) azul.

A luz vermelha exerce ação direta na morfogênese da planta devido, provavelmente, a indução da transformação no fitocromo (LEGRIS et al., 2019), além de ser essencial para o desenvolvimento fotossintético (CHOI et al., 2015). Fitocromos, receptores da luz vermelha e vermelha distante, controlam o desenvolvimento em diversas condições ambientais ao longo de todo o ciclo de vida vegetal (LEGRIS et al., 2019). Isso devido as suas duas formas fotoconversíveis, uma que é sintetizada primeiramente e é inativa (Pr) e outra, após absorção da luz vermelha, que é ativa (Pfr), sendo essa transição necessária para quase todas as respostas conhecidas (LEGRIS et al., 2019). No entanto, no presente estudo, o tratamento combinando as lâmpadas de LED vermelho/azul não resultou em diferenças significativas para altura em relação ao controle e ao tratamento com luz monocromática vermelha, no entanto, foi possível observar maior acúmulo de biomassa e maior número de brotações (Figura 2A, 2D, 3D).

Em um estudo com plântulas de *Lippia alba* Mill. cultivadas *in vitro* sob LEDs coloridos a uma intensidade de $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os níveis mais altos de biomassa foram observados no tratamento com a combinação azul/vermelho (BATISTA et al., 2016). Corroborando com esses resultados, no presente estudo, o maior acúmulo de massa fresca, assim como os maiores números de brotações e entrenós, foram observados na combinação vermelho/azul em relação ao controle (Figura 2B e 2C). Resultados semelhantes foram

encontrados em um estudo com *Pfaffia glomerata* Spreng., uma espécie amplamente utilizada na medicina tradicional, onde o maior acúmulo de biomassa ocorreu, de forma geral, na combinação azul/vermelho, com uma intensidade luminosa de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (SILVA et al., 2019).

O uso da luz vermelha e azul já é conhecido por estimular o acúmulo da biomassa da planta (GOINS et al., 2001; LI et al., 2012), assim como o conteúdo de pigmentos como o carotenoide, sendo então os LEDs com comprimento próximo a 400 nm e 700 nm amplamente utilizados no cultivo *in vitro* como principal fonte de energia para assimilação de carbono (GUPTA, SHAOO, 2015; RAMÍREZ-MOSQUEDA et al., 2017). Isso devido ao fato das luzes vermelha e azul induzirem respostas na planta por meio dos fotorreceptores. Na natureza, normalmente a luz solar ativa mais que um fotorreceptor ao mesmo tempo, que geralmente interagem e dependem um do outro, no entanto, a relação pode mudar de acordo com o ambiente luminoso (CHEN et al., 2017). Dois fotorreceptores, fitocromo B e criptocromo 1, por exemplo, podem ser sinérgicos em certas situações e, em outras, suas ações podem se tornar independentes, ou seja, cada um exercer uma função distinta (CASAL et al., 2000). Quando sinérgicos, o efeito resultante da interação é significativamente maior que o efeito da luz monocromática. A complexidade do efeito da qualidade da luz no desenvolvimento vegetal ainda é alta e difere de acordo com a espécie utilizada e comprimento de onda escolhido.

3.2 Análises Bioquímicas

3.2.1 Pigmentos fotossintetizantes

Os teores de clorofila, *a* e *b*, foram maiores no tratamento controle (LED branco) se comparado com os LEDs vermelho e azul, separadamente e em combinação, assim como o conteúdo de carotenoides (Figura 4).

Estudos relatam que a luz azul promove maior conteúdo de clorofila em comparação com a luz vermelha, resultando em maior eficiência fotossintética (POUDEL et al., 2008; MENGXI et al., 2011; PAWLOWSKA, 2017; LAZZARINI et al., 2018). Isso se deve ao fato de que o desenvolvimento do cloroplasto é promovido com a luz azul em comparação com a luz vermelha, provavelmente apresentando uma relação com a expressão de genes relacionados à síntese de clorofila (LI et al., 2017). No entanto, no presente estudo, o tratamento com LED branco apresentou as maiores médias para todos os resultados obtidos de teores de pigmentos e o tratamento com LED azul as menores médias de clorofila *a*, *b* e

carotenoides em relação ao controle (Figuras 4A, 4B e 4C). Resultados semelhantes foram encontrados em estudo com crescimento *in vitro* de espécie com importância medicinal, *Platycodon grandiflorum* (Jacq.), sob LEDs azuis, vermelhos e combinação azul/vermelho, no qual diferenças significativas não foram encontradas entre os tratamentos, com uma intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no entanto, o conteúdo de pigmentos foi maior em todos se comparado com o controle (lâmpadas fluorescentes) (LIU et al., 2014). Em outro estudo, explantes nodais de *L. gracilis* crescidos sob LED branco apresentaram maior produção de pigmentos fotossintetizantes se comparado aos tratamentos com LEDs azul, vermelho e a combinação azul/vermelho (LAZZARINI et al., 2018).

