



SÂMIA TORRES SILVA

**QUALIDADE, INTENSIDADE DE LUZ E
SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL NO
CRESCIMENTO E ANÁLISE POR *HEADSPACE*
– CG/EM NA MICROPROPAGAÇÃO DE
*Plectranthus amboinicus***

LAVRAS – MG

2016

SÂMIA TORRES SILVA

**QUALIDADE, INTENSIDADE DE LUZ E SISTEMA DE VENTILAÇÃO
NATURAL NO CRESCIMENTO E ANÁLISE POR *HEADSPACE* –
CG/EM NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Plectranthus amboinicus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

**LAVRAS – MG
2016**

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

Silva, Sâmia Torres.

Qualidade, intensidade de luz e sistema de ventilação natural no crescimento e análise por *headspace* – CG/EM na micropropagação de *Plectranthus amboinicus* / Sâmia Torres Silva. – Lavras : UFLA, 2016.

108 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Malvarisco. 3. Cultura de tecidos. 4. Luz. 5. Ventilação natural. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

SÂMIA TORRES SILVA

**QUALIDADE, INTENSIDADE DE LUZ E SISTEMA DE VENTILAÇÃO
NATURAL NO CRESCIMENTO E ANÁLISE POR *HEADSPACE* –
CG/EM NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Plectranthus amboinicus***

**QUALITY, LIGHT INTENSITY AND NATURAL VENTILATION
SYSTEM OVER THE GROWTH AND ANALYSIS BY HEADSPACE-
GC/MS ON THE MICROPROPAGATION OF *Plectranthus amboinicus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de maio de 2016.

Prof.Dr. Adriano Bortolotti da Silva	UNIFENAS
Prof ^ª . Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA
Prof ^ª . Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares	UFLA

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

LAVRAS - MG

2016

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. José Eduardo Brasil e Prof^a. Suzan Bertolucci, pela amizade e ensinamentos;

Aos amigos Luiz Eduardo e Brígida Almeida, que me apoiaram durante todo o mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, especialmente Giulia Duarte, Marília Tavares e Samuel Cunha.

Ao Evaldo, Annete, Dico e Paulinho pela amizade e ajuda de sempre.

À minha mãe, família e meu companheiro Caio que sempre me apoiaram e incentivaram.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A multiplicação de plantas medicinais através da micropropagação apresenta diversas vantagens. No entanto, é necessário conhecer como os fatores ambientais afetam o crescimento e o acúmulo de constituintes *in vitro*. *Plectranthus amboinicus* é uma planta medicinal cujo óleo essencial é rico em timol e carvacrol, substâncias antioxidantes. Sendo assim, objetivou-se avaliar o efeito da qualidade, intensidade de luz e sistema de ventilação natural no crescimento e na análise por *headspace*-CG/EM da espécie micropropagada. Realizaram-se três experimentos. No experimento de qualidade de luz, segmentos apicais foram cultivados por 50 dias sob *light emitting diodes* (LEDs) azul; vermelho; 1 azul:2,5 vermelho; 2,5 azul:1 vermelho; 1 azul:1 vermelho e lâmpada fluorescente branca fria. No experimento de intensidade, segmentos nodais foram cultivados por 83 dias sob as intensidades de 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtidas com lâmpadas fluorescentes brancas frias. No experimento de sistema de ventilação natural (SVN), cultivaram-se segmentos apicais e nodais por 30 dias sob sistema convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4). Nos três experimentos, avaliaram-se o crescimento e análise de folhas por *headspace* – CG/EM. O LED vermelho proporcionou para os segmentos apicais maior comprimento da parte aérea, matérias secas de folhas e total. Além disso, resultou em maior acúmulo de carvacrol que a lâmpada fluorescente. O cultivo de segmentos nodais sob a intensidade de 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aumentou matérias secas de folhas, caule, total e quantidade de carvacrol. O SVN 1 proporcionou para segmentos apicais maiores matérias secas de folhas, caule, raiz e total. O SVN 4 aumentou o acúmulo de carvacrol, mas reduziu o crescimento. Para os segmentos nodais, o SVN 2 proporcionou maiores matérias secas de folhas e total. No geral, os constituintes majoritários foram α - terpineno, *p*-cimeno, γ -terpineno, carvacrol, (*E*)- cariofileno e α -*trans*-bergamoteno, sendo o carvacrol o constituinte presente em maior quantidade. Assim, o trabalho contribui com informações relevantes para o cultivo *in vitro* da espécie e para o entendimento das alterações causadas pela qualidade, intensidade de luz e ventilação natural na química volátil de suas folhas analisada por *headspace* CG/EM.

Palavras-chave: Espectro. Irradiância. Trocas gasosas.

ABSTRACT

The multiplication of medicinal plants by means of micropropagation has many advantages. However, it is necessary to understand how the environmental factors affect growth and the accumulation of *in vitro* constituents. *Plectranthus amboinicus* is a medicinal plant, of which essential oil is rich in thymol and carvacrol, antioxidant substances. Thus, the objective was to evaluate the effect of light quality, intensity and the natural ventilation system over the growth and the analysis by *headspace*-CG-EM of the micropropagated species. Three experiments were conducted. In the experiment for light quality, apical segments were cultivated for 50 days under blue; red; 1 blue:2.5 red; 2.5 blue:1 red; 1 blue:1 red light emitting diodes (LEDs) and cold white fluorescent lamp. In the intensity experiment, nodal segments were cultivated for 83 days under the intensities of 26, 51, 69, 94 and 130 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtained with cold white fluorescent lamps. In the experiment of natural ventilation system (NVS), apical and nodal segments were cultivated for 30 days under conventional system (CS) and natural ventilation system with one (NVS1), two (NVS2) and four (NVS4) porous membranes. In all three experiments, we evaluated the growth and leaf analysis by *headspace*-CG/EM. The red LED provided greatest length for the shoot and higher total and leaf dry matter for the apical segments. In addition, the red LED resulted in higher accumulation of carvacrol when compared to the fluorescent lamp. The cultivation of nodal segments under the intensity of 69 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ increased the dry matter of leaves, stem and total, as well as the amount of carvacrol. NVS1 provided higher content of leaf, stem, root and total dry matter to apical segments. NVS4 increased the accumulation of carvacrol, but reduced growth. For the nodal segments, NVS2 provided higher content of leaf and total dry matter. In general, the major constituents were α -terpinene, *p*-cimene, γ -terpinene, carvacrol, (*E*)-caryophyllene and α -trans-bergamotene, with carvacrol present in higher amounts. Thus, this work contributes with relevant information for the *in vitro* cultivation of the species, and for understanding the changes caused by light quality, intensity and natural ventilation on the volatile chemistry of the leaves analyzed by *headspace* CG/EM.

Keywords: Spectrum. Irradiance. Gas exchange.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - A espécie *Plectranthus amboinicus*: A) Plantas jovens cultivadas em vasos em casa de vegetação; B) Detalhamento da folha; C) Detalhamento da inflorescência de uma planta mais velha da espécie. 16
- Figura 2 - Estruturas de timol e carvacrol.....21
- Figura 3 - Rota da biossíntese de timol e carvacrol a partir de γ -terpineno e p- cimeno na espécie *Thymus vulgaris*.....22
- Figura 4 - Rota da biossíntese de timol e carvacrol em *Origanum* e *Thymus*.....23

CAPÍTULO 2

- Figura 2 - A- *Plectranthus amboinicus* oriunda de segmentos apicais cultivados *in vitro* aos 50 dias, sob LED azul; vermelho; 2,5azul:1vermelho (2,5 A:1V); 2,5vermelho:1azul (2,5V:1A); 1vermelho:1azul (1V:1A) e lâmpada fluorescente branca (Fluor.). B) Plântulas de *Plectranthus amboinicus* estabelecidas *in vitro* a partir de explantes apicais, aos 25 dias. C) Plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro* sob lâmpada fluorescente branca de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aos 90 dias. Lavras, 2016.....62
- Figura 3 - Cromatograma total de íons representativo das análises por *headspace*- CG/EM de folhas de *Plectranthus amboinicus* cultivada *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. Lavras, 2016.....64

Figura 4 - Quantificação de constituintes majoritários de plântulas de <i>Plectranthus amboinicus</i> oriundas de segmentos apicais cultivados <i>in vitro</i> , aos 50 dias, sob diferentes qualidades de luz.....	66
Figura 5 - Aspecto de plântulas de <i>Plectranthus amboinicus</i> oriundas de segmentos nodais cultivados <i>in vitro</i> , aos 83 dias, sob as intensidades de: 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. A) Plântulas dentro do tubo de ensaio. B) Plântulas fora do tubo de ensaio. Lavras, 2016.....	68
Figura 6 - Quantificação de constituintes majoritários de plântulas de <i>Plectranthus amboinicus</i> oriundas de segmentos nodais cultivados <i>in vitro</i> , aos 83 dias, sob diferentes intensidades de luz.....	72

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Esquema para a montagem das membranas porosas manufaturadas utilizadas no experimento (A-J).....	88
Figura 2 - Aspecto de plântulas de <i>Plectranthus amboinicus</i> oriundas de segmentos apicais (A) e nodais (B) cultivados <i>in vitro</i> , aos 30 dias, sob sistema concencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas (SVN4).	93
Figura 3 - Redução no volume do meio de cultura observada no experimento com plântulas de <i>Plectranthus amboinicus</i> cultivadas <i>in vitro</i> , aos 30 dias, em frascos de sistema convencional (SC) (fechado) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro (SVN4) membranas porosas.....	95

- Figura 4 - Concentração de constituintes majoritários de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais cultivados *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes sistemas de cultivo convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas na tampa do recipiente de cultivo (SVN4).....98
- Figura 5 - Cromatograma total de íons representativo, obtido por análise de *headspace*-CG/EM, de folhas de plântulas de *Plectranthus amboinicus* cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob sistema de cultivo convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4) nas tampas dos recipientes de cultivo. Lavras, 2016..... 101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Valores de comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), área foliar (AF), matéria seca de folhas (MSF), do caule (MSC), comprimento da raiz (CR), massa seca da raiz (MSR) e total (MST) de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, aos 50 dias.61
- Tabela 2 - Constituintes voláteis de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais cultivadas *in vitro* sob qualidades de luz, aos 50 dias. Lavras, 2016.....65
- Tabela 3 - Efeito de intensidades de luz no comprimento da parte aérea (CPA), número de brotações (NB), área foliar (AF), matérias secas de folhas (MSF), caule (MSC), comprimento da maior raiz (CR), matérias secas da raiz (MSR) e total (MST) de plântulas da espécie *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais, cultivadas *in vitro*, aos 83 dias. Lavras, 2016.68
- Tabela 4 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob intensidades de luz, aos 83 dias. UFLA, Lavras, 2016.....69
- Tabela 5 - Constituintes voláteis de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 83 dias, sob diferentes intensidades de luz. Lavras, 2016.71

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 - Comprimento da parte aérea (cm), área foliar (cm²), número de folhas, comprimento da maior raiz, matérias secas, em mg, de folhas, caule, raiz e total de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais e nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob sistema convencional (SC) e sistemas de ventilação natural, com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4)91
- Tabela 2 - Constituintes voláteis de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob sistema de cultivo convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quarto (SVN4) membranas porosas na tampa do recipiente de cultivo. UFLA, Lavras, 2016.....97
- Tabela 3 - Constituintes voláteis de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob sistema de cultivo convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quarto (SVN4) membranas porosas na tampa do recipiente de cultivo. Lavras, 2016..... 100

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Características botânicas e agronômicas da espécie	15
2.2 Importância e potenciais aplicações de <i>P. amboinicus</i>	17
2.3 Química volátil da espécie e análises por <i>headspace</i>-CG/EM	20
2.4 Micropropagação de plantas medicinais	25
2.5 Luz no cultivo <i>in vitro</i> de plantas	27
2.6 Sistema de ventilação natural no cultivo <i>in vitro</i> de plantas	31
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	35
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2 QUALIDADE E INTENSIDADE DE LUZ NO CRESCIMENTO <i>in vitro</i> E ANÁLISE POR <i>headspace</i> - CG/EM DE <i>Plectranthus amboinicus</i>	51
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Condições gerais dos experimentos	55
2.2 Experimento de qualidade de luz	55
2.3 Experimento de intensidade de luz	57
2.4 Análises químicas por <i>headspace</i> – CG/EM	58
2.5 Análise estatística dos dados	59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1 Qualidade de luz	61
3.2 Intensidade de luz	67
4 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77
CAPÍTULO 3 SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL NO CRESCIMENTO <i>in vitro</i> E ANÁLISE POR <i>headspace</i>-CG/EM DE <i>Plectranthus amboinicus</i>	83
1 INTRODUÇÃO	85
2 MATERIAL E MÉTODOS	87
2.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> da espécie	87
2.2 Sistema de ventilação natural	87
2.3 Análises químicas por <i>headspace</i> -CG/EM	89
2.4 Análise estatística dos dados	90
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	91
4 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	105

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng é uma Lamiaceae com grande potencial medicinal e pouco estudada do ponto de vista agrônomo (ARUMUGAM; SWAMY; SINNIAN, 2016). Pesquisas recentes relataram sua atividade contra câncer de mama e diabetes (HASIBUAN; CHRESTELLA; SATRIA, 2014; VISWANATHASWAMY et al., 2011). O óleo essencial da espécie é rico em timol e carvacrol, substâncias utilizadas na indústria de alimentos como conservantes naturais (KHARE; BANERJEE; KUNDU, 2011; TRIVELLINI et al., 2016). Além disso, a espécie tem importância ambiental, podendo ser utilizada como planta rizofiltradora de água contaminada com chumbo (IGNATIUS et al., 2014).

A micropropagação possibilita a multiplicação em massa, conservação de espécies e obtenção de plantas livres de microrganismos (CHEONG; MOCK; LI, 2012; COSTE et al., 2012; KAUR; SANDHU, 2015). Além disso, é uma ferramenta para a exploração sustentável de plantas medicinais (MORAIS et al., 2012). A luz é um dos fatores ambientais que deve ser controlado nesta técnica. A sua qualidade tem efeito sobre a fotossíntese e fotomorfogênese: forma, desenvolvimento e florescimento das plantas. A sua intensidade é o principal parâmetro que afeta a fotossíntese (YEH; CHUNG, 2009). Além disso, estas características da luz podem afetar o metabolismo secundário das plantas (ALVARENGA et al., 2015; BASSOLINO et al., 2015).

Entretanto, o efeito da luz é variável entre as espécies (MANIVANNAN et al., 2015; SINGH et al., 2015). Outro entrave é que os recipientes utilizados na micropropagação convencional proporcionam baixas trocas gasosas e concentração de dióxido de carbono (CO₂), além de alta umidade e acúmulo de etileno, hormônio que pode inibir o crescimento das plantas (CHEN, 2004,

2006, 2015; FOMENKOV et al., 2015; MOYA; GISBERT, 2012). Com isso, plantas micropropagadas apresentam anomalias, como cutícula fina, pobre controle estomático e capacidade fotossintética reduzida, dificultando a aclimatização (JIMÉNEZ et al., 2015; SAÉZ et al., 2012).

Com o uso de diodos emissores de luz (LEDs) é possível obter espectros específicos e regular os níveis de radiação fotossinteticamente ativa e fotomorfogênica necessários para o cultivo *in vitro* de cada espécie (GUPTA; JATOTHU, 2013). Por outro lado, a ventilação natural possibilita trocas gasosas entre o ambiente interno e o externo, reduzindo a umidade e acúmulo de etileno, e mantendo a concentração interna de CO₂ adequada para estimular a fotossíntese. Assim, pode incrementar o crescimento e afetar o metabolismo secundário (SALDANHA et al., 2012; ZHU et al., 2015; ZISKA; PANICKER; WOJNO, 2008; ZOBAYED; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2002).