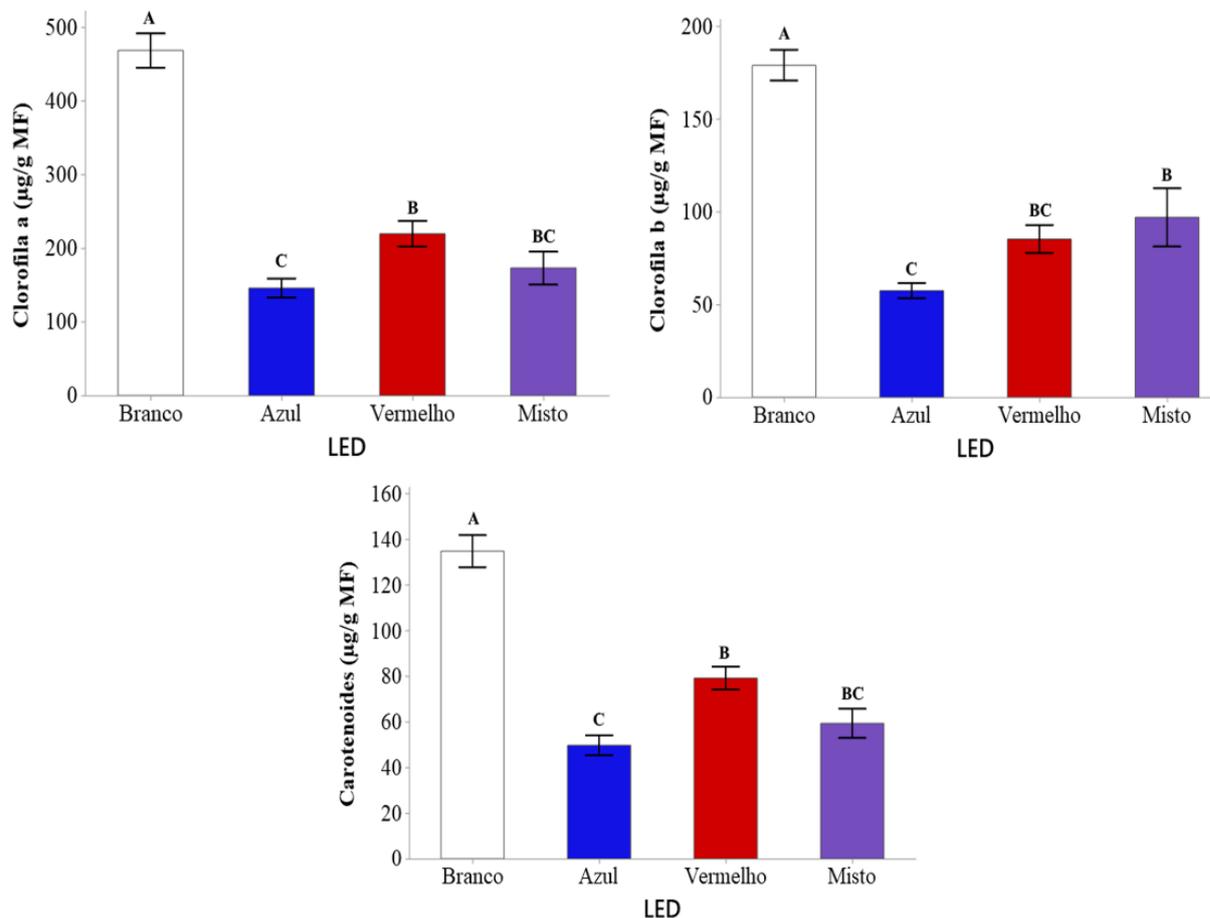


Figura 4: Conteúdo de pigmentos fotossintetizantes sob diferentes LEDs (branco – 400 – 700 nm; azul – 450 nm; vermelho – 650 nm; combinação 2vermelho/1azul). (A) Clorofila a ($\mu\text{g/g}$ de matéria fresca - MF), (B) Clorofila b ($\mu\text{g/g MF}$), (C) Carotenoides ($\mu\text{g/g MF}$). Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

A condutância estomática e, conseqüentemente, as taxas fotossintéticas tendem a aumentar quando a luz azul é complementada com a vermelha, apresentando maior conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e ocasionando maior acúmulo da biomassa (YORIO et al.,

2001; TANAKA et al., 2009). No entanto, neste trabalho, não houve uma relação do acúmulo de biomassa com o aumento de conteúdo de pigmentos (Figuras 2D, 4). Podemos inferir que possivelmente o acúmulo de biomassa e os maiores teores de carboidratos são oriundos da fonte de sacarose fornecida no próprio meio de cultura.

3.2.2 Atividade da enzima PAL

A qualidade da luz influenciou a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL). Como pode ser observado na Figura 5, plântulas submetidas ao tratamento com LED azul apresentaram maior atividade da PAL, seguido pelo tratamento com LED vermelho e LED branco (controle). O tratamento com a combinação LED vermelho/azul apresentou a menor média se comparado com o tratamento com LED azul monocromático (Figura 5).

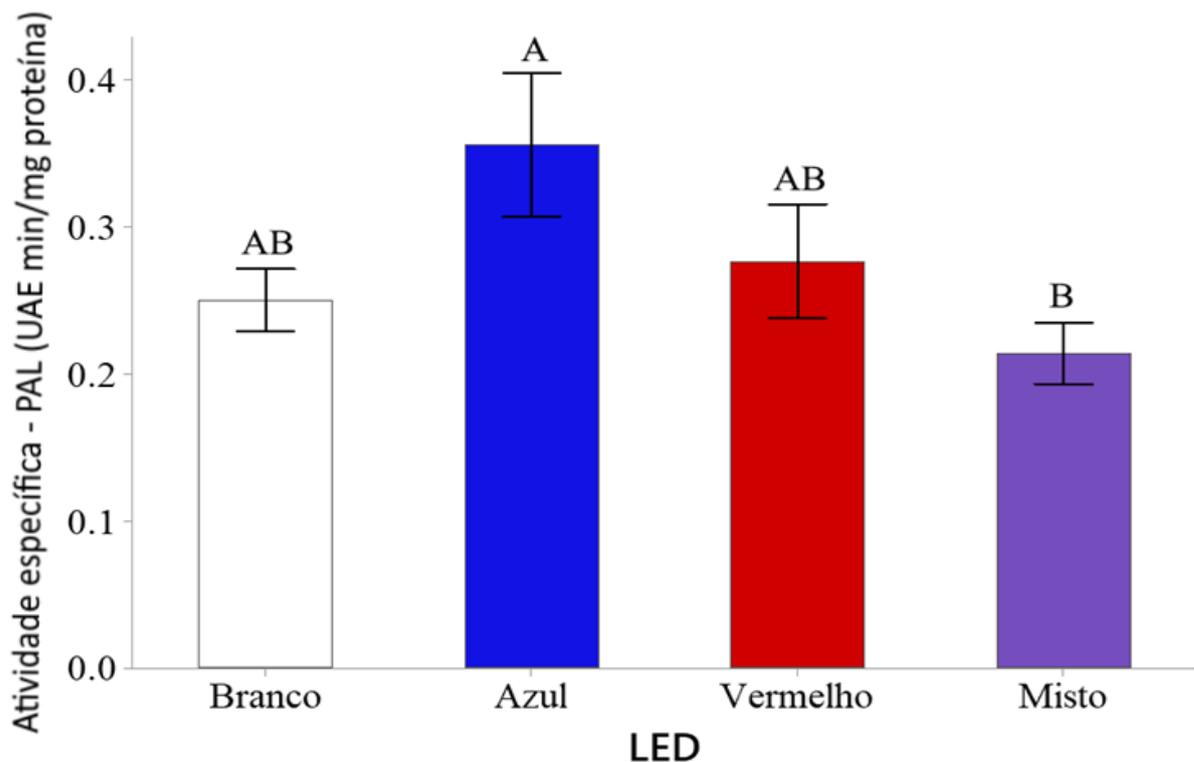


Figura 5: Atividade específica da enzima PAL referente aos diferentes LEDs coloridos (branco – 400 – 700 nm; azul – 450 nm; vermelho – 650 nm; misto-combinação 2vermelho/1azul). Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Os compostos fenólicos produzidos nos tecidos das plantas são resultados da ativação, pela luz azul, da PAL, enzima chave que está envolvida na via dos fenilpropanoides, responsável pela desaminação da fenilalanina (DLUGOSZ-GROCHOWSKA et al., 2016). A fenilalanina liga o metabolismo primário e secundário (SCHMIDT et al., 2010) e é logo

convertida em ácido cinâmico pela PAL, dando continuidade a uma série de reações até a formação de flavonoides (LIU et al., 2018).

A luz vermelha pode aumentar significativamente a atividade da PAL como uma resposta do fitocromo, estimulando a produção dos compostos fenólicos (MOHR, SCHOPFER, 1995). No entanto, a luz azul pode induzir a ação de criptocromos, resultando na biossíntese de antocianinas por meio da atividade da PAL (BIAN et al., 2015). Mais estudos são necessários para compreender a relação da atividade da PAL com a qualidade da luz, principalmente utilizando LEDs, já que os resultados são contrastantes em muitas espécies. No presente estudo, que é pioneiro em medir a atividade da PAL para *L. filifolia*, foi observado que o tratamento com LED azul apresentou a maior média referente a atividade específica da enzima, mas diferiu significativamente apenas na combinação de LEDs vermelho/azul, que apresentou a menor média. Resultado semelhante foi observado em um estudo com *Cyclocarya paliurus* (Batal), onde o prolongamento do cultivo com luz azul a uma intensidade de $50 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, além da luz verde, resultou em maior expressão gênica de PAL para essa espécie. Em contrapartida, no cultivo *in vitro* de uma espécie ornamental, *Dianthus caryophyllus* L., o LED vermelho a uma intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aumentou significativamente a atividade da enzima PAL (LIU et al., 2018). Mais uma vez é possível perceber que os resultados diferem sempre em relação a qualidade da luz e a espécie escolhida.

3.2.3 Peroxidação Lipídica

A qualidade da luz influenciou significativamente no conteúdo de MDA nos tratamentos com LEDs. Como demonstrado na Figura 6, os tratamentos com LED azul e LED vermelho, isoladamente, apresentaram concentrações significativamente menores de malondialdeído (MDA) se comparados ao tratamento controle (LED branco) e a combinação de LEDs vermelho/azul, que não diferiram entre si (Figura 6).

O conteúdo de MDA é importante por ser o principal indicativo para mensurar a extensão da peroxidação lipídica (MA et al., 2017). Assim, um aumento do MDA está correlacionado com a ocorrência de estresse oxidativo (HENDGES et al., 2015). Em algumas espécies cultivadas *in vitro* com luz monocromática azul como fonte luminosa, foi demonstrado que a atividade de enzimas antioxidantes foi significativamente maior no tratamento com LED azul seguida pelo LED vermelho (MANIVANNAN et al., 2015), sendo uma forma eficiente para ativar o sistema de defesa, consequentemente reduzindo a

concentração de espécies reativas de oxigênio (MENGXI et al., 2011) e assim evitando o estresse oxidativo.