Neste contexto e devido às potenciais aplicações medicinais, industrial e ambiental de *P. amboinicus*, além de esta espécie ser uma fonte natural de timol e carvacrol, o seu cultivo *in vitro* deve ser otimizado. Sendo assim, objetivou-se avaliar o efeito da qualidade da luz utilizando LEDs, intensidade e sistema de ventilação natural no crescimento e na análise por *headspace*-CG/EM da espécie micropropagada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características botânicas e agronômicas da espécie

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng é uma Lamiaceae encontrada na África, Ásia, América do Sul, Caribe e Pacífico (LUKHOBBA; SIMMONDS; PATON, 2006). A família Lamiaceae é cosmopolita e inclui 7886 espécies e 245 gêneros, dentre estes, o gênero *Plectranthus*, com 320 espécies (PLANT..., 2013; TRIVELLINI et al., 2016). Este gênero tem potencial econômico, pois inclui espécies medicinais que são utilizadas em jardins. Devido à sua importância no âmbito da horticultura e medicina tradicional, suas espécies podem ser chamadas de plantas para o futuro (RICE et al., 2011).

A origem de *Plectranthus* está relacionada ao gênero *Ocimum*, que foi subdividido nos gêneros *Coleus*, *Plectranthus* e outros. A diferença entre estes dois últimos gêneros era baseada na fusão de estames. Em *Coleus* eram incluídas espécies com estames fundidos, e em *Plectranthus* com estames livres. Posteriormente, esta característica foi considerada insatisfatória para diferenciar *Coleus* de *Plectranthus*, pois o grau de fusão de estames mostrou-se variável para diferentes populações de uma mesma espécie de *Coleus*, fato que também ocorreu em *Plectranthus*. Assim, espécies de *Coleus* foram incluídas em *Plectranthus* (MORTON, 1962).

P. amboinicus apresenta sinônimas: *Coleus amboinicus* Lour., *Coleus amboinicus* var. *violaceus* Gürke, *Coleus aromaticus* Benth., *Coleus carnosus* Hassk., *Coleus crassifolius* Benth., *Coleus subfrutescens* Summerh., *Coleus suborbicularis* Zoll. & Moritz, *Coleus suganda* Blanco, *Coleus vaalae* (Forssk.) Deflers, *Majana amboinica* (Lour.) Kuntze, *Majana carnosus* (Hassk.) Kuntze, *Majana suganda* (Blanco) Kuntze, *Ocimum vaalae* Forssk. e *Plectranthus aromaticus* Roxb. (LUKHOBBA; SIMMONDS; PATON, 2006; PLANT..., 2013). Segundo Likhoba, Simmonds e Paton (2006), a falta de uma lista oficial

de verificação de sinônimos é um obstáculo para sintetizar o conhecimento sobre plantas. As revisões taxonômicas de *Plectranthus* tenderem a ser regionais e não globais pode ter contribuído para confusão e o uso de vários nomes taxonômicos para descrever as mesmas espécies.

P. amboinicus é uma erva perene, aromática e arbustiva (LUKHOBÁ; SIMMONDS; PATON, 2006; ROSHAN et al., 2010). A espécie apresenta altura de até 1 m, caule com 30 a 90 cm de comprimento e pilosidade longa e rígida, ou pubescente. As folhas são simples, opostas, ovaladas, suculentas e com bordas denteadas. As flores são de cor púrpura, com cálice em forma de sino, pediceladas, dispostas em longos ráceros (ARUMUGAN; SWAMY; SINNIÁH, 2016; HULLATTI; BHATTACHARJEE, 2011; ROSHAN et al., 2010) (FIGURA 1).

Figura 1 - A espécie *Plectranthus amboinicus*: A) Plantas jovens cultivadas em vasos em casa de vegetação; B) Detalhamento da folha; C) Detalhamento da inflorescência de uma planta mais velha da espécie.



Foto: José Eduardo Brasil. UFLA, Lavras, 2016.

O limbo foliar da espécie é revestido por tricomas tectores unisseriados pluricelulares. Observa-se também a presença de tricomas glandulares pedicelados. Os estômatos são anomocíticos, e em vista paradérmica, verifica-se a presença de células-guarda reniformes, imersas em células epidérmicas fundamentais. A succulência do limbo foliar e pecíolo consiste em uma adaptação da espécie para resistir à seca, além dos tricomas tectores (MAURO et al., 2008).

Quanto ao cultivo, *P. amboinicus* é propagada geralmente por estacas, pois raramente produz sementes. Apresenta bom crescimento em local bem drenado, semi-sombreado. Cresce melhor em solo com pH neutro e alta umidade, mas excesso de água pode apodrecer suas raízes. É considerada uma espécie com moderada resistência à salinidade e é resistente a secas severas, pois armazena água em seu tecido suculento. Resiste bem à alta temperatura e sol escaldante, local muito sombreado, entretanto cresce melhor em locais parcialmente sombreados. A espécie não resiste a temperaturas inferiores a 0 °C. Os estudos sobre os métodos ou práticas utilizadas para cultivo comercial e colheita de *P. amboinicus* são escassos (ARUMUGAN; SWAMY; SINNIHAH, 2016; FREITAS et al., 2014).

2.2 Importância e potenciais aplicações de *P. amboinicus*

Plantas medicinais e aromáticas são recursos importantes para o desenvolvimento empreendedor. Muitas organizações nacionais e internacionais como o Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas (UNDP), Organização mundial da Saúde (WHO), Fundo Mundial para a Natureza (WWF), Sociedade Alemã de Cooperação Técnica (GTZ) e Departamento para o Desenvolvimento Internacional (DFID) do Reino Unido apoiam este setor. O Banco Mundial lançou projetos de apoio ao cultivo e conservação destas plantas.

Além disso, o governo da Índia tem promovido o cultivo através de vários programas (KALA, 2015).

Estas espécies são economicamente importantes por serem utilizadas para a produção de drogas, fragrâncias, pigmentos, aditivos alimentares e pesticidas, além disso, muitas são popularmente utilizadas (MESSIAS et al., 2015; SIAHSAR et al., 2011). *P. amboinicus* é utilizada no nordeste do Brasil para tratamento de tosse, gripe, verme, problemas hepáticos e hemorroidas (MOREIRA et al., 2002). As suas folhas são anti-helmínticas, expectorantes, diuréticas e tônicas para o fígado (LUKHOB; SIMMONDS; PATON, 2006; ROSHAN et al., 2010).

Esta espécie apresenta grande potencial de aplicação. Resultados de estudos recentes que serão citados posteriormente evidenciaram esse potencial nas áreas de entomologia, alimentos, saúde e ambiental. Na área da entomologia, verificou-se que *P. amboinicus* é uma fonte barata e ecologicamente correta de larvicida natural contra o mosquito vetor da malária (SENTHILKUMAR; VENKATESALU, 2010).

No âmbito alimentício, *P. amboinicus* apresenta potencial de aplicação por ter óleo essencial rico em timol e carvacrol (KHARE; BANERJEE; KUNDU, 2011; TRIVELLINI et al., 2016). Timol e carvacrol são utilizados na indústria de alimentos como preservativos microbiológicos, antioxidantes e anti-aflatoxina (SHIMODA et al., 2006; TRIVELLINI et al., 2016). Além disso, *P. amboinicus* é uma planta comestível e nutritiva, apresentando proteínas, vitaminas, minerais, dentre outros nutrientes em sua composição (KHARE; BANERJEE; KUNDU, 2011).

Observou-se que o potencial medicinal da espécie é amplamente investigado. Há relatos do efeito do óleo essencial de *P. amboinicus* como quimioterápico e quimiopreventivo sob metástase de câncer pulmonar, como antibacteriano (*Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*),

antifúngico (*Candida albicans*) e com efeito anticasca (MANJAMALAI; GRACE, 2013; REVATHI et al., 2011; SELVAKUMAR; NAVEENA; PRAKASH, 2012). Foi também observado que o óleo essencial da espécie potencializa a atividade de antibióticos (RODRIGUES et al., 2013).

Em relação às potenciais aplicações medicinais de outras classes químicas presentes em *P. amboinicus*, pesquisadores verificaram que ocorreu a inibição da metástase de células de câncer de mama com a combinação de doxorrubicina e o extrato de acetato de etila de folhas da espécie (HASIBUAN; CHRESTELLA; SATRIA, 2014). Além disso, em outro estudo, foi verificado que este e outros extratos da espécie apresentam atividade antioxidante (BHATT; NEGI, 2012).

Foi relatado efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos tratados diariamente com o extrato etanólico de folhas da espécie (KOTI et al., 2011). Observou-se também atividade hepatoprotetora contra hepatotoxicidade induzida por paracetamol também pelo mesmo extrato (SHENOY et al., 2012). Em adição, estudo em ratos demonstrou a atividade deste extrato contra infecções causadas por *Plasmodium berghei*, uma das espécies de *Plasmodium* causadoras de malária (RAMLI et al., 2014).

Outro estudo demonstrou que *P. amboinicus* pode evitar “quorum-sensing”, e esta propriedade foi conferida pelo extrato metanólico de folhas da espécie. A inibição de quorum-sensing pode reduzir o risco de patogenicidade microbiana (MARY; BANU, 2015). Por outro lado, o extrato hidroalcoólico de folhas da espécie apresentou efeito anti-inflamatório e antitumoral (GURGEL et al., 2009). Já o extrato aquoso das folhas apresentou efeito contra carcinomatose peritoneal (BRANDÃO et al., 2013).

Outras potenciais aplicações da espécie são na área ambiental. Ignatius et al. (2014) investigaram a rizofiltração de águas residuais contendo chumbo por *P. amboinicus*. A espécie acumulou chumbo nas raízes. Além disso,

Arjunan et al. (2012) verificaram que o extrato etanólico de *P. amboinicus* apresentou propriedade de sedimentação, proporcionando limpeza de água, tornando-a utilizável para diversas finalidades, exceto para bebida.

Devido ao amplo potencial de aplicação de *P. amboinicus* em diversas áreas, pode-se afirmar que a exploração desta espécie é promissora. Entretanto, segundo Kala (2009), a gestão de plantas medicinais é uma tarefa difícil, pois pode ocorrer o esgotamento destes recursos devido à exploração em larga escala, práticas de coletas insustentáveis e direcionamento das áreas de floresta para outros usos. Além disso, práticas de cultivo e pós-colheita inadequadas, aliadas à falta de estudos, podem ser entraves para o desenvolvimento empreendedor.

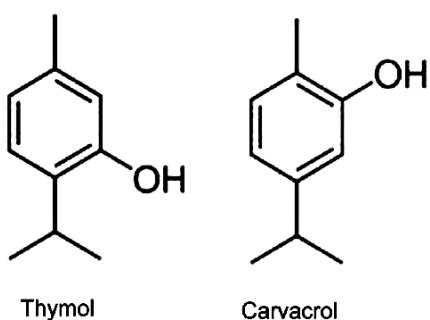
2.3 Química volátil da espécie e análises por *headspace*-CG/EM

Estudos fitoquímicos do gênero revelaram que espécies de *Plectranthus* apresentam óleo essencial, e que os metabólitos secundários mais abundantes são os diterpenoides (labdanos, abietanos, ent-cauranes) e triterpenoides (WALDIA et al., 2011). Embora haja a presença de óleo essencial, o teor do óleo das espécies do gênero é considerado baixo, menor que 0,5 % em base seca (BANDEIRA et al., 2011).

Oléo essencial é definido de acordo com a Farmacopeia Européia como produto aromático, geralmente de composição complexa, obtido a partir de matérias-primas vegetais por destilação a vapor, destilação a seco, ou por um processo mecânico adequado sem aquecimento (EUROPEAN..., 2008). É constituído por uma mistura complexa de metabólitos secundários voláteis, como os terpenóides e fenilpropanóides (SANTOS et al., 2015; WALDIA et al., 2011). Estudos relataram que o óleo essencial de *P. amboinicus* é rico em mono e sesquiterpenos (ARUMUGAN; SWAMY; SINNIHAH, 2016; KHALID; GOHARY, 2014; SANTOS et al., 2015; SENTHILKUMAR; VENKATESALU, 2010).

Os constituintes majoritários deste óleo essencial são os monoterpenos fenólicos timol e/ou carvacrol (FIGURA 2) (JOSHI; BADA KAR; KHOLKUTE, 2011; OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013; SANTOS et al., 2015; SENTHILKUMAR; VENKATESALU, 2010). Timol ocorre também nas espécies *Thymus vulgaris*, *Carum copticum*, *Baccharis grisebachii*, *Centipeda minima*, *Inula cuspidata* e *Arnica montana* (NAGLE et al., 2013), e carvacrol, em plantas dos gêneros *Origanum*, *Thymbra*, *Cordiothymus*, *Thymus*, *Satureja* e *Lippia* (SUGANTHI; MANPAL, 2013).

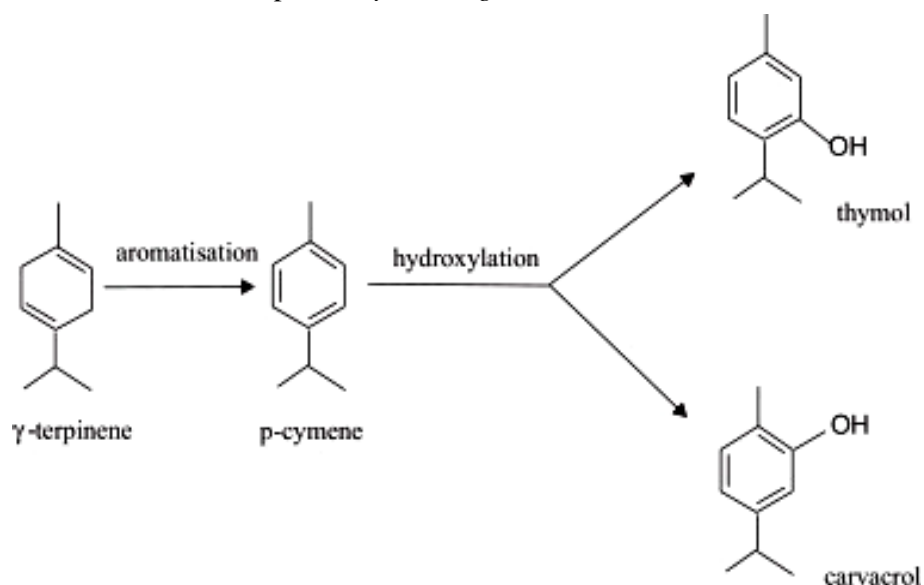
Figura 2 - Estruturas de timol e carvacrol.



Fonte: (HAJIMEHDIPOOR et al., 2010).

Há relatos na literatura que, em plantas da família Lamiaceae, timol e carvacrol são biossintetizados a partir do *p*-cimeno, α -terpineno ou γ -terpineno (CROCOLL, 2011; POULOSE; CROTEAU, 1978; STEFANAKI et al., 2016). Segundo Poulouse e Croteau (1978), a biossíntese de carvacrol e timol na espécie *Thymus vulgaris* tem início com o γ -terpineno que é transformado em *p*-cimeno através de aromatização. Em seguida, o *p*-cimeno por orto ou meta hidroxilação é convertido, respectivamente, a carvacrol e timol (FIGURA 3).