Dessa forma, o cultivo *in vitro* pode ser beneficiado pela luz azul monocromática, já que na micropropagação as plântulas são expostas a alta umidade no interior dos tubos, baixa concentração de CO₂, redução das trocas gasosas, baixa radiação fotossinteticamente ativa (NGUYEN et al., 2016), constituindo fatores que interferem diretamente na fisiologia e bioquímica vegetal. Tal fato pode justificar o alto conteúdo de MDA para o tratamento com luz branca, normalmente utilizada nas salas de crescimento.

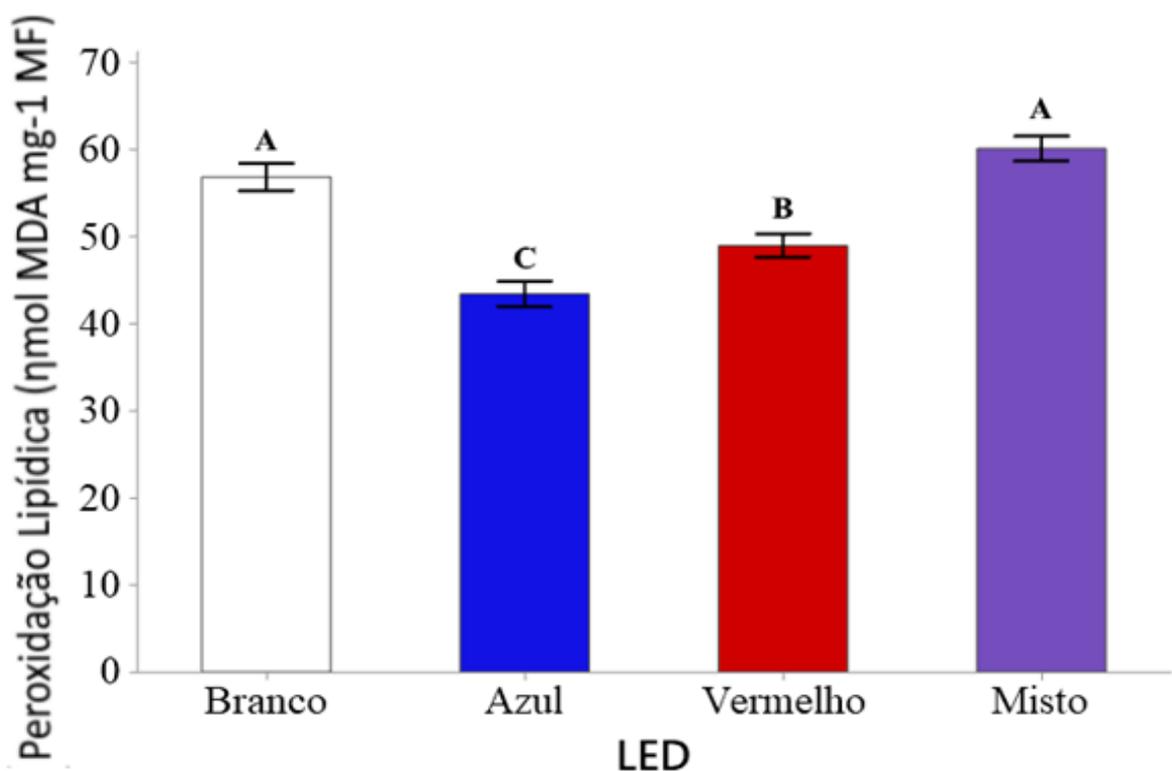


Figura 6: Conteúdo de MDA das plântulas após 45 dias submetidas a LEDs coloridos (branco – 400 – 700 nm; azul – 450 nm; vermelho – 650 nm; misto-combinação 2vermelho/1azul). MDA: malondialdeído. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Dessa forma, o uso monocromático dos LEDs azul e vermelho diminuiu consideravelmente o conteúdo de MDA, sendo importante para evitar danos ao sistema de membrana em plântulas de *L. filifolia* cultivadas *in vitro*.

3.2.4 Teores de carboidratos

A qualidade da luz apresentou efeito significativo sobre o conteúdo de carboidratos nas plântulas de *L. filifolia* cultivadas *in vitro* (Figura 7). As maiores médias obtidas de açúcares

solúveis totais (AST), amido, sacarose e açúcares redutores foram observadas na combinação LED vermelho/azul (Figuras 7).

Em estudos com espécie de importância econômica mundial, *Solanum tuberosum* L., cultivada sob LEDs com intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o maior conteúdo de AST foi encontrado na combinação azul/vermelho (JIANG et al., 2019). Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo com uma espécie extensivamente cultivada, *Phoenix dactylifera* L., onde o maior conteúdo de AST, além de amido, foram observados na combinação dos LEDs vermelho/azul, apesar da grande diferença da intensidade luminosa, $80 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Corroborando com esses resultados, o presente estudo apresentou o maior conteúdo de carboidratos na combinação LED vermelho/azul, onde além de AST e amido, foi observado o maior conteúdo de açúcares redutores e sacarose nesse tratamento. Em contraste, em um estudo com cultivo *in vitro* de orquídeas sob diferentes LEDs, o tratamento com luz monocromática vermelha promoveu o maior acúmulo de AST e amido a uma intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (MENGXI et al., 2011).

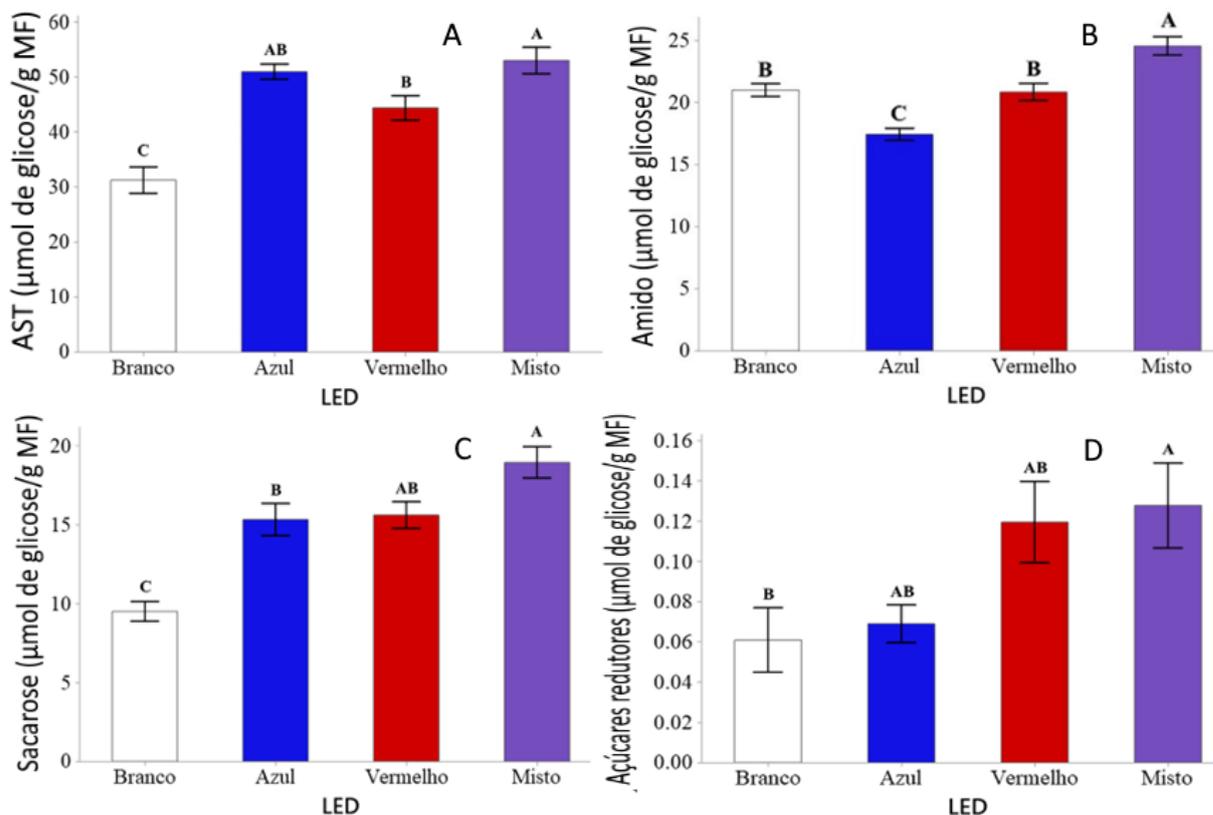


Figura 7: Conteúdo de carboidratos das plântulas após 45 dias de experimento com LEDs coloridos como fonte luminosa (branco – 400 – 700 nm; azul – 450 nm; vermelho – 650 nm; misto-combinação 2vermelho/1azul). (A) AST: açúcar solúvel total (μmol de glicose/g MF), (B) Amido (μmol de glicose/g MF), (C) Sacarose (μmol de glicose/g MF) e (D) Açúcares redutores (μmol de glicose/g MF). Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

A formação e distribuição de carboidratos na planta é de fundamental importância para muitos processos vegetais, como o crescimento vegetativo e reprodutivo, assim como na relação fonte-dreno (OSAKI, 2001). Além disso, os açúcares também podem estimular a biossíntese de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, conferindo propriedades antioxidantes ao sistema da planta (KHAN et al., 2018). Isso devido ao fato de os metabólitos secundários serem formados a partir de reações envolvendo compostos do metabolismo primário, como gliceraldeído-3-fosfato e piruvato que estão envolvidos da biossíntese de terpenos.

A proporção da faixa do vermelho e azul presente no LED pode afetar o conteúdo de carboidratos devido, provavelmente, a interações sinérgicas entre fitocromos e criptocromos (KIM et al., 2004), apresentando maiores concentrações de carboidratos se comparado ao o uso das luzes monocromáticas.

3.2.5 Composição do óleo essencial

Pela análise qualitativa da composição química dos voláteis de *L. filifolia* ficou evidenciado pouca diferença em relação à qualidade da luz (Figura 8). Os seis componentes majoritários foram identificados e analisados em relação as suas concentrações. No presente estudo, eucaliptol foi identificado como o composto majoritário dos constituintes voláteis da espécie, seguido por α -pineno, tujeno, γ -terpineno, cariofileno e limoneno, todos terpenos. Os LEDs vermelho e azul monocromáticos proporcionaram maior concentração de limoneno em relação ao tratamento controle (LED branco). O LED vermelho apresentou maior porcentagem para gamma terpineno se comparado à combinação LED vermelho/azul (Figura 8).