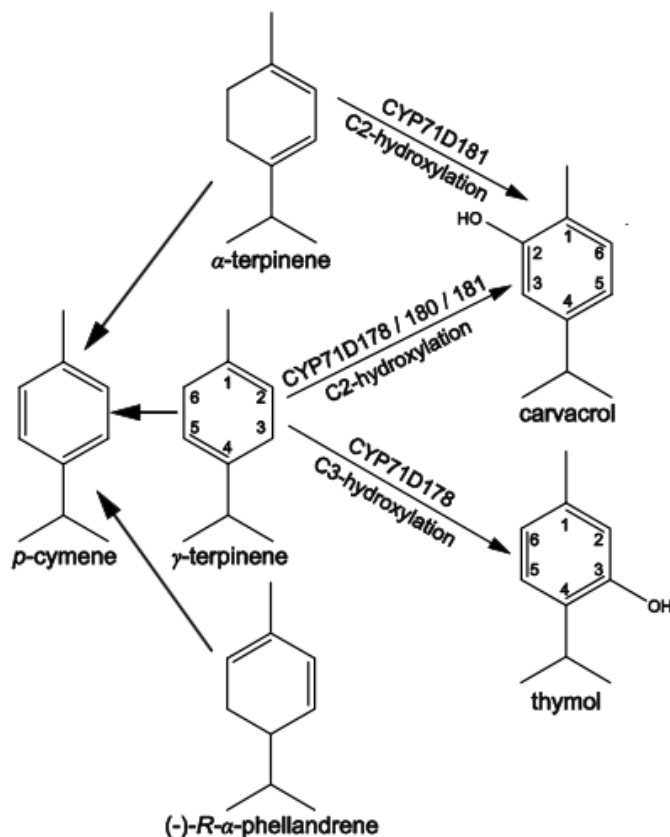
Figura 3 - Rota da biossíntese de timol e carvacrol a partir de γ -terpineno e *p*-cimeno na espécie *Thymus vulgaris*.



Fonte: (ROWSHAN; BAHMANZADEGAN; SAHARKHIZ, 2013).

De outra maneira, em plantas de *Origanum* e *Thymus*, a rota biossintética proposta por Crocoll (2011) (FIGURA 4) para o carvacrol ocorre a partir da reação de hidroxilação em C2 do α -terpineno ou γ -terpineno e a conversão a timol é realizada a partir de γ -terpineno por hidroxilação em C3. Além disso, o *p*-cimeno pode ser produzido a partir de α -terpineno, γ -terpineno e (-)-R- α -felandreno.

Figura 4 - Rota da biossíntese de timol e carvacrol em *Origanum* e *Thymus*.



Fonte: adaptada de Crocoll (2011).

Estudos relataram o efeito da variação sazonal no acúmulo de timol e carvacrol. Khalid e Gohary (2014) verificaram maior concentração de carvacrol no outono (15,90%) e de timol na primavera (12,70%). Já no trabalho de Oliveira et al. (2011), o carvacrol não foi detectado, e a concentração de timol foi maior na primavera (75,39%) que no inverno (70,28 %).

Segundo Arumugan, Swamy e Sinniah (2016), a composição química volátil em *P. amboinicus* depende de vários fatores como regiões geográficas, clima e estágios da planta da qual se retirou o material analisado. A espécie é

rica em monoterpenos oxigenados, monoterpenos hidrocarbonetos, sesquiterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados.

Uma mistura complexa de gases ou substâncias volatilizáveis pode ser separada utilizando-se a técnica denominada cromatografia gasosa (CG). A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Na análise por cromatografia gasosa, os compostos a serem analisados são vaporizados e eluídos pela fase móvel gasosa, pelo gás de arraste, através da coluna (fase estacionária). Os analitos são separados com base na sua pressão de vapor e afinidade pelo leito cromatográfico (BASER; BUCHBAUER, 2010).

A cromatografia gasosa opera na faixa de massa molecular a partir de 2 (hidrogênio molecular) até cerca de 1500 unidades de massa. Embora não exista uma tabela internacional classificativa das massas moleculares mais elevadas possíveis de serem analisadas, em termos de alcanos normais, especialistas relataram sucesso na análise cromatográfica de n- alcanos, com cerca de 1400 unidades de massa. Dentro desta faixa, os compostos que podem ser cromatografados são classificados como gases permanentes (altamente voláteis), compostos voláteis (cerca de até 200 unidades de massa) e compostos semi-voláteis (aqueles de unidade de massa mais elevada). Pela sua natureza química, os óleos essenciais estão na faixa de compostos voláteis a semi-voláteis (MARRIOTT; SHELLIE; CORNWELL, 2001).

De acordo com Bicchi et al. (2008), fração volátil é uma mistura de voláteis em uma matriz vegetal que pode ser amostrada, devido à sua capacidade para vaporizar espontaneamente e/ou em condições adequadas ou por técnicas apropriadas. Sua análise envolve uma gama de abordagens e técnicas, como *headspace*, óleos essenciais, aromas, fragrâncias ou extratos preparados por meio de técnicas específicas. Estas técnicas produzem amostras que podem ser

de diferentes composições, sendo representativas dos voláteis que caracterizam a matriz vegetal ou produtos que dela decorrem.

Corroborando com o que foi discutido anteriormente, segundo Baser e Buchbauer (2010) é de extrema importância destacar que o perfil químico de compostos voláteis de plantas está intimamente relacionado com o procedimento de extração empregado. Diversas são as técnicas de extração e/ou preparo de amostras: microhidrodestilação, hidrodestilação, arraste à vapor, extração por solvente, extração por fluido supercrítico, extração assistida por microondas, microextração por fase sólida, técnicas por *headspace*, dentre outras.

O preparo de amostras por *headspace* é um dos mais populares métodos para a análise de fragrâncias e aromas de plantas e condimentos, pois é altamente apropriado para análises de compostos muito voláteis (ASTEN, 2002; BASER; BUCHBAUER, 2010; SANZ et al., 2001). A técnica empregada é usualmente classificada de acordo com o princípio do preparo da amostra, sendo que nesse trabalho foi empregada a técnica do *headspace* estático.

2.4 Micropropagação de plantas medicinais

A micropropagação é amplamente utilizada em pesquisas envolvendo plantas medicinais (MANAN et al., 2016; NATARAJ; KHER; SILVA, 2016; YESMIN; HASHEM; INSLAM, 2015). É uma ferramenta importante para o estudo do acúmulo de metabólitos secundários e para a escolha de novas espécies fontes de compostos bioativos, aprimorando a produção de fitofármacos (MORAIS et al., 2012). Possibilita a multiplicação em massa, conservação de espécies, obtenção de plantas livres de microrganismos, dentre outras vantagens (CHEONG; MOCK; LI, 2012; COSTE et al., 2012; KAUR; SANDHU, 2015).

No cultivo *in vitro* destas plantas devem ser controlados o crescimento, a multiplicação, a produção de biomassa e parâmetros envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários. A composição do meio de cultura (reguladores de

crescimento, sacarose e outros) e parâmetros físicos como a luz, aeração e gás no ambiente (O₂, CO₂ e etileno) devem ser otimizados. É possível obter grande quantidade de biomassa, aumentar o acúmulo de metabólitos secundários ou encontrar metabólitos que não são detectados nas plantas cultivadas *in vivo* (MEDINA; CASAS, 2015; MURTHY; LEE; PAEK, 2014).

Manan et al. (2016) avaliaram a composição do óleo essencial de folhas frescas de plantas de *Ocimum basilicum* cultivadas *in vitro*, aclimatizadas e *in vivo*. A quantidade de metil chavicol em plantas *in vitro* (93,71%) superou a quantidade encontrada nas plantas *in vivo* (66,29%) mas reduziu para 60,07% após 18 semanas da aclimatização. Mendes et al. (2013) estudando *Thymus caespititius* também compararam a composição do óleo essencial *in vitro* e *in vivo*. A quantidade do monoterpeno sabineno foi maior em brotos cultivados *in vitro* (40-45%) que em plantas cultivadas *in vivo* (18%).

Medina e Casas (2015) compararam a composição do óleo essencial de plantas de *Thymus moroderi* Pau ex Martinez aclimatizadas com a composição do óleo de plantas cultivadas *in vivo*. Os autores verificaram a presença de espatulenol e óxido de cariofileno nas amostras do campo, constituintes ausentes nas plântulas aclimatizadas, e carvacrol não foi detectado nas amostras do campo, mas foi detectado nas plântulas aclimatizadas.

Em relação à micropropagação de espécies do gênero *Plectranthus*, a adição de citocininas no meio de cultura possibilita a obtenção de múltiplas brotações. Rajaram, Sriramji e Sureshkumar (2015) avaliaram o efeito de citocininas no cultivo de *P. bourneae*, a partir de explantes nodais e apicais. O maior número de brotos para nodais (8,67 brotos/ explante) e apicais (4,67 brotos/explante) foi obtido com 0,1 mg/L de benzilaminopurina (BAP).

Em trabalho similar, Thaniarasu, Kumar e Rao (2015) avaliaram citocininas na micropropagação de *P. bourneae*. Os autores observaram que 0,7 mg/L de benziladenina (BA) e 1,0 mg/L de thidiazuron (TDZ) proporcionaram

aumento no número de brotações que foi igual a 3,53 e 2,62, respectivamente. Rahman et al. (2015) também estudaram o efeito de citocininas na proliferação de brotos, mas da espécie pesquisada no presente trabalho: *P. amboinicus*. O maior número de brotos (2,4/explante) foi obtido de explantes de brotos laterais cultivados em meio de cultura MS suplementado com 3 mg/L de BAP. Observa-se que não foi obtida elevada proliferação de brotos.

Foram encontrados estudos em relação ao metabolismo secundário de espécies de *Plectranthus* apenas com o uso de outras técnicas da cultura de tecidos, e não com o uso da micropropagação. Balasubramanya, Rajanna e Anuradha (2012) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de auxina no acúmulo de forscolina em cultura de raízes de *P. barbatus*. Os autores observaram que a maior quantidade de forscolina (1,178 mg kg⁻¹ de peso seco) foi obtida em culturas de raízes iniciadas em meio B5 de Gamborg suplementado com 0,5 mg/L de ácido naftaleno acético (ANA).

Soares et al. (2013) também avaliaram o efeito de diferentes concentrações de auxinas, mas no acúmulo de compostos voláteis de calos de *P. ornatus*. Os autores verificaram que a adição de 10,08 µM de ANA e 4, 52 µM de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) aumentou os níveis de β-pineno e reduziu os de α-limoneno, comparado ao cultivo em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem regulador.

Nota-se que a aplicação da micropropagação em plantas medicinais apresenta diversas vantagens, e o protocolo ideal depende da espécie analisada e do objetivo final, podendo afetar de várias formas o crescimento e o metabolismo secundário.

2.5 Luz no cultivo *in vitro* de plantas

A luz do ambiente de cultivo é crucial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Uma das suas características é a qualidade, ou

seja, a distribuição espectral. A faixa do espectro mais importante para os vegetais é a conhecida como radiação fotossinteticamente ativa (400 a 700 nm). Estão nesta faixa os espectros do azul (400 a 500 nm) e do vermelho (600 a 700 nm), os espectros que mais afetam a fotossíntese. As moléculas de clorofila absorvem os comprimentos de onda do azul e do vermelho de forma mais eficiente. Além disso, a qualidade da luz também influencia a fotomorfogênese: forma, desenvolvimento e florescimento das plantas (ANDRADE et al., 2014; YEH; CHUNG, 2009).

As plantas detectam a qualidade da luz através de fotorreceptores: fitocromos, criptocromos e um ou mais receptor (es) de luz ultravioleta. Os picos de absorbância do fitocromo estão no vermelho (600 a 700 nm) e vermelho distante (700 a 800 nm), e em menor quantidade no azul (400 a 500 nm). Os criptocromos absorvem a luz azul (RUNK; HEINS, 2001).

Pesquisadores tem variado a composição espectral da luz do ambiente de cultivo para otimizar o crescimento das plantas e manipular o metabolismo secundário (DARKO et al., 2014; SINGH et al., 2015). Para alcançar esses objetivos, LEDs estão sendo utilizados, pois possibilitam controle espectral, produção de muda de maior qualidade, maior eficiência no processo produtivo, dentre outras vantagens (MALUTA et al., 2013; TARAKANOV et al., 2012).

Como exemplos, Batista et al. (2016) avaliaram a influência de lâmpada fluorescente, LED branco, e combinação de azul e vermelho (LED) no crescimento e na análise do perfil do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada *in vitro*. Em comparação à lâmpada fluorescente, a combinação de azul e vermelho (LED) proporcionou maior peso fresco e seco para alguns quimiotipos da espécie. Além disso, este tratamento proporcionou maior quantidade de pigmentos fotossintéticos em todos os quimiotipos. Os autores observaram que a qualidade da luz afetou eucaliptol e linalol.

Em *Gentiana* spp, Takahashi et al. (2012) avaliaram o efeito de diferentes composições espectrais de LED no crescimento *in vitro* e concentração de componentes ativos. O vermelho melhorou o crescimento das plantas. Além disso, a concentração de gentiopicrina e *swertiamarin* nas raízes aumentou com o cultivo sob vermelho distante e azul. Em outro trabalho, Manivannan et al. (2015) estudaram *Rehmannia glutinosa* cultivada *in vitro* e verificaram que o LED azul aumentou a atividade de enzimas antioxidantes tanto na folha como na raiz, seguido pelo tratamento com LED vermelho.

Além de serem sensíveis à qualidade da luz, as plantas também são sensíveis à intensidade ou quantidade deste fator ambiental. Em situações nas quais a intensidade é muito fraca, a fotossíntese ocorre de maneira ineficiente. Por outro lado, o excesso de luz pode inibir a fotossíntese através da foto-inibição e foto-oxidação (DARKO et al., 2014; TAIZ; ZIEGER, 2004).

A foto-inibição é reversível e caracterizada por danos nos centros de reação, devido à superexcitação. A foto-oxidação é irreversível e relacionada aos pigmentos receptores de luz. Sob excesso de luz, os pigmentos interagem com o O₂ produzindo radicais livres. As plantas apresentam defesas para essa situação, como exemplo a enzima superóxido dismutase, mas estas defesas não são eficazes se a exposição ao excesso de luz for muito prolongada (TAIZ; ZIEGER, 2004).

As clorofilas a e b e os carotenoides são pigmentos que participam da fotossíntese. As concentrações destes pigmentos indicam a suscetibilidade da planta à intensidade da luz. Como discutido anteriormente, as clorofilas tendem a ser foto-oxidadas devido ao excesso de luz, e os carotenoides podem prevenir essa foto-oxidação (STREIT et al., 2005). Em ambas situações de quantidade de luz descritas, ocorre a limitação do metabolismo primário, podendo afetar a atividade enzimática e o metabolismo secundário (ALI; HAHN; PAEK, 2005; BASSOLINO et al., 2015; DARKO et al., 2014).

Na literatura, há relatos dos efeitos da intensidade da luz no crescimento e metabolismo secundário de plantas cultivadas *in vitro*. Como exemplo do efeito no crescimento, pode ser citado o trabalho de Zhou et al. (2008) que avaliaram o crescimento e pigmentos fotossintéticos de gengibre *in vitro* nas intensidades de 60, 120, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sob as intensidades de luz 60 e 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o crescimento das plântulas foi adequado. Já sob a intensidade de 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o crescimento foi reduzido. O teor de clorofila diminuiu à medida que a intensidade da luz foi aumentada.

No trabalho de Zhang et al. (2009), a intensidade de luz também afetou o crescimento. Os autores cultivaram *Momordica grosvenori in vitro* sob quatro intensidades de luz: 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As mais fortes intensidades de luz incrementaram a matéria fresca e seca de plantas, sendo a intensidade de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a mais adequada para o crescimento.

Como exemplo de efeito da intensidade da luz no metabolismo secundário pode ser citado o trabalho de Bassolino et al. (2015) que cultivaram *Salvia dolomitica* sob duas intensidades de luz: 30 e 45 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e avaliaram o seu óleo essencial. A porcentagem de sesquiterpenos diminuiu fortemente nas plântulas cultivadas *in vitro* sob a mais alta intensidade de luz, e a concentração de monoterpenos aumentou, em comparação à quantidade observada em plantas cultivadas *in vivo*.

Em *Achillea millefolium*, Alvarenga et al. (2015) avaliaram o efeito das intensidades 13, 27, 35,47 e 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no crescimento e composição química volátil da espécie cultivada *in vitro*. A intensidade de 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionou o melhor crescimento. O conteúdo de sesquiterpenos decresceu sob altas intensidades de luz. De um modo geral, estudos confirmam que as respostas das plantas à qualidade e intensidade de luz são específicas, ou seja, dependentes da espécie, e mudanças nestes fatores ambientais podem alterar a composição química volátil.

2.6 Sistema de ventilação natural no cultivo *in vitro* de plantas

No sistema de cultivo *in vitro* convencional os recipientes são fechados para evitar a ocorrência de contaminação por agentes externos e ressecamento do explante. Com isso, o microambiente formado apresenta alta umidade relativa, acúmulo de etileno, estagnação de ar e baixa concentração de CO₂. Assim, as plantas apresentam anomalias como o mau funcionamento dos estômatos, pouco desenvolvimento epicuticular, baixa concentração de clorofilas, hiperidricidade, raízes mal formadas e reduzida sobrevivência na fase de aclimatização (CHEN, 2004; HAZARIKA, 2006; ISAH, 2015; SHUELTER et al., 2015; XIAO; NIU; KOZAI, 2011).

O etileno é um fitohormônio gasoso que é produzido por plantas cultivadas *in vitro* sob condições de estresse, como acumulação de água no apoplasto e baixa disponibilidade de oxigênio (KIFERLE et al., 2014). Quando não se pode difundir livremente para a atmosfera, como no caso do cultivo *in vitro* convencional, é acumulado nos tecidos das plantas (VISSER; PIERIK, 2007). Este acúmulo pode estimular ou inibir o crescimento e metabolismo secundário, afetar a morfogênese das plântulas, induzir a quebra de clorofila, afetar negativamente a fotossíntese e causar hiperidricidade (HAZARIKA, 2006; KIFERLE et al., 2014).

As plantas com hiperidricidade ficam quadradas, com cor verde claro, folhas translúcidas, aparência vítrea e hipolignificadas. Esta anomalia ocorre também devido ao acúmulo anormal de água no interior de células e tecidos, o que pode ser causado pela umidade do ambiente dos recipientes de cultivo *in vitro* convencional, dentre outros fatores (TABART et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2012).

O uso do sistema de ventilação natural é uma das maneiras de reduzir os problemas anteriormente citados. Este sistema pode ser obtido através da vedação do recipiente de cultivo com materiais que evitam a contaminação e o

ressecamento do explante, mas possibilitam trocas gasosas entre o microambiente *in vitro* e o ambiente externo. De acordo com Moreira et al. (2013), os efeitos do seu uso incluem a diminuição da umidade relativa, aumento da aeração, produção de plantas mais rústicas e como consequência, maior sobrevivência na fase de aclimatização.

Além disso, o uso deste sistema mantém as concentrações de CO₂ adequadas para estimular a fotossíntese (SALDANHA et al., 2012). O aumento da concentração de CO₂ promove o enraizamento e reduz as anomalias de crescimento, pois pode melhorar a taxa fotossintética (CHA-UM et al., 2011). A baixa concentração de CO₂ promove a abertura estomática, e a alta induz o fechamento dos estômatos (NEGI et al., 2014). A abertura dos estômatos para a absorção de CO₂ está associada a uma perda de água pelas folhas, ou seja, a transpiração (GOLEC; SZAREJKO, 2013).

Há relatos também na literatura do efeito do CO₂ no metabolismo secundário das plantas. Em *Thymus vulgaris* L., Tisserat e Vaughn (2001) avaliaram o óleo essencial de plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro* sob diferentes níveis de CO₂. Sob níveis mais altos, as cultivadas *in vitro* acumularam mais compostos secundários que as cultivadas *in vivo*. A concentração de timol das plântulas *in vitro* sob o nível de 10.000 mol mol⁻¹ foi 317 vezes superior à de plantas *in vitro* cultivadas em condição de ar ambiente. Em outro trabalho, Zhu et al. (2015) verificaram que aumentos na concentração atmosférica de CO₂ possibilita maior quantidade de artemisinina em *Artemisia annua*.

Analisando especificamente o sistema de ventilação natural, trabalhos relataram vários efeitos em plantas cultivadas *in vitro*, como melhoria no crescimento e aumento da concentração de pigmentos fotossintéticos. No trabalho de Saldanha et al. (2012) com a espécie *Pfaffia glomerata*, este sistema melhorou o crescimento *in vitro* e aumentou o conteúdo de pigmentos fotossintéticos das plântulas em comparação ao sistema convencional. Pode ser

citado também o trabalho de Bandeira et al. (2007), no qual os autores avaliaram diferentes tipos de vedações de frascos na micropropagação de *Thymus vulgaris* L: alumínio, algodão e filme de polivinilcloro. As plantas apresentaram melhor crescimento com o uso de vedação de algodão.

Há também relatos na literatura sobre a influência do sistema de ventilação natural na anatomia de plantas cultivadas *in vitro*, tornando-as mais rústicas. No trabalho de Silva et al. (2014a), com *Cattleya walkeriana*, a ventilação natural proporcionou aumento da espessura do mesofilo foliar e estômatos com o formato mais elíptico, provavelmente mais funcionais. Já no trabalho de Silva et al. (2014b), com plântulas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*, a ventilação natural proporcionou maior espessura do parênquima clorofiliano.

Em outro estudo, Mohamed e Alsdon (2010) avaliaram a anatomia de plântulas de batata cultivadas *in vitro*, e verificaram que o uso da ventilação natural resultou em folhas mais espessas e com xilema mais desenvolvido em relação ao sistema convencional. Como outro exemplo de alteração na anatomia, pode ser citado o trabalho de Sáez et al. (2012) que cultivaram *in vitro* microbrotos de *Castanea sativa* em recipientes ventilados e não ventilados, sob duas intensidades de luz (50 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O uso da ventilação natural e da maior intensidade melhorou a capacidade de resposta dos estômatos e aumentou a capacidade de controle de perda de água pelas plantas.

Corroborando com o que foi discutido anteriormente, a ventilação natural reduz o problema da hiperhidricidade por diminuir o acúmulo de etileno e umidade dentro do recipiente de cultivo. Em plântulas de *Aloe polyphylla* cultivadas *in vitro* no trabalho de Ivanova e Staden (2010), em recipientes fechados, os autores verificaram 84% de hiperhidricidade. Com o sistema de ventilação natural, a hiperhidricidade foi eliminada.

Os métodos que promovem ventilação no cultivo *in vitro*, de um modo geral, além de afetar as características de plantas citadas anteriormente, também podem afetar o metabolismo secundário. Como exemplo pode ser citado o trabalho de Mohamed e Ibrahim (2012). Os autores cultivaram *Ruta graveolens* L. em recipientes com taxas de ventilação iguais a 7,44, 10,82 e 62,83 de trocas de ar por dia e diferentes concentrações de manitol. A concentração de cumarina quando foi utilizado 2% de manitol foi maior (4,07 e 4,06 mg/g de peso seco) sob as maiores taxas de ventilação (10,82 e 62,83) que sob a menor (7,44; 2,32 mg/g de peso seco).

Os trabalhos citados confirmam que a ventilação natural pode ter efeito no crescimento e no acúmulo de metabólitos secundários das plantas, inclusive na composição química volátil.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

P. amboinicus é uma planta medicinal com diversas aplicações potenciais, tanto na área da saúde como anti-inflamatória, contra células de câncer de mama, dentre outras aplicações, como na indústria de alimentos, devido à sua propriedade antioxidante, e na área ambiental por ser rizofiltradora de substância tóxica ao meio ambiente e poder ser utilizada para a limpeza de água.

Apesar de ter grande potencial de aplicação em diversas áreas, esta espécie ainda é pouco estudada do ponto de vista agrônomo. Foram encontrados poucos trabalhos na literatura sobre o cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Plectranthus* e com *P. amboinicus*. Não foram encontrados trabalhos que investigaram os efeitos da luz e de sistema de ventilação natural no crescimento *in vitro* e na composição química de folhas da espécie analisada por *headspace*-CG/EM.

REFERÊNCIAS

ALI, M. M.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Effects of light intensities on antioxidant enzymes and malondialdehyde content during short-term acclimatization on micropropagated *Phalaenopsis* plantlet. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 54, n. 2, p. 9-120, Sept. 2005.

ALVARENGA, I. C. A. 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**, Dordrecht, v. 122, n. 2, p. 299-308, Aug. 2015.

ANDRADE, A. M. D. et al. Radiação fotossinteticamente ativa incidente e refletida acima e abaixo do dossel de floresta de mata atlântica em coruripe, Alagoas. **Revista Brasileira de Meteorologia**, São José dos Campos, v. 29, n. 1, p. 68-79, 2014.

ARJUNAN, N. et al. Mosquitocidal and water purification properties of *Cynodon dactylon*, *Aloe vera*, *Hemidesmus indicus* and *Coleus amboinicus* leaf extracts against the mosquito vectors. **Parasitology Research**, Berlin, v. 110, n. 4, p. 1435-1443, Apr. 2012.

ARUMUGAM, G.; SWAMY, M. K.; SINNIAH, U. R. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 4, p. E369, Mar. 2016.

ASTEN, A. V. The importance of GC and GC-MS in perfume analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 9/10, p. 698-708, Sept. 2002.

BALASUBRAMANYA, S.; RAJANNA, L.; ANURADHA, M. Effect of plant growth regulators on morphogenesis and forskolin production in *Plectranthus barbatus* Andrews. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 48, n. 2, p. 208-215, Apr. 2012.

BANDEIRA, J. M. et al. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus* Essential oil composition of four *Plectranthus* species. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 157-164, 2011.

BANDEIRA, J. M. et al. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. nota científica. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 472-474, 2007. Suplemento.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology and applications**. Boca Raton: CRC, 2010. 157 p.

BASSOLINO, L. et al. Tissue culture and aromatic profile in *Salvia dolomitica* Codd. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 121, n. 1, p. 83-95, Apr. 2015.

BATISTA, D. S. et al. Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, 2016. In press. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11627-016-9761-x>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

BHATT, P.; NEGI, P. S. Antioxidant and antibacterial activities in the leaf extracts of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*). **Food and Nutrition Sciences**, Dover, v. 3, n. 2, p. 146-152, Feb. 2012.

BICCHI, C. et al. *Headspace* sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1184, n. 1/2, p. 220-233, Mar. 2008.

BRANDÃO, E. M. et al. Antineoplastic effect of aqueous extract of *Plectranthus Amboinicus* in ehrlich ascites carcinoma. **Journal of Cancer**, Wyoming, v. 4, n. 7, p. 573-576, Aug. 2013.

CHA-UM, S. et al. Promoting root induction and growth of in vitro macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, p. 435-444, Sept. 2011.

CHEN, C. Application of growth models to evaluate the microenvironmental conditions using tissue culture plantlets of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 191, p. 25-30, Aug. 2015.

CHEN, C. Humidity in plant tissue culture vessels. **Biosystems Engineering**, London, v. 88, n. 2, p. 231-241, June 2004.

CHEN, C. *In Situ* measurement of microclimate for the plantlets cultured in vitro. **Biosystems Engineering**, London, v. 95, n. 3, p. 413-426, Nov. 2006.

CHEONG, E. J.; MOCK, R.; LI, R. Elimination of five viruses from sugarcane using *in vitro* culture of axillary buds and apical meristems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 3, p. 439-445, June 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. 453 p.

COSTE, A. et al. *In vitro* propagation and cryopreservation of *Romanian* endemic and rare *Hypericum* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, n. 2, p. 213-226, Aug. 2012.

CROCOLL, C. **Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme**. 2011. 143 p. Dissertation (Zur Erlangung des Akademischen Grades Doctor Rerum Naturalium) - Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, 2011.

DARKO, E. et al. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 369, n. 1640, Mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24591723>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

EUROPEAN pharmacopoeia. 6th ed. Strasbourg: EDQM, 2008. 680 p.

FOMENKOV, A. A. et al. Ethylene in the proliferation of cultured plant cells: regulating or just going along? **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 62, n. 6, p. 815-822, 2015.

FREITAS, M. A. C. et al. Crescimento e tolerância à salinidade em três espécies medicinais do gênero *Plectranthus* expostas a diferentes níveis de radiação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 839-849, 2014.

GOLEC, A. D.; SZAREJKO, I. Open or close the gate: stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 13, n. 4, p. 138, May 2013.

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

GURGEL, A. P. A. D. et al. *In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 125, n. 2, p. 361-363, Sept. 2009.

HAJIMEHDIPOOR, H. et al. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. **Pharmacognosy Magazine**, Bangalore, v. 6, n. 23, p. 154-158, July/Sept. 2010.

HASIBUAN, P. A. Z. A.; CHRESTELLA, J. B.; SATRIA, D. C. Combination effect of ethylacetate extracts of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng. with doxorubicin againts T47D breast cancer cells. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya Pradesh, v. 7, n. 10, p. 156-159, Dec. 2014.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105-120, Apr. 2006.

HULLATTI, K. K.; BHATTACHARJEE, P. Pharmacognostical evaluation of different parts of *Coleus amboinicus* Lour., Lamiaceae. **Pharmacognosy Journal**, New York, v. 3, n. 24, p. 39-44, Aug. 2011.

IGNATIUS, A. et al. Rhizofiltration of lead using an aromatic medicinal plant *Plectranthus amboinicus* cultured in a hydroponic nutrient film technique (NFT) system. **Environmental Science and Pollution Research**, London, v. 21, n. 22, p. 13007-13016, Nov. 2014.

ISAH, T. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. **Acta Biologica Cracoviensia**, Krakow, v. 57, n. 2, p. 9-28, Dec. 2015.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 60, n. 2, p. 143-150, Mar. 2010.

JIMÉNEZ, M. P. et al. A regime of high CO₂ concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 121, n. 3, p. 547-557, June 2015.

JOSHI, R. K.; BADA KAR, V.; KHOLKUTE, S. D. Carvacrol rich essential oils of *Coleus aromaticus* (Benth.) from Western Ghats Region of North West Karnataka, India. **Advances in Environmental Biology**, Amman, v. 5, n. 6, p. 1307-1310, Apr. 2011.

KALA, C. P. Medicinal and aromatic plants: boon for enterprise development. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, New York, v. 2, n. 4, p. 134-139, Dec. 2015.

KALA, C. P. Medicinal plants conservation and enterprise development. **Medicinal Plants**, v. 1, p. 79-95, Jan. 2009.

KAUR, A.; SANDHU, J. S. High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: cost analysis for agri-business industry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 120, n. 1, p. 339-350, 2015.

KHALID, A. K.; EL-GOHARY, A. E. Effect of seasonal variations on essential oil production and composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) grow in Egypt. **International Food Research Journal**, Selangor, v. 21, n. 5, p. 1859-1862, 2014.

KHARE, R. S.; BANERJEE, S.; KUNDU, K. *Coleus aromaticus* Benth-A nutritive medicinal plant of potential therapeutic value. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Utha, v. 2, n. 3, p. B488, July/Sept. 2011.

KIFERLE, C. et al. *In vitro* culture of sweet basil: gas exchanges, growth, and rosmarinic acid production. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 58, n. 4, p. 601-610, 2014.

KOTI, B. C. et al. Alcoholic leaf extract of *Plectranthus amboinicus* regulates carbohydrate metabolism in alloxan-induced diabetic rats. **Indian Journal of Pharmacology**, Mumbai, v. 4, n. 3, p. 286-290, May 2011.

LUKHIBA, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n. 1, p. 1-24, Jan. 2006.

MALUTA, F. A. et al. *In vitro* culture of sugarcane exposed to different light sources. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 9, p. 1303-1307, set. 2013.

MANAN, A. A. et al. *In vitro* flowering, glandular trichomes ultrastructure, and essential oil accumulation in micropropagated *Ocimum basilicum* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, 2016. In press.
Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11627-016-9755-8>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

MANIVANNAN, A. et al. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidante enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 1, p. 105-113, Feb. 2015.

MANJAMALAI, A.; GRACE, V. M. The chemotherapeutic effect of essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour) on lung metastasis developed by B16F-10 cell line in C57BL/6 mice. **Cancer Investigation**, Abingdon, v. 31, n. 1, p. 74-82, Jan. 2013.

MARRIOTT, P. J.; SHELLIE, R.; CORNWELL, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 936, n. 1/2, p. 1-22, Nov. 2001.