Para algumas espécies do gênero *Lippia*, os LEDs monocromáticos também proporcionaram diferenças nos resultados das análises dos óleos essenciais. Para *L. rotundifolia*, por exemplo, mircenona foi identificado como composto majoritário dos constituintes voláteis produzido *in vitro*, sendo observado para o tratamento com LED vermelho monocromático uma maior concentração do composto (DE HSIE et al., 2019). Já para *L. gracilis* o componente majoritário, carvacrol, obteve maior acúmulo quando as plântulas foram cultivadas sob LED azul monocromático (LAZZARINI et al., 2018). No entanto, resultados diferentes foram observados em um estudo com uma espécie medicinalmente importante, *A. millefolium*, onde o uso dos LEDs vermelho e azul

monocromáticos no cultivo *in vitro* causou uma redução na concentração de constituintes voláteis (ALVARENGA et al., 2015).

Para *L. filifolia*, a qualidade luz não alterou a concentração do composto majoritário, eucalyptol, que apresenta alto interesse econômico e medicinal. Isso devido esse composto, um óxido terpenoide, ser responsável por fragrância agradável e dotado por uma série de atividades biológicas, sem apresentar qualquer efeito colateral (GONDIM et al., 2018), além de ser útil no tratamento de bronquiolite, sinusite e resfriados (BEER et al., 2017). Esse resultado pode ser útil para pesquisas futuras envolvendo a produção alternativa desse composto, colaborando para a indústria farmacêutica que já o utiliza na constituição de diversos medicamentos.