MARY, R. N. I.; BANU, N. Screening of anti-biofilm, anti-quorum sensing activity from methanolic extract of *Plectranthus amboinicus* (Lour.). **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Utha, v. 6, n. 4, p. 1060-1068, 2015.

MAURO, C. et al. Estudo anatômico comparado de órgãos vegetativos de boldo miúdo, *Plectranthus ornatus* Codd. E malvariço, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng- Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 608-613, out./dez. 2008.

MEDINA, A. M.; CASAS, J. L. *In vitro* multiplication and essential oil composition of *Thymus moroderi* Pau ex Martinez, an endemic Spanish plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 120, n. 1, p. 99-108, Jan. 2015.

MENDES, M. D. et al. Essential oil production in shoot cultures versus field-grown plants of *Thymus caespititius*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 113, n. 2, p. 341-351, May 2013.

- MESSIAS, M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.
- MOHAMED, M. A. H.; ALSADON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 295-300, Jan. 2010.
- MOHAMED, M. A. H.; IBRAHIM, T. A. A. Enhanced *in vitro* production of *Ruta graveolens* L. coumarins and rutin by mannitol and ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, p. 335-343, June 2012.
- MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.
- MOREIRA, A. L. et al. Crescimento de *Cattleya walkeriana* em diferentes sistemas de micropropagação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.
- MOREIRA, R. C. T. et al. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, n. 3, p. 1-7, 2002.
- MORTON, J. K. Cytotaxonomic studies on the West African Labitae. **Journal of the Linnean Society of London: Botany**, London, v. 58, n. 372, p. 231-283, July 1962.
- MOYA, C. T.; GISBERT, C. The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, n. 1, p. 41-48, Oct. 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 118, n. 1, p. 1-16, July 2014.

NAGLE, P. S. et al. Thymol: synthesis, reactions & its spectrum of pharmacological and chemical applications. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, Santranjipura, v. 3, n. 9, p. 7549-7561, 2013.

NATARAJ, M.; KHER, M. M.; SILVA, J. A. T. Micropropagation of *Clerodendrum* L. species: a review. **Rendiconti Lincei**, New York, v. 27, n. 2, p. 169-179, June 2016.

NEGI, J. et al. New approaches to the biology of stomatal guard cells. **Cell Physiology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 241-250, 2014.

OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes voláteis de *Mentha Pulegium* L e *Plectranthus amboinicus* (Lour, Spreng). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 165-169, 2011.

PLANT list, The. Version 1.1. 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em: 2 jun. 2016.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 187, p. 307-314, 1978.

RAHMAN, Z. A. et al. *In vitro* micropropagation of a valuable medicinal plant, *Plectranthus amboinicus*. **American Journal of Plant Sciences**, Dover, v. 6, n. 8, p. 1091-1097, May 2015.

RAJARAM, K.; SRIRAMJI, P.; SURESHKUMAR, P. Micropropagation, antioxidante and antimicrobial effect of *Plectranthus bourneae* Gamble: in endangered medicinal plant. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, Andhara Pradesh, v. 8, n. 1, p. 142-147, Jan./Mar. 2015.

RAMLI, N. et al. Antimalarial activity of Malaysian *Plectranthus amboinicus* against *Plasmodium berghei*. **Pharmacognosy Research**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 280-284, Oct./Dec. 2014.

REVATHI, A. et al. Microbiological activity of essential oil extracted from *Coleus aromaticus* Linn. Leaves. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, Mumbai, v. 2, n. 1, p. 12-14, Jan./Mar. 2011.

RICE, L. J. et al. *Plectranthus*: a plant for the future? **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 77, n. 4, p. 947-959, Oct. 2011.

RODRIGUES, F. F. G. et al. Study of the interference between *Plectranthus* species essential oils from Brazil and Aminoglycosides. **Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and alternative Medicine**, Cairo, v. 2013, Apr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23662150>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

ROSHAN, P. et al. *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng: an overview. **The Pharma Research**, New Delhi, v. 21, n. 4, p. E369, Mar. 2010.

ROSHAN, V.; BAHMANZADEGAN, A.; SAHARKHIZ, M. J. Influence of storage conditions on the essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. **Industrial Crops and Products**, London, v. 49, p. 97-101, Aug. 2013.

RUNKLE, S. E.; HEINS, R. D. Specific functions of red, far red, and blue light in flowering and stem extension of long-day plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 126, n. 3, p. 275-282, 2001.

SÁEZ, P. L. et al. Increased light intensity during in vitro culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 138, p. 7-16, May 2012.

SALDANHA, C. W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, n. 3, p. 413-422, Sept. 2012.

SANTOS, N. O. et al. Accessing the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian Plants-*Eremanthus erythropappus* (Asteraceae), *Plectranthus barbatus*, and *P. amboinicus* (Lamiaceae). **Molecules**, Basel, v. 20, n. 5, p. 8440-8452, May 2015.

SANZ, C. et al. Optimizing *headspace* temperature and time sampling for identification of volatile compounds in ground roasted arábica coffee. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 3, p. 1364-1369, Mar. 2001.

SELVAKUMAR, P.; NAVEENA, B. E.; PRAKASH, D. Studies on the antidandruff activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and *Eucalyptus globulus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Canberra, v. 2, p. 5715-5719, 2012. Supplement 2.

SENTHILKUMAR, A.; VENKATESALU, V. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, n. 5, p. 1275-1278, Oct. 2010.

SHENOY, S. et al. Hepatoprotective activity of *Plectranthus amboinicus* against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. **International Journal of Pharmacology and Clinical Sciences**, Manipal, v. 1, n. 2, p. 32-38, 2012.

SHIMODA, K. et al. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 67, n. 20, p. 2256-2261, Oct. 2006.

SHUELTER, A. R. et al. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial *in vitro* de plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* DUNAL). **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 14, n. 3, p. 183-190, jul./set. 2015.

SIAHSAR, B. et al. Application of biotechnology in production of medicinal plants. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Dubai, v. 11, n. 3, p. 439-444, 2011.

SILVA, A. B. da et al. Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) micropropagado. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 380-386, mar./abr. 2014a.

SILVA, A. B. da et al. In vitro growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 61, n. 6, p. 883-890, nov./dez. 2014b.

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

SOARES, H. C. P. et al. Volatile organic compounds obtained by *in vitro* callus cultivation of *Plectranthus ornatus* Codd. (Lamiaceae). **Molecules**, Basel, v. 18, n. 9, p. 10320-10333, 2013.

STEFANAKI, A. et al. The oregano plants of Chios Island (Greece): essential oils of *Origanum onites* L. growing wild in different habitats. **Industrial Crops and Products**, London, v. 82, p. 107-113, Apr. 2016.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, maio/jun. 2005.

SUGANTHI, R. U.; MANPAL, S. Biological and pharmacological of actions carvacrol and its effects on poultry: an updated review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya Pradesh, v. 2, n. 5, p. 3581-3595, 2013.

TABART, J. et al. Effect of polyamines and polyamine precursors on hyperhydricity in micropropagated apple shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 120, n. 1, p. 11-18, Jan. 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKAHASHI, H. et al. Modification of light quality improves the growth and medicinal quality of clonal plantlets derived from the herbal plant *Gentiana*. **Plant Biotechnology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 315-318, 2012.

TARAKANOV, I. et al. Light-emitting Diodes: on the way to combinatorial lighting Technologies for basic research and crop production. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 956, 2012. Abstract. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/956/956_17.htm>. Acesso em: 10 mar. 2015.

THANIRASU, R.; KUMAR, T. S.; RAO, M. V. *In vitro* propagation of *Plectranthus bourneae* Gamble-an endemic red listed plant. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Bangladesh, v. 25, n. 2, p. 273-284, 2015.

TISSERAT, B.; VAUGHN, S. F. Essential oils enhanced by ultra-high carbon dioxide levels from Lamiaceae species grown in vitro and in vivo. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 4, p. 361-368, June 2001.

TRIVELLINI, A. et al. Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. **Industrial Crops and Products**, London, v. 83, p. 241-254, May 2016.

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 837-844, maio 2012.

VISSER, E. J. W.; PIERIK, R. Inhibition of root elongation by ethylene in wetland and non-wetland plant species and the impact of longitudinal ventilation. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 31-38, Jan. 2007.

VISWANATHASWAMY, A. H. et al. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity of *Plectranthus amboinicus* on normal and alloxan-induced diabetic rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Jaipur, v. 73, n. 2, p. 139-45, Mar. 2011.

WALDIA, S. et al. The Genus *Plectranthus* in India and Its chemistry. **Chemistry & Biodiversity**, Weinheim, v. 8, n. 2, p. 244-252, Feb. 2011.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 149-158, May 2011.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 13, n. 8, p. 2175-2180, Oct. 2009.

YESMIN, S.; HASHEM, A.; INSLAM, M. S. Micropropagation of an important medicinal herb *Eclipta alba* (L.) Hassk. **Jahangirnagar University Journal of Biological Science**, Bangladesh, v. 4, n. 1, p. 61-69, June 2015.

ZHANG, M. et al. Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **HortScience**, Alexandria, v. 44, n. 3, p. 757-763, June 2009.

ZHOU, M. et al. Effects of sucrose concentration and light intensity on growth and photosynthesis of ginger plantlets *in vitro*. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, Sichuan, v. 14, n. 3, p. 356-361, June 2008.

ZHU, C. et al. Historical and experimental evidence for enhanced concentration of artemisinin, a global anti-malarial treatment, with recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide. **Climatic Change**, Dordrecht, v. 132, n. 2, p. 295-306, Sept. 2015.

ZISKA, L. H.; PANICKER, S.; WOJNO, H. L. Recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide and the potential impacts on growth and alkaloid production in wild poppy (*Papaver setigerum* DC.). **Climatic Change**, Dordrecht, v. 91, p. 395-403, Dec. 2008.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 2, p. 155-165, May 2002.

**CAPÍTULO 2 QUALIDADE E INTENSIDADE DE LUZ NO
CRESCIMENTO *in vitro* E ANÁLISE POR *headspace* - CG/EM DE
*Plectranthus amboinicus***

RESUMO

Plectranthus amboinicus é uma planta com grande potencial medicinal proporcionado pelo seu óleo essencial e outras classes de metabólitos secundários. O cultivo *in vitro* tem sido aplicado a espécies medicinais como esta Lamiaceae, por possibilitar a multiplicação em massa e do ponto de vista qualitativo e quantitativo, a obtenção de perfil químico distinto do obtido *in vivo*. Uma das formas de moldar o metabolismo secundário *in vitro* é variar as características da luz do ambiente. Assim, objetivou-se avaliar o efeito de qualidades e intensidades de luz no crescimento *in vitro* e na análise por *headspace* - CG/EM de folhas da espécie. Foram realizados dois experimentos. No experimento de qualidade de luz, segmentos apicais foram cultivados por 50 dias sob diodo emissor de luz (LED) azul; vermelho; 1 azul: 2,5 vermelho; 2,5 azul:1vermelho; 1azul:1vermelho e lâmpada fluorescente branca fria. No experimento de intensidade, segmentos nodais foram cultivados por 83 dias sob 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpada fluorescente branca fria). Em ambos, avaliaram-se o crescimento e análise de folhas. No experimento de intensidade, avaliou-se também a concentração de pigmentos fotossintéticos. No experimento de qualidade, o LED vermelho proporcionou maior comprimento da parte aérea, matérias secas de folhas e total. Além disso, resultou em maior acúmulo de carvacrol que a lâmpada fluorescente. No experimento de intensidade, 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram maiores matérias secas de folhas, caule, total e acúmulo de carvacrol. A concentração de pigmentos fotossintéticos reduziu com o aumento das intensidades. De um modo geral, os constituintes majoritários foram α -terpineno, *p*-cimeno, γ - terpineno, carvacrol, (*E*)- cariofileno e α -*trans*-bergamoteno, sendo o carvacrol o constituinte presente em maior quantidade. Concluiu-se que o LED vermelho tem efeito benéfico sobre o crescimento e composição química volátil de plântulas oriundas de segmentos apicais, e 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionam esse efeito benéfico em plântulas oriundas de segmentos nodais.

Palavras-chave: Luz. Espectro. Irradiância. Carvacrol.

ABSTRACT

Plectranthus amboinicus is a plant with great medicinal potential provided by its essential oil and other classes of secondary metabolites. *In vitro* cultivation has been applied to medicinal species such as this Lamiaceae for allowing the mass multiplication and, from a qualitative and quantitative point-of-view, the obtaining of a chemical profile distinct from that obtained *in vivo*. One of the forms to mold secondary metabolism *in vitro* is to vary the light characteristics of the environment. Thus, we aimed at evaluating the effect of light quality and intensities on *in vitro* growth and on *headspace*-CG/EM analysis of leaves of this species. Two experiments were conducted. In the experiment for light quality, apical segments were cultivated for 50 days under blue; red; 1 blue:2.5 red; 2.5 blue:1 red; 1 blue:1 red light emitting diodes (LEDs) and cold white fluorescent lamp. In the intensity experiment, nodal segments were cultivated for 83 days under the intensities of 26, 51, 69, 94 and 130 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (cold white fluorescent lamp). In both experiments, we evaluated the growth and leaf analysis. In the intensity experiment, we also evaluated the concentration of photosynthetic pigments. In the quality experiment, red LED provided greatest length for the shoot and higher total and leaf dry matter. In addition, the red LED resulted in higher accumulation of carvacrol when compared to the fluorescent lamp. In the intensity experiment, 69 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ presented higher contents of leaf, stem and total dry matter, as well as the accumulation of carvacrol. The concentration of photosynthetic pigments reduced with the increase in intensities. In general, the major constituents were α -terpinene, *p*-cimene, γ -terpinene, carvacrol, (*E*)-caryophyllene and α -trans-bergamotene, with carvacrol present in higher amounts. In conclusion, the red LED has beneficial effect over the growth and volatile chemical composition of plantlets derived from apical segments, and 69 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ provides this beneficial effect on plantlets derived from nodal segments.

Keywords: Light. Spectrum. Irradiance. Carvacrol.

1 INTRODUÇÃO

Plectranthus amboinicus é uma Lamiaceae que apresenta potencial antioxidante, anti-inflamatório, hepatoprotetor dentre outras propriedades conferidas pelo seu óleo essencial e outras classes de metabólitos secundários (CHEN et al., 2014; MARY; BANU, 2015; RAJESH; GAYATHRI, 2015). Esta espécie é utilizada no nordeste do Brasil para tratamento de tosse, gripe, verme, problemas hepáticos e hemorroidas (MOREIRA et al., 2002).

O cultivo *in vitro* tem sido utilizado em pesquisas envolvendo plantas medicinais (MANAN et al., 2016; NATARAJ; KHER; SILVA, 2016; YESMIN; HASHEM; INSLAM, 2015). Além da multiplicação em massa, conservação, obtenção de plantas livres de microrganismos e uniformes, esta técnica possibilita do ponto de vista qualitativo e quantitativo, obtenção de composição química distinta da obtida *in vivo*. Para obter sucesso com este tipo de cultivo, é necessário que parâmetros ambientais envolvidos no crescimento e biossíntese de metabólitos secundários, como a luz, sejam otimizados (BANDEIRA et al., 2007; MEDINA; CASAS, 2015; MURTHY; LEE; PAEK, 2014).

A qualidade da luz afeta a fotossíntese, sendo os espectros do azul e do vermelho os que afetam de forma mais intensa. Além disso, esse parâmetro também influencia a fotomorfogênese (YEH; CHUNG, 2009). Foram relatados efeitos da qualidade da luz no crescimento *in vitro* e metabolismo secundário de *Lippia alba* (BATISTA et al., 2016), *Gentiana* spp. (TAKAHASHI et al., 2012), *Rehmania glutinosa* (MANIVANNAN et al., 2015), dentre outras espécies.

Como o efeito da luz é variável, para obter a qualidade da luz adequada para cada espécie e objetivo, diodos emissores de luz (LEDs) têm sido utilizados, pois possibilitam o controle espectral, produção de muda de maior qualidade e maior eficiência no processo produtivo (MALUTA et al., 2013; MANIVANNAN et al., 2015; SINGH et al., 2015; TARAKANOV et al., 2012).

A intensidade da luz é o principal parâmetro que afeta a fotossíntese (YEH; CHUNG, 2009). Quando a intensidade é muito fraca, a fotossíntese ocorre de maneira ineficiente. Por outro lado, o excesso de luz causa foto-inibição e foto-oxidação (DARKO et al., 2014; TAIZ; ZIEGER, 2004). Foram relatados efeitos da intensidade da luz no crescimento *in vitro* e pigmentos fotossintéticos de gengibre (ZHOU et al., 2008), no crescimento de *Momordica grosvenori* (ZHANG et al., 2009), na composição volátil de *Salvia dolomitica* (BASSOLINO et al., 2015), *Achillea millefolium* (ALVARENGA et al., 2015), dentre outras espécies.

Devido à importância medicinal de *P. amboinicus* e as vantagens de aplicar o cultivo *in vitro* em plantas medicinais, objetivou-se avaliar através de dois experimentos, os efeitos da qualidade da luz no crescimento de segmentos apicais, com o uso de LEDs, e da intensidade, no crescimento de segmentos nodais. Assim como avaliar os efeitos destes parâmetros na análise por *headspace* - CG/EM da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições gerais dos experimentos

Para o estabelecimento *in vitro*, segmentos apicais e nodais retirados de plantas de *P. amboinicus* cultivadas em casa de vegetação foram tratados com hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo) por 20 minutos, sob agitação constante. Em seguida, foram lavados com água destilada autoclavada (cinco vezes) e inoculados na vertical, em tubos de ensaio contendo 12,5 mL de meio de cultura. Utilizou-se o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na metade da concentração de sais, sem regulador de crescimento, com 30 g/L de sacarose, 6 g/L de ágar e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem (por 20 min, a 121°C).

Após a inoculação, o material foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, lâmpada fluorescente branca fria de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. As plântulas originadas por estes segmentos foram repicadas e subcultivadas até a obtenção de plântulas suficientes para realizar dois experimentos, um com qualidade de luz e outro com intensidade. Em ambos, utilizaram-se o mesmo meio de cultura do estabelecimento e os explantes foram inoculados na vertical. Vedaram-se os recipientes de cultivo com tampas de PVC (policloreto de vinila). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC).

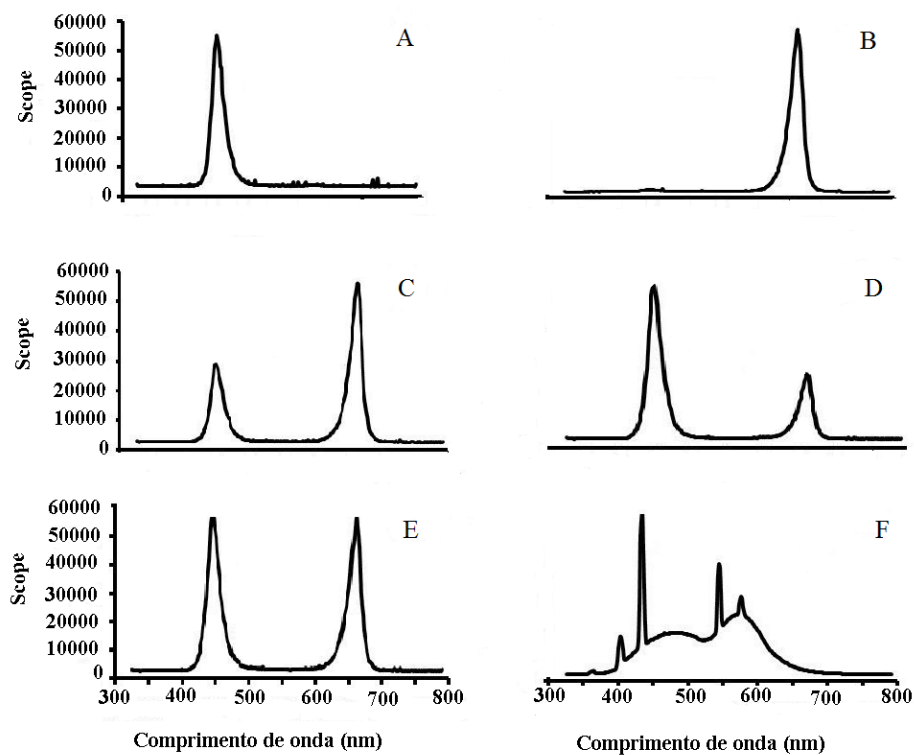
2.2 Experimento de qualidade de luz

Segmentos apicais de tamanho de 1 cm foram inoculados em frascos mantidos na horizontal contendo 40 mL de meio de cultura. Em seguida, foram cultivados sob diferentes diodos emissores de luz (LED) (TECNAL© Piracicaba, Brasil): azul; vermelho; 1azul:2,5vermelho; 2,5azul:1vermelho; 1azul:1vermelho, com intensidade de $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e lâmpada fluorescente

branca fria de $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intensidade escolhida a partir do resultado do experimento descrito no item 2.3).

Os espectros de luz foram aferidos através do espectrômetro portátil SPECTRA PEN Z850 (Qubit Systems-Kingston, Ontario-USA). As distribuições espectrais dos LEDs e da lâmpada fluorescente utilizados neste experimento estão representadas na Figura 1.

Figura 1 - Espectros de luz utilizados no experimento.



Legenda: A= azul, B=vermelho, C = 1 azul: 2,5 vermelho, D= 2,5 azul:1 vermelho, E=1 azul:1 vermelho, F= fluorescente. Lavras, 2016.

Aos 50 dias, as plântulas obtidas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea e da maior raiz (cm), matérias secas de folhas,

caule, raiz e total (mg), número de folhas, área foliar (cm²) e análise de folhas secas por *headspace* - CG/EM. Para as características de crescimento, foram realizadas 6 repetições, exceto para área foliar, para a qual se realizaram 3. A área foliar foi mensurada através do *software* WinFOLIA™ pelo scanner EPSON PERFECTION V700 PHOTO. Escolheram-se 3 plântulas representativas de cada tratamento. Em cada plântula, avaliou-se a área de uma folha retirada do 3º par, contado do ápice da parte aérea para a raiz.

2.3 Experimento de intensidade de luz

Para analisar o efeito da intensidade da luz, segmentos nodais de tamanho de 1 cm, oriundos de plântulas cultivadas *in vitro*, foram cultivados em tubos de ensaio, contendo 12,5 mL de meio de cultura, sob cinco intensidades de luz 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtidas com lâmpadas fluorescentes brancas frias (Osram©, Brasil). As intensidades foram aferidas através do medidor PRO CHECK + PAR PHOTON FLUX SENSOR, modelo QSO-S (DECAGON DEVICES – Pullman- Washington – USA). Realizaram-se 4 repetições, com 5 plântulas por repetição.

As plântulas obtidas foram avaliadas aos 83 dias quanto ao comprimento da parte aérea e da raiz (cm), número de brotações, matérias secas de folhas, caule, raiz e total (mg), área foliar (cm²), concentração de pigmentos fotossintéticos (mg/g de folha fresca) e análise de folhas secas por *headspace* - CG/EM. A área foliar foi mensurada da mesma forma que no experimento de qualidade de luz (Item 2.2). A análise das características de crescimento e a área foliar foram realizadas em 4 repetições. Para a área foliar, escolheram-se 4 plântulas representativas de cada tratamento, e destas foi avaliada a área de uma folha do 3º par.

Os pigmentos fotossintéticos analisados foram clorofila *a*, clorofila *b*, relação *b/a*, clorofila total e carotenoides. A extração foi realizada conforme

metodologia descrita por Lichtenthaler (1987). Sob luz verde, coletaram-se 100 mg de matéria fresca de folhas. Em seguida, em um gral contendo 2 mL de acetona 80% (v/v) e CaCO_3 , estes 100 mg de folhas foram macerados. Posteriormente, com o uso de papel filtro, filtrou-se o extrato obtido e completou-se com acetona 80% o volume para 10 mL. Imediatamente após este procedimento, foi realizada a leitura da absorbância (A) à 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm no espectro TECAN INFINITY M200 PRO operado com o sistema de processamento de dados I-control ® versão 3.37. Para cada tratamento, foram analisadas folhas de 3 plântulas, e as leituras foram realizadas em triplicata.

As concentrações de clorofila (C) e carotenoides foram calculadas seguindo as seguintes equações: clorofila *a* [(12,25 x $A_{663,2}$) - (2,79 x $A_{646,8}$)]; clorofila *b* [(21,5 x $A_{646,8}$) - (5,1 x $A_{663,2}$)]; clorofilas totais (a+b) [7,15 $A_{663,2}$ + 18,71 $A_{646,8}$] e carotenoides = (1000 A_{470} - 1,82 C_a - 85,02 C_b)/198, sendo os resultados expressos em mg de pigmento por g de matéria fresca de tecido foliar.

2.4 Análises químicas por *headspace* – CG/EM

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA. Utilizou-se o extrator “*headspace*” automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM (Cromatógrafo gasoso/Espectrômetro de Massa). Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 110°C durante 60 min, temperatura da seringa a 120°C. O volume de injeção foi de 1000 µL da fase de vapor, injetados em modo *split* na razão 20:1.

As amostras constituíram de 50 mg de folhas secas de *P. amboinicus*, acondicionadas em *vials* de 20 mL, vedados com septo de silicone /PTFE. A análise foi realizada em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C

(Agilent Technologies, California, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1 scan/s, com intervalo de aquisição de matérias de 40-400 m/z.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5-MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e da linha de transferência para o EM foram mantidas em 220°C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 50°C, mantido por 1 minuto, seguido por uma rampa de temperatura de 3°C por min até 200°C, seguida de uma rampa de 10°C por minuto até 280°C, mantendo-se em condição isotérmica por 1 min. As concentrações dos constituintes da análise química foram expressas pela porcentagem de área relativa dos sinais do cromatograma total de íons \pm o desvio padrão (n=3).

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de n-alcenos (C₈-C₂₀), Sigma- Aldrich®, St Louis, USA) e comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007).

2.5 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo teste F ($p < 0,05$), utilizando-se o *software* Sisvar®, versão 5.0 (FERREIRA, 2007). Após verificada a significância das variáveis pelo teste F, realizou-se o teste de média Scott-Knott para analisar as variáveis de crescimento, concentração de pigmentos fotossintéticos e de constituintes majoritários da composição química.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Qualidade de luz

O crescimento das plântulas de *P. amboinicus* foi significativamente afetado pela qualidade da luz (TABELA 1 E FIGURA 2). De um modo geral, observou-se que o vermelho monocromático e a combinação de vermelho com igual (1V:1A) ou menor proporção de azul (2,5 V: 1A) favoreceram o crescimento das plântulas, principalmente o acúmulo de matéria seca de raiz (FIGURA 2).

Tabela 1 - Valores de comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), área foliar (AF), matéria seca de folhas (MSF), do caule (MSC), comprimento da raiz (CR), massa seca da raiz (MSR) e total (MST) de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, aos 50 dias.

Luz	CPA (cm)	NF	AF (cm ²)	MSF (mg)	MSC (mg)	CR (cm)	MSR (mg)	MST (mg)
A	1,75 b	5,50 e	0,35 e	8,40 e	12,50 c	0* c	0* d	20,90 e
V	2,72 a	11,50 b	5,18 a	80,28 a	18,02 a	6,65 a	8,33 b	106,63 a
2,5 A:1 V	1,88 b	8,00 d	1,68 d	34,12 d	13,06 c	4,07 b	1,90 c	49,08 d
2,5 V: 1 A	1,85 b	13,17 a	3,64 b	63,67 b	15,52 b	7,95 a	11,90 a	91,08 b
1V: 1 A	2,03 b	9,67 c	4,78 a	77,33 a	17,78 a	5,83 a	10,35 a	105,47 a
F	2,32 a	14,33 a	2,53 c	45,12 c	18,20 a	3,20 b	2,93 c	66,25 c
CV (%)	21,82	13,01	25,23	8,42	6,19	40,26	28,26	6,59

Legenda: A= azul; V= vermelho; F= fluorescente. Lavras, 2016.

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. * não foi possível mensurar devido à baixa quantidade.

Figura 2 - A- *Plectranthus amboinicus* oriunda de segmentos apicais cultivados *in vitro* aos 50 dias, sob LED azul; vermelho; 2,5azul:1vermelho (2,5 A:1V); 2,5vermelho:1azul (2,5V:1A); 1vermelho:1azul (1V:1A) e lâmpada fluorescente branca (Fluor.). B) Plântulas de *Plectranthus amboinicus* estabelecidas *in vitro* a partir de explantes apicais, aos 25 dias. C) Plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro* sob lâmpada fluorescente branca de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aos 90 dias. Lavras, 2016.



Destacam-se entre estes tratamentos, o vermelho e 1 vermelho: 1 azul que proporcionaram maior área foliar, matérias secas de folhas, caule, total e comprimento da raiz (TABELA 1). O vermelho monocromático proporcionou ainda maior comprimento de parte área e número de folhas que 1 vermelho:1 azul, sendo o tratamento que mais favoreceu o crescimento *in vitro* da espécie (TABELA 1 E FIGURA 2).

A melhoria do crescimento das plântulas causada pelo vermelho pode estar relacionada à maior sensibilidade do fitocromo sob este espectro. Os picos de absorvância do fitocromo estão em sua maioria no vermelho (600 a 700 nm) e vermelho distante (700 a 800 nm) (RUNKLE; HEINS, 2001). Além disso, assim como no trabalho de Wu e Lin (2012), com *Protea cynaroides* cultivada *in vitro*, o vermelho no presente trabalho melhorou o enraizamento. Segundo estes

autores, existe uma relação entre a luz vermelha, compostos fenólicos e formação de raízes.

Por outro lado, combinações de LED vermelho e azul também mostraram serem benéficas para o crescimento de *Salvia splendens*, *Tagetes erecta* e *Ageratum houstonianum* em ambiente controlado (HEO; LEE; PAEK, 2006). No trabalho de Tarakanov et al. (2012), a combinação de LED 460 nm (25%) + 635nm (75%) incrementou a matéria seca de *Colleus blumei* Benth. No trabalho de Batista et al. (2016), em comparação à lâmpada fluorescente, a combinação de azul e vermelho (LED) proporcionou maior peso fresco e seco para alguns quimiotipos da espécie *Lippia alba* cultivada *in vitro*.

Observou-se que o LED azul foi prejudicial ao crescimento *in vitro* de *P. amboinicus* (TABELA 1). Segundo Lim e Eon (2013), a exposição por mais de 2 semanas a este espectro pode afetar negativamente o crescimento de brotos de estacas de plantas que apresentam morfologia foliar similar à de *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). Os autores verificaram que nesta situação, o LED azul degradou a clorofila da espécie. Em contraste, há espécies que têm o seu crescimento incrementado por este espectro. Assim como ocorreu com *Alernanthera brasiliiana* cultivada *in vitro* (MACEDO et al., 2011).

A análise da fração volátil por *headspace*-CG-EM de *P. amboinicus* cultivada sob qualidades de luz apresentou um perfil cromatográfico de baixa complexidade para amostras de folhas da espécie (FIGURA 3). No entanto, diferenças qualitativas e quantitativas expressivas foram observadas (TABELA 2). As diferenças qualitativas podem ser primeiramente observadas pelo número de constituintes detectados que variaram entre 13 e 17. Os constituintes químicos canfeno, sabineno, (*E*)- β -ocimeno e terpinolene foram os responsáveis por essa variação, pois dependendo do tratamento estavam todos ausentes (V; 2,5 V:1 A; 2,5 A:1 V) ou presentes (fluorescente) ou apenas dois (1V:1A) ou três estavam ausentes (azul).