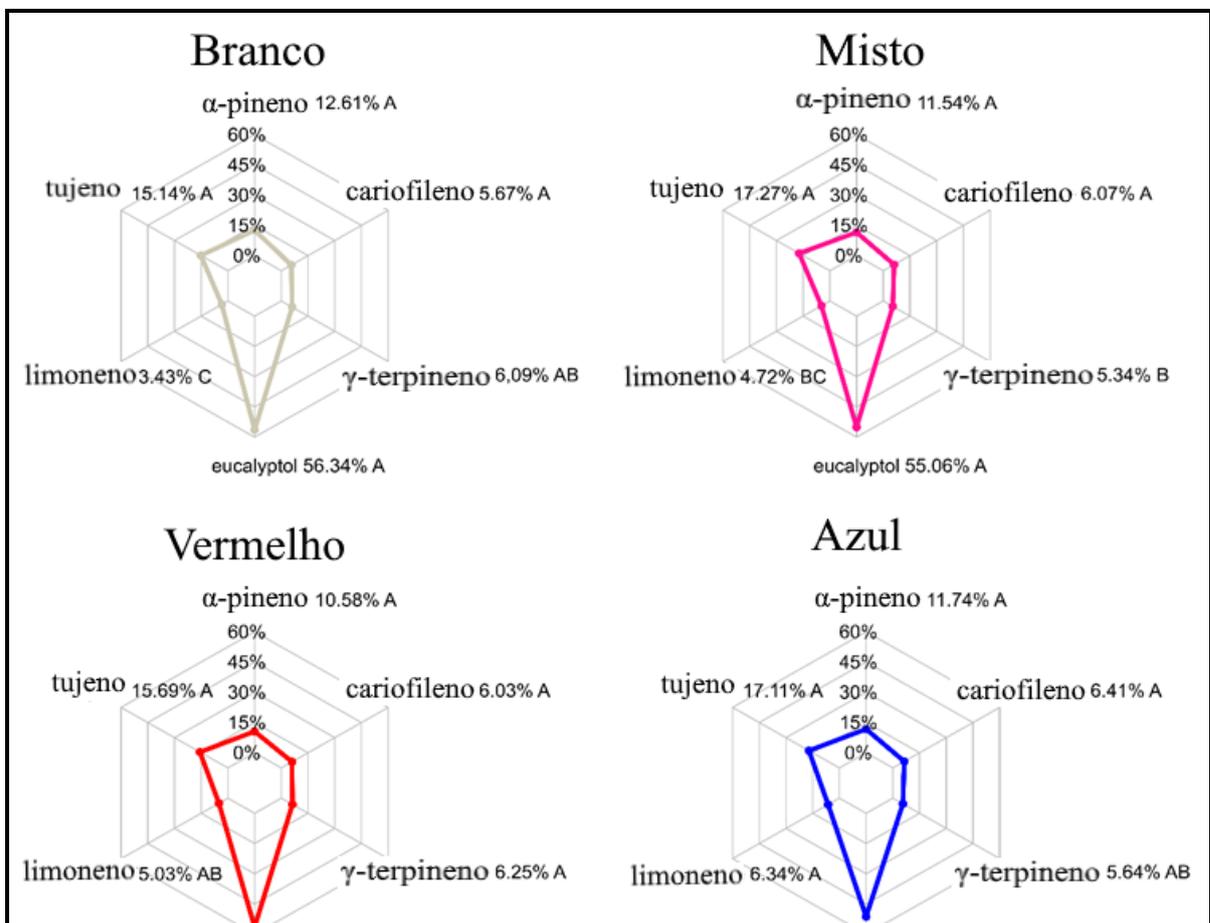


Figura 8: Análise da composição do óleo essencial de *L. filifolia* destacando os seis principais componentes dos constituintes voláteis em relação a qualidade da luz (branco – 400 – 700 nm; azul – 450 nm; vermelho – 650 nm; misto-combinação 2vermelho/1azul). Compostos que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Surpreendentemente, Singulani e colaboradores (2012), ao analisar a composição química do óleo essencial de várias espécies do gênero *Lippia*, relataram que a cânfora foi o composto majoritário do óleo essencial de *L. filifolia*, enquanto o eucaliptol apareceu em baixíssima concentração, 3%, na composição do óleo. Os autores, diferentemente do presente estudo que utilizou plântulas no cultivo *in vitro*, realizaram a análise do óleo essencial de folhas coletadas na cadeia do espinhaço.

Dessa forma, podemos destacar que podem existir quimiotipos diferentes de *L. filifolia* ou no cultivo *in vitro* a espécie apresenta outro comportamento. As diferenças entre quimiotipos podem estar relacionadas com o conteúdo de DNA da planta (VICCINI et al., 204), sendo então o controle por fatores genéticos maior se comparado com fatores ambientais. Em um estudo com *L. alba*, resultados semelhantes podem ser observados quando o genótipo influenciou mais que a própria qualidade da luz no perfil de óleos essenciais, sendo que para cada um dos três genótipos avaliados, foi encontrado um composto majoritário diferente (BATISTA et al., 2016).

4. CONCLUSÃO

A qualidade da luz no cultivo *in vitro* de *L. filifolia* influencia o crescimento e o metabolismo das plântulas. A combinação dos LEDs vermelho/azul estimula, de forma geral, o maior acúmulo de biomassa, maior número de brotações e número de entrenós, assim como induz o maior conteúdo de carboidratos nas plântulas, sendo então indicada para o cultivo *in vitro* de *L. filifolia* visando maior taxa de regeneração e propagação. A qualidade luminosa não altera a concentração do composto majoritário, eucaliptol, das plântulas cultivadas *in vitro*, possibilitando uma produção alternativa, rápida e prática do composto.

REFERÊNCIAS

ADAMS, Robert P. et al. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2007.

AGARWAL, Avinash; GUPTA, S. Dutta. Impact of light-emitting diodes (LEDs) and its potential on plant growth and development in controlled-environment plant production system. **Current Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 28-43, 2016.

ALVARENGA, Ivan Caldeira Almeida et al. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.

BADR, Ashraf; ANGERS, Paul; DESJARDINS, Yves. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 107, n. 1, p. 13-24, 2011.

BATISTA, Diego Silva et al. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, n. 3, p. 276-282, 2016.

BEER, A. M. et al. Effects of 1.8-cineol (eucalyptol) on the Activity of Histamine H1 Receptors. **SciFed Journal of Plant Physiology**, v. 1, n. 1, 2017.

BELLO-BELLO, Jericó J. et al. Light-emitting diodes: progress in plant micropropagation. **InTech**, v. 6, p. 93-103, 2017.

BIAN, Zhong Hua; YANG, Qi Chang; LIU, Wen Ke. Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 5, p. 869-877, 2015.

BORGES, Raphaelle Sousa et al. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 183-195, 2018.

BUEGE, John A.; AUST, Steven D. [30] Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

CASAL, Jorge J. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 1, p. 1-11, 2000.

CHEN, Xiao-li et al. Growth and nutritional properties of lettuce affected by different alternating intervals of red and blue LED irradiation. **Scientia Horticulturae**, v. 223, p. 44-52, 2017.

CHOI, Hyo Gil; MOON, Byoung Yong; KANG, Nam Jun. Effects of LED light on the production of strawberry during cultivation in a plastic greenhouse and in a growth chamber. **Scientia Horticulturae**, v. 189, p. 22-31, 2015.

DARKO, Eva et al. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1640, p. 20130243, 2014.

DE HSIE, Bety Shiue et al. Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 198, p. 111577, 2019.

DE LIMA GONDIM, Fladimir et al. Beneficial effects of eucalyptol in the pathophysiological changes of the respiratory system: a proposal for alternative pharmacological therapy for individuals with COPD. **European Journal of Medicinal Plants**, p. 1-10, 2018.

DŁUGOSZ-GROCHOWSKA, Olga; KOŁTON, Anna; WOJCIECHOWSKA, Renata. Modifying folate and polyphenol concentrations in Lamb's lettuce by the use of LED supplemental lighting during cultivation in greenhouses. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 228-237, 2016.

GOINS, Gregory D. et al. Salad crop production under different wavelengths of red light-emitting diodes (LEDs). **SAE Technical Paper**, 2001.

GUPTA, S. Dutta; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 211-220, 2013.

GUPTA, S. Dutta; SAHOO, Tapan. K. Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of *Curculigo orchioides* Gaertn. **Acta physiologiae plantarum**, v. 37, n. 11, p. 233, 2015.

HENDGES, Flávia Bordignon et al. Avaliação enzimática e fisiológica de plântulas de milho submetidas à seca. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 2, p. 52-63, 2015.