Figura 3 - Cromatograma total de íons representativo das análises por *headspace*- CG/EM de folhas de *Plectranthus amboinicus* cultivada *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. Lavras, 2016.

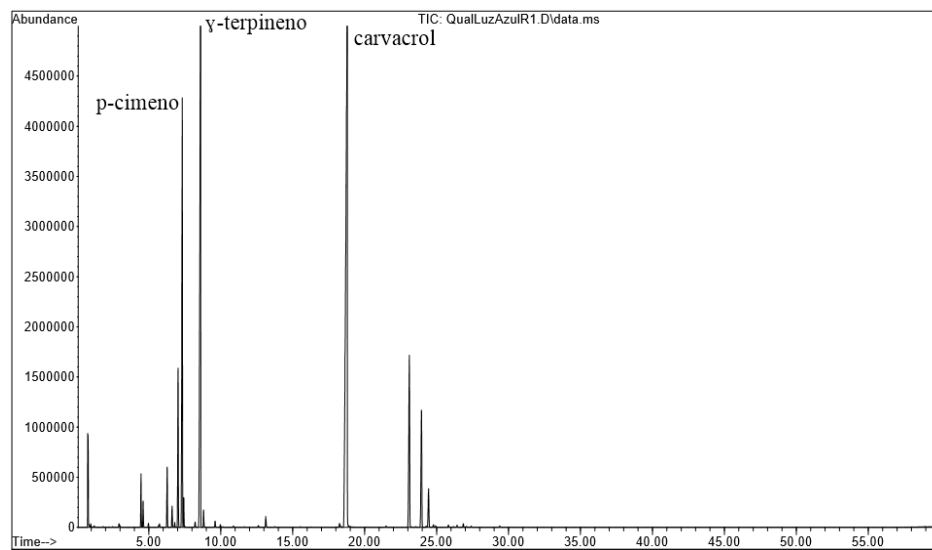


Tabela 2 - Constituintes voláteis de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais cultivadas *in vitro* sob qualidades de luz, aos 50 dias. Lavras, 2016.

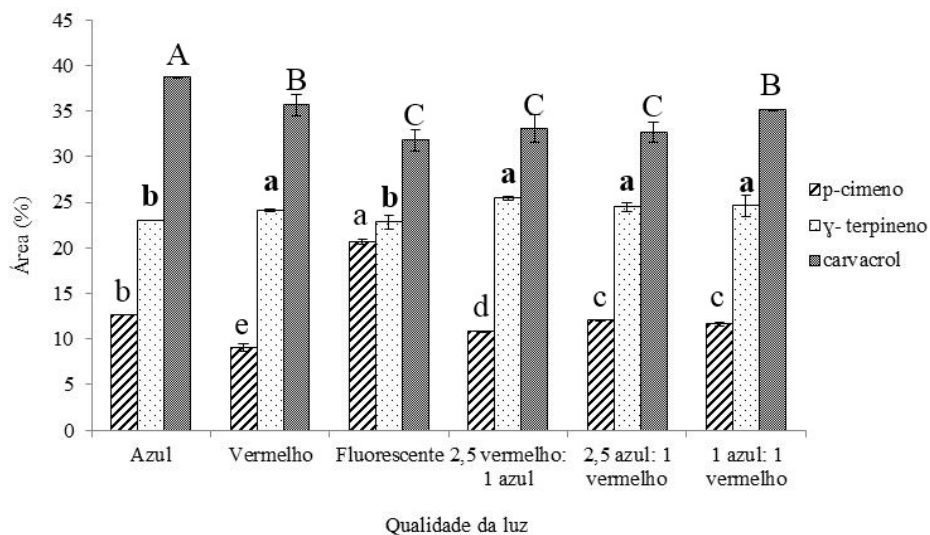
QUALIDADE DE LUZ							
Área (%) ± DP							
Constituintes	IR ¹	Azul	Vermelho	Fluorescente	2,5 vermelho: 1 azul	2,5 azul: 1 vermelho	1 azul: 1 vermelho
α -tujeno	923	1,23	1,25 ± 0,04	2,13 ± 0,06	1,44 ± 0,01	1,38 ± 0,05	1,55 ± 0,05
α -pineno	928	0,63	0,58 ± 0,02	0,83 ± 0,00	0,62 ± 0,03	0,56 ± 0,01	0,67 ± 0,02
canfeno	942	-	-	0,13 ± 0,00	-	-	0,09 ± 0,00
sabineno	970	-	-	0,07 ± 0,00	-	-	-
β -micerno	990	1,55	1,55 ± 0,04	2,04 ± 0,03	1,55 ± 0,07	1,65 ± 0,04	1,71 ± 0,01
α -felandreno	1002	0,54	0,51 ± 0,01	0,69 ± 0,03	0,59 ± 0,00	0,55 ± 0,02	0,65 ± 0,01
α -terpineno	1013	4,57	4,61 ± 0,01	5,42 ± 0,26	4,91 ± 0,06	4,70 ± 0,04	5,21 ± 0,21
<i>p</i> -cimeno	1022	12,60	9,09 ± 0,41	20,64 ± 0,24	10,80 ± 0,30	12,04 ± 0,34	11,64 ± 0,30
β -felandreno	1024	0,74	0,62 ± 0,01	0,93 ± 0,02	0,68 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,67 ± 0,03
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1046	-	-	0,22 ± 0,00	-	-	0,13 ± 0,01
γ -terpineno	1056	22,99	24,12 ± 0,15	22,80 ± 0,76	25,45 ± 0,22	24,45 ± 0,50	24,59 ± 1,20
terpinolene	1084	0,09	-	0,15 ± 0,01	-	-	-
4-terpineol	1171	0,11	0,21 ± 0,00	0,24 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,23 ± 0,01
carvacrol	1305	38,67	35,67 ± 1,16	31,81 ± 1,14	33,09 ± 1,58	32,68 ± 1,16	35,07 ± 0,00
(<i>E</i>)-cariofileno	1410	7,07	9,31 ± 0,30	5,63 ± 0,04	9,38 ± 0,45	8,89 ± 0,05	9,53 ± 0,42
α - <i>trans</i> -bergamoteno	1432	4,62	5,47 ± 0,10	2,66 ± 0,06	5,92 ± 0,26	5,67 ± 0,28	5,51 ± 0,23
α -humuleno	1444	1,32	1,77 ± 0,06	1,03 ± 0,02	1,69 ± 0,08	1,58 ± 0,05	1,79 ± 0,08
Constituintes identificados (%)		96,73	94,76	97,42	96,31	95,13	99,04
Número de constituintes		14	13	17	13	13	15

¹Índice de retenção relativo à série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP5-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (n=3). Para o tratamento azul n= 1.

No que se refere à análise quantitativa 94,76 a 99,04% da composição química total foi elucidada. Destes, 78,21 % a 88,10% caracterizaram-se por monoterpenos e 9,32 a 16,99% por sesquiterpenos. Seis constituintes, incluindo o α -terpineno, p -cimeno, γ -terpineno, carvacrol, (E)-cariofileno e α -trans-bergamoteno computaram de 88,27 a 91,55% da composição química total.

O constituinte majoritário foi o carvacrol (31,81 a 38,67%). A concentração de carvacrol foi maior sob o espectro de luz azul monocromática (38,67%). Isso pode ter ocorrido devido à maior conversão de γ -terpineno em carvacrol, conforme proposto por Crocoll (2011) ou por orto-hidroxilação do p -cimeno, conforme Poulou e Croteau (1978) (FIGURA 4).

Figura 4 - Quantificação de constituintes majoritários de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais cultivados *in vitro*, aos 50 dias, sob diferentes qualidades de luz.



Legenda: As barras representam o desvio padrão (n=3). Para o tratamento azul n = 1. As médias que apresentam a mesma letra dentro os valores para um determinado constituinte não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Lavras, 2016.

De acordo com os trabalhos de Manivannan et al. (2015) e Nascimento et al. (2013), o espectro do azul induz ao acúmulo de metabólitos secundários relacionados a um aumento na capacidade antioxidante de plantas. O mesmo ocorreu no presente trabalho com *P. amboinicus*. A luz azul induziu ao acúmulo de carvacrol. Carvacrol é uma substância antioxidante (CABELLO et al., 2015).

Outra diferença quantitativa expressiva encontrada neste trabalho foi na concentração do constituinte *p*-cimeno, sendo maior sob lâmpada fluorescente ($20,64 \pm 0,24\%$), seguido pelo espectro do azul (12,60%), 2,5azul:1vermelho ($12,04 \pm 0,34\%$), 1vermelho:1azul ($11,64 \pm 0,30\%$), 2,5 vermelho:1azul ($10,80 \pm 0,30\%$) e menor sob o espectro do vermelho ($9,09 \pm 0,41\%$) (FIGURA 4). Pode-se observar, que a concentração sob lâmpada fluorescente foi aproximadamente duas vezes maior que a concentração sob LED vermelho. Entretanto, a concentração de carvacrol sob vermelho ($35,67 \pm 1,16\%$) foi maior que sob fluorescente ($31,81 \pm 1,14\%$) (FIGURA 4).

3.2 Intensidade de luz

As diferentes intensidades de luz influenciaram significativamente o crescimento *in vitro* de *P. amboinicus* (TABELA 3) (FIGURA 5). O tratamento $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionou o melhor crescimento. Por outro lado, o cultivo da espécie sob $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ causou efeitos negativos. Além de ter afetado o crescimento das plântulas, as intensidades afetaram também a concentração de pigmentos fotossintéticos. Com o aumento da quantidade de luz, ocorreu redução na concentração de clorofila a, b, total e carotenoides (TABELA 4).

Tabela 3 - Efeito de intensidades de luz no comprimento da parte aérea (CPA), número de brotações (NB), área foliar (AF), matérias secas de folhas (MSF), caule (MSC), comprimento da maior raiz (CR), matérias secas da raiz (MSR) e total (MST) de plântulas da espécie *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais, cultivadas *in vitro*, aos 83 dias. Lavras, 2016.

Intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	CPA (cm)	NB	AF (cm^2)	MSF (mg)	MSC (mg)	CR (cm)	MSR (mg)	MST (mg)
26	2,55 ^a	1,31 ^b	1,48 ^b	24,88 ^c	8,55 ^c	2,97 ^b	4,05 ^d	37,48 ^c
51	2,80 ^a	1,25 ^b	1,98 ^a	53,00 ^b	11,03 ^b	5,34 ^a	12,55 ^a	76,58 ^b
69	2,09 ^b	1,65 ^a	1,96 ^a	69,23 ^a	14,80 ^a	5,49 ^a	10,85 ^b	94,90 ^a
94	2,23 ^b	1,92 ^a	1,88 ^a	55,03 ^b	10,63 ^b	4,89 ^a	6,85 ^c	72,50 ^b
130	1,63 ^c	1,33 ^b	1,19 ^b	56,68 ^b	8,88 ^c	5,87 ^a	5,13 ^d	70,68 ^b
CV (%)	18,04	18,89	11,24	12,37	8,39	28,04	13,17	9,09

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 5 - Aspecto de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro*, aos 83 dias, sob as intensidades de: 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. A) Plântulas dentro do tubo de ensaio. B) Plântulas fora do tubo de ensaio. Lavras, 2016.



Tabela 4 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob intensidades de luz, aos 83 dias. UFLA, Lavras, 2016.

Intensidade de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Clorofila a (mg/g de MF)	Clorofila b (mg/g de MF)	Razão b/a (mg/g de MF)	Clorofila Total (mg/g de MF)	Carotenóides (mg/g de MF)
26	0,57 a	0,21 a	0,36 a	0,78 a	0,17 a
51	0,44 b	0,20 a	0,45 a	0,64 a	0,17 a
69	0,26 c	0,10 b	0,37 a	0,36 b	0,08 b
94	0,22 c	0,09 b	0,40 a	0,30 b	0,08 b
130	0,09d	0,04 c	0,46 a	0,13 c	0,04 c
CV (%)	13,08	12,32	9,13	12,01	12,86

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados similares foram encontrados por Nguyen e Cin (2009) que cultivaram em casa de vegetação, sob diferentes intensidades de luz (150, 225, 250, 350 e 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), plântulas de *Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd (Lamiaceae), espécie similarmente relacionada ao gênero *Plectranthus*. O crescimento máximo também foi obtido sob intensidades intermediárias (entre 225 e 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Sob a menor intensidade (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), foi verificado pouco crescimento e sob a maior (450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ocorreu fotoinibição. Além disso, as plântulas apresentaram a menor concentração de clorofila na mais alta intensidade de luz utilizada (450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Estes resultados foram encontrados porque em situações nas quais a intensidade da luz é muito fraca, a fotossíntese ocorre de maneira ineficiente. Por outro lado, o excesso de luz causa dano ao aparato fotossintético e interação dos pigmentos receptores de luz com o oxigênio, gerando radicais livres, podendo destruir estes pigmentos (DARKO et al., 2014; TAIZ; ZIEGER, 2004). Infere-se que ocorrerem estes processos em *P. amboinicus* cultivado sob maior intensidade de luz (130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Neste tratamento houve redução no crescimento e na concentração de pigmentos fotossintéticos (TABELA 3) (TABELA 4).

O resultado encontrado para o crescimento no presente trabalho (TABELA 3) corrobora também em partes com o observado por Fernandes et al. (2013), que cultivaram *Ocimum gratissimum* L. *in vivo* sob diferentes intensidades de luz. Foi observado que a massa de folhas da espécie aumentou linearmente com o aumento da intensidade, enquanto matéria seca, número de folhas, área foliar e altura das plantas aumentaram até determinada intensidade e diminuíram sob intensidades maiores.

Pesquisas demonstraram que a intensidade de luz ótima para o crescimento *in vitro* de plantas é específica para cada espécie. Zhou et al. (2008) avaliaram o crescimento e pigmentos fotossintéticos de gengibre cultivados *in vitro* sob as intensidades de 60, 120, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sob os tratamentos 60 e 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o crescimento das plântulas foi adequado. Já sob a intensidade de 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o crescimento foi reduzido. O teor de clorofila diminuiu à medida que a intensidade de luz foi aumentada.

Em outro trabalho, *Momordica grosvenori* foi cultivada *in vitro* sob quatro intensidades de luz: 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As mais fortes intensidades de luz aumentaram a matéria fresca e seca de plantas, sendo a intensidade de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a mais adequada para o crescimento *in vitro* da espécie (ZHANG et al., 2009). De forma distinta, para o crescimento *in vitro* de plântulas de *P. amboinicus* oriundas de segmentos nodais, a intensidade ótima é aproximadamente a de 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, como discutido anteriormente.

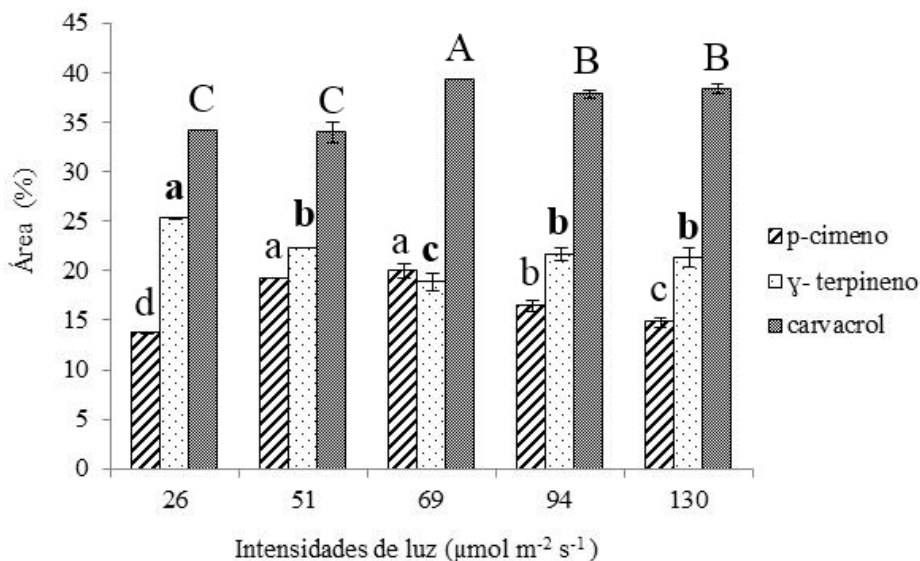
A análise por *headspace* CG/EM de *P. amboinicus* também indicou diferenças, tanto qualitativas como quantitativas nos constituintes das plântulas cultivadas sob diferentes intensidades de luz (TABELA 5 e FIGURA 6). Foram detectados em amostras dos tratamentos 14 ou 15 constituintes químicos, os quais representaram 97,55% a 99,32% da composição química total. Seis compostos constituíram 90,31 a 92,47% do total da fração volátil (α -terpineno, *p*-cimeno, γ -terpineno, carvacrol, (*E*) – cariofileno e α -*trans*-bergamoteno).