HEO, Jeong Wook et al. Light quality affects *in vitro* growth of grape 'Teleki 5BB'. **Journal of Plant Biology**, v. 49, n. 4, p. 276, 2006.

HUNG, Cao Dinh et al. LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 6, p. 152, 2016.

JIANG, Lili et al. Responses of Favorita Potato Plantlets Cultured *in Vitro* under Fluorescent and Light-Emitting Diode (LED) Light Sources. **American Journal of Potato Research**, v. 96, n. 4, p. 396-402, 2019.

KHAN, Tariq et al. Carbohydrate-induced biomass accumulation and elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. **Industrial crops and products**, v. 126, p. 168-176, 2018.

KIM, Hyeon-Hye et al. Green-light supplementation for enhanced lettuce growth under red- and blue-light-emitting diodes. **HortScience**, v. 39, n. 7, p. 1617-1622, 2004.

KIM, Hyeon-Hye et al. Stomatal conductance of lettuce grown under or exposed to different light qualities. **Annals of Botany**, v. 94, n. 5, p. 691-697, 2004.

LAZZARINI, Luiz Eduardo Santos et al. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 135, n. 3, p. 367-379, 2018.

LEE, Jun Hyung; PIJUT, Paula M. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of *Fraxinus nigra*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 130, n. 2, p. 335-343, 2017.

LEGRIS, Martina; INCE, Yetkin Çaka; FANKHAUSER, Christian. Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2019.

LI, Huimin et al. Effects of different light sources on the growth of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 4, p. 262, 2012.

LICHTENTHALER, Hartmut K.; BUSCHMANN, Claus. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4. 3.1-F4. 3.8, 2001.

LIU, Mengxi et al. Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. **Scientia horticulturae**, v. 174, p. 112-118, 2014.

LIU, Yang et al. Light quality affects flavonoid production and related gene expression in *Cyclocarya paliurus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 179, p. 66-73, 2018.

MA, Dongyun et al. Physiological responses and yield of wheat plants in zinc-mediated alleviation of drought stress. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 860, 2017.

MAJADA, Juan. P. et al. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, n. 3, p. 207-214, 2000.

MANIVANNAN, Abinaya et al. Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of *in vitro*-grown carnations 'Green Beauty' and 'Purple Beauty'. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 58, n. 1, p. 12-20, 2017.

MEHTA, P. M.; BHAVNARAYANA, K. Role of phenylalanine and tyrosine ammonia lyase enzymes in the pigmentation during development of brinjal fruit. **Proceedings: Plant Sciences**, v. 90, n. 4, p. 293-297, 1981.

MENGXI, Liu et al. Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 106, n. 1, p. 1-10, 2011.

MOHR, Hans; SCHOPFER, Peter. Biosynthetic metabolism. In: **Plant Physiology**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1995. p. 275-284.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NGUYEN, Quynh Thi; XIAO, Yulan; KOZAI, Toyoki. Photoautotrophic micropropagation. In: **Plant Factory**. Academic Press, 2020. p. 333-346.

OSAKI, M.; SHINANO, T. Plant growth based on interrelation between carbon and nitrogen translocation from leaves. **Photosynthetica**, v. 39, n. 2, p. 197-203, 2001.

PAWŁOWSKA, Bożena et al. Impact of LED light sources on morphogenesis and levels of photosynthetic pigments in *Gerbera jamesonii* grown *in vitro*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 115-123, 2018.

PEIXOTO, Paulo Henrique Pereira et al. *In vitro* propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. and Schauer ex Schauer. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, n. 6, p. 558-561, 2006.

POUDEL, Puspa Raj; KATAOKA, Ikuo; MOCHIOKA, Ryosuke. Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 92, n. 2, p. 147-153, 2008.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, Marco A.; IGLESIAS-ANDREU, Lourdes G.; BAUTISTA-AGUILAR, José R. The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech**, v. 19, n. 3, p. 331-336, 2017.

RESENDE, Cristiano Ferrara de et al. *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n. 3, p. 582-589, 2015.

SÁEZ, Patricia L. et al. Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant science**, v. 201, p. 12-24, 2013.

SCHMIDT, Susanne et al. Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1293-1299, 2010.

SCHUERGER, Andrew C.; BROWN, Christopher S.; STRYJEWSKI, Elizabeth C. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, v. 79, n. 3, p. 273-282, 1997

SHUKLA, Mukund R. et al. Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems. **Plant Methods**, v. 13, n. 1, p. 6, 2017.

SILVA, Tatiane Dulcinea et al. Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of *in vitro* *Pfaffia glomerata* accessions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, p. 111761, 2020.

SINGULANI, Junya de Lacorte et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6(27), p. 4416-4422, 2012.

VICCINI, Lyderson Facio et al. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 14-19, 2014.

WATCHARATANON, Kawissara; INGKANINAN, Kornkanok; PUTALUN, Waraporn. Improved triterpenoid saponin glycosides accumulation in *in vitro* culture of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst with precursor feeding and LED light exposure. **Industrial crops and products**, v. 134, p. 303-308, 2019.

YEMM, E. W.; WILLIS, AJ1269789. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical journal**, v. 57, n. 3, p. 508, 1954.

YORIO, Neil C. et al. Improving spinach, radish, and lettuce growth under red light-emitting diodes (LEDs) with blue light supplementation. **HortScience**, v. 36, n. 2, p. 380-383, 2001.