Tabela 5 - Constituintes voláteis de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 83 dias, sob diferentes intensidades de luz. Lavras, 2016.

INTENSIDADES DE LUZ						
Área (%) ± DP						
Constituintes	IR ¹	26 μmol m ⁻² s ⁻¹	51 μmol m ⁻² s ⁻¹	69 μmol m ⁻² s ⁻¹	94 μmol m ⁻² s ⁻¹	130 μmol m ⁻² s ⁻¹
α-tujeno	923	1,25	1,40 ± 0,06	1,23 ± 0,04	1,32 ± 0,00	1,20 ± 0,03
α-pineno	928	0,70	0,80 ± 0,01	0,79 ± 0,03	0,75 ± 0,01	0,72 ± 0,03
canfeno	942	-	-	0,14 ± 0,00	-	-
β-micerno	990	1,70	1,94 ± 0,08	1,86 ± 0,03	1,78 ± 0,07	1,63 ± 0,04
α-felandreno	1002	0,57	0,57 ± 0,01	0,51 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,01
α-terpineno	1013	5,12	4,82 ± 0,05	4,12 ± 0,03	4,65 ± 0,07	4,44 ± 0,11
p-cimeno	1022	13,70	19,23 ± 0,04	19,97 ± 0,68	16,43 ± 0,51	14,83 ± 0,48
β-felandreno	1024	0,73	0,84 ± 0,02	0,83 ± 0,00	0,81 ± 0,01	0,78 ± 0,01
(E)-β-ocimeno	1046	-	0,14 ± 0,01	-	-	-
γ-terpineno	1056	25,24	22,30 ± 0,03	18,89 ± 0,88	21,62 ± 0,64	21,35 ± 0,96
terpinolene	1084	-	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,14 ± 0,00
4-terpineol	1171	0,29	0,31 ± 0,01	0,35 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,32 ± 0,01
carvacrol	1305	34,17	33,96 ± 1,01	39,37 ± 0,60	37,84 ± 0,41	38,36 ± 0,48
(E)-cariofileno	1410	8,32	5,92 ± 0,01	5,78 ± 0,15	6,74 ± 0,18	6,88 ± 0,02
α-trans-bergamoteno	1432	5,92	4,08 ± 0,06	4,14 ± 0,18	4,37 ± 0,16	5,26 ± 0,12
α-humuleno	1444	1,61	1,06 ± 0,03	1,07 ± 0,02	1,13 ± 0,05	1,27 ± 0,01
Constituintes identificados(%)		99,32	97,55	99,21	98,21	97,66
Número de constituintes		14	15	15	14	14

¹Índice de retenção relativo à série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP5-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (n=3). Para o tratamento 26 μmol m⁻² s⁻¹, n=1.

Figura 6 - Quantificação de constituintes majoritários de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro*, aos 83 dias, sob diferentes intensidades de luz.



Legenda: As barras representam o desvio padrão ($n=3$). Para o tratamento $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $n = 1$. As médias que apresentam a mesma letra dentre os valores para um determinado constituinte não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Lavras, 2016.

Em relação às diferenças qualitativas no perfil aromático, o constituinte canfeno foi observado apenas quando as plântulas foram cultivadas sob $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e (*E*)- β -ocimeno foi observado apenas com o cultivo sob $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A composição foi caracterizada por monoterpenos (83,47 a 88,22%) e sesquiterpenos (10,99 a 15,85%). Sendo o monoterpeno oxigenado carvacrol o constituinte majoritário com maior concentração (33,96 a 39,37%) em todos os tratamentos de intensidades de luz analisados.

A partir da análise de três constituintes majoritários (*p*-cimeno, γ -terpineno, carvacrol) com um total superior a 73% da área relativa, verifica-se a influência das diferentes intensidades de luz na concentração desses compostos (FIGURA 6). A intensidade de luz influenciou de maneira significativa os teores

de *p*-cimeno, γ -terpineno e carvacrol em plântulas de *P. amboinicus* cultivadas in vitro. A intensidade de $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi a que proporcionou maior teor de carvacrol ($39,37\% \pm 0,60$), e assim como a intensidade de $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o maior teor de *p*-cimeno ($19,97\% \pm 0,68$) (FIGURA 6).

Nota-se que, entre os tratamentos, $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentou o menor teor de γ -terpineno ($18,89\% \pm 0,88$). Conforme a rota biossintética proposta por Crocoll (2011), o carvacrol é biossintetizado em *Origanum* e *thymus*, a partir de uma reação de hidroxilação em C2 do α -terpineno ou γ -terpineno. Com isso, infere-se que além de ser a intensidade ótima para o crescimento, a intensidade de $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pode ser a luminosidade ótima necessária para a conversão de γ -terpineno à carvacrol. No que diz respeito ao *p*-cimeno, resultados de Dudai et al. (1992) corroboram com o presente estudo. O teor de *p*-cimeno em *Origanum syriacum* L. também foi influenciado pela intensidade de luz, sendo que o aumento da intensidade promoveu aumento na concentração do constituinte.

Em adição, sob a menor intensidade de luz analisada ($26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), as plântulas apresentaram a mais baixa concentração de *p*-cimeno (13,70%). Pode-se inferir que esta concentração baixa ocorreu devido à menor conversão de γ -terpineno a *p*-cimeno. Portanto, as plântulas mantidas sob a menor intensidade de luz acumularam mais γ -terpineno (FIGURA 6).

Além da explicação dos resultados pela rota biossintética, a intensidade de luz afetou a concentração do monoterpene carvacrol em *P. amboinicus*, devido à função que monoterpenos desempenham. Pesquisas sugerem que eles protegem as plantas sob estresses ambientais (como excesso de luz) podendo estar envolvidos na estabilização das membranas das células através de interações lípideo-lípideo, lípideo-proteína, proteína-proteína ou por ação contra as espécies reativas de oxigênio (HARTIKAINEN et al., 2009; HOLOPAINEN, 2011). Com isso, sob as maiores intensidades de luz ($69, 94$ e $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$),

P. amboinicus apresentou maior concentração de carvacrol que sob as menores (26 e 51 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (FIGURA 6).

Observou-se com os resultados do presente trabalho, que as diferentes qualidades e intensidades de luz causaram a biotransformação de constituintes voláteis em *P. amboinicus*. Shimoda et al. (2006) observaram também biotransformação de carvacrol em cultura de células de *Eucalyptus perriniana*.

A composição da fração volátil encontrada no presente trabalho diferiu pouco da encontrada por Santos et al. (2015) no óleo essencial de folhas frescas de *P. amboinicus*, que caracterizaram 97,35% da composição química total, a partir de hidrodestilação, durante 4 horas, sendo 70,11 % de monoterpenos, dentre eles carvacrol (37,7%), γ -terpineno (14,74%), *p*-cimeno (12,01%) e α -terpineno (1,96%), e 27,24% de sesquiterpenos, como (*Z*) - cariofileno (14,07%), α - *trans*- bergamoteno (8,19%) e α - humuleno (3,83%).

Por outro lado, o trabalho de Rodrigues et al. (2013) que caracterizaram 97, 30% da composição total, apontou maiores diferenças químicas. O óleo extraído por hidrodestilação, durante 2h, foi constituído de *p*-cimeno (10,3%), γ -terpineno (5,9%), timol (1,3%), carvacrol (67,9%), (*E*)- α -bergamoteno (1,4%), α -humuleno (0,7%), dentre outros.

Segundo Arumugan, Swamy e Sinniah (2016), o perfil químico e a acumulação dos constituintes de *P. amboinicus* têm sido dependentes de vários parâmetros como regiões geográficas, clima, e diferentes estágios da planta da qual se retirou o material analisado. Além disso, o método de extração, identificação e quantificação causa diferenças na composição.

4 CONCLUSÕES

A qualidade e intensidade da luz devem ser controladas no cultivo *in vitro* de *P. amboinicus*, pois além de afetarem o crescimento, afetam a de forma qualitativa e quantitativa, a composição química volátil de folhas da espécie. No experimento de qualidade, concluiu-se que para plântulas oriundas de segmentos apicais, o LED vermelho melhora o crescimento. Em comparação à lâmpada fluorescente branca, o vermelho aumentou o acúmulo de carvacrol. Em adição, o cultivo sob LED azul proporciona maior acúmulo deste constituinte que sob o LED vermelho, mas é altamente prejudicial ao crescimento.

No experimento de intensidade, concluiu-se que para segmentos nodais de *P. amboinicus*, o tratamento $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ melhora o acúmulo de *p*-cimeno e parece ser a intensidade ótima para o crescimento e o acúmulo de carvacrol *in vitro* pela espécie. Além disso, com o aumento da intensidade de luz de 26 a $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ocorre redução na concentração de pigmentos fotossintéticos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.
- ALVARENGA, I. C. A. 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**, Dordrecht, v. 122, n. 2, p. 299-308, Aug. 2015.
- ARUMUGAM, G.; SWAMY, M. K.; SINNI AH, U. R. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 4, p. E369, Mar. 2016.
- BANDEIRA, J. M. et al. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. nota científica. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 472-474, 2007. Suplemento.
- BASSOLINO, L. et al. Tissue culture and aromatic profile in *Salvia dolomitica* Codd. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 121, n. 1, p. 83-95, Apr. 2015.
- BATISTA, D. S. et al. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, 2016. In press. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11627-016-9761-x>>. Acesso em: 10 maio 2016.
- CABELLO, M. L. R. et al. *In vitro* pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. **Toxicology in vitro**, Konohana-ku, v. 29, n. 4, p. 647-656, June 2015.
- CHEN, Y. S. et al. Chemical constituents of *Plectranthus amboinicus* and the synthetic analogs possessing anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 1766-1772, Mar. 2014.
- CROCOLL, C. **Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme**. 2011. 143 p. Dissertation (Zur Erlangung des Akademischen Grades Doctor Rerum Naturalium) - Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, 2011.

DARKO, E. et al. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 369, n. 1640, Mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24591723>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

DOOL, H. van den; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-467, 1963.

DUDAI, N. et al. Monoterpene content in *Origanum syriacum* as affected by environmental conditions and flowering. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, p. 453-459, 1992.

FERNANDES, V. F. et al. Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 419-424, maio 2013.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de Análise de Variância**. Versão 5.0. Lavras: DEX/UFLA, 2007.

HARTIKAINEN, K. et al. Emission of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperature. **Tree Physiology**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 1163-1173, Sept. 2009.

HEO, J. W.; LEE, C. W.; PAEK, K. Y. Influence of mixed LED radiation on the growth of annual plants. **Journal of Plant Biology**, New York, v. 49, n. 4, p. 286-290, Aug. 2006.

HOLOPAINEN, J. K. Can forest trees compensate for stress-generated growth losses by induced production of volatile compounds? **Tree Physiology**, Oxford, v. 31, p. 1356-1377, Nov. 2011.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PACKER, L.; DOUCE, R. (Ed.). **Methods in enzymology**. London: Academic, 1987. p. 350-381.

LIM, Y. J.; EOM, S. H. Effects of different light types on root formation of *Ocimum basilicum* L. cuttings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 164, p. 552-555, Dec. 2013.

MACEDO, A. F. et al. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 70, n. 1, p. 43-50, Jan. 2011.

MALUTA, F. A. et al. In vitro culture of sugarcane exposed to different light sources. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 9, p. 1303-1307, set. 2013.

MANAN, A. A. et al. *In vitro* flowering, glandular trichomes ultrastructure, and essential oil accumulation in micropropagated *Ocimum basilicum* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, 2016. In press. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11627-016-9755-8>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

MANIVANNAN, A. et al. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidante enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 1, p. 105-113, Feb. 2015.

MARY, R. N. I.; BANU, N. Screening of anti-biofilm, anti-quorum sensing activity from methanolic extract of *Plectranthus amboinicus* (Lour.). **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Utha, v. 6, n. 4, p. 1060-1068, 2015.

MEDINA, A. M.; CASAS, J. L. *In vitro* multiplication and essential oil composition of *Thymus moroderi* Pau ex Martinez, an endemic Spanish plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 120, n. 1, p. 99-108, Jan. 2015.

MOREIRA, R. C. T. et al. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, n. 3, p. 1-7, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 118, n. 1, p. 1-16, July 2014.

NASCIMENTO, L. B. S. et al. Increased antioxidant activity and changes in phenolic profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae) specimens grown under supplemental blue light. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 89, n. 2, p. 391-399, 2013.

NATARAJ, M.; KHER, M. M.; SILVA, J. A. T. Micropropagation of *Clerodendrum* L. species: a review. **Rendiconti Lincei**, New York, v. 27, n. 2, p. 169-179, June 2016.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Chemistry web book**. 2008. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 8 maio 2016.

NGUYEN, P.; CIN, V. D. The role of light on foliage colour development in coleus (*Solenostemon scutellarioides* (L) Codd). **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, n. 10, p. 934-945, Oct. 2009.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 187, p. 307-314, 1978.

RAJESH, V.; GAYATHRI, K. Angiogenesis modulation by *Plectranthus amboinicus* leaf extract and its fractions on choriollantoic membrane and tumor induced angiogenesis. **Orient Pharmacy and Experimental Medicine**, New York, v. 15, n. 4, p. 257-276, Dec. 2015.

RODRIGUES, F. F. G. et al. Study of the interference between *Plectranthus* species essential oils from Brazil and Aminoglycosides. **Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and alternative Medicine**, Cairo, v. 2013, Apr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23662150>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

RUNKLE, S. E.; HEINS, R. D. Specific functions of red, far red, and blue light in flowering and stem extension of long-day plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 126, n. 3, p. 275-282, 2001.

SANTOS, N. O. et al. Accessing the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian Plants-*Eremanthus erythropappus* (Asteraceae), *Plectranthus barbatus*, and *P. amboinicus* (Lamiaceae). **Molecules**, Basel, v. 20, n. 5, p. 8440-8452, May 2015.

SHIMODA, K. et al. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 67, n. 20, p. 2256-2261, Oct. 2006.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKAHASHI, H. et al. Modification of light quality improves the growth and medicinal quality of clonal plantlets derived from the herbal plant *Gentiana*. **Plant Biotechnology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 315-318, 2012.

TARAKANOV, I. et al. Light-emitting Diodes: on the way to combinatorial lighting Technologies for basic research and crop production. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 956, 2012. Abstract. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/956/956_17.htm>. Acesso em: 10 jun. 2016.

WU, C.; LIN, C. C. Red light-emitting diode light irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. Plantlets *In Vitro*. **Hortscience**, Alexandria, v. 47, n. 10, p. 1490-1494, Oct. 2012.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 13, n. 8, p. 2175-2180, Oct. 2009.

YESMIN, S.; HASHEM, A.; INSLAM, M. S. Micropropagation of an important medicinal herb *Eclipta alba* (L.) Hassk. **Jahangirnagar University Journal of Biological Science**, Bangladesh, v. 4, n. 1, p. 61-69, June 2015.

ZHANG, M. et al. Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **HortScience**, Alexandria, v. 44, n. 3, p. 757-763, June 2009.

ZHOU, M. et al. Effects of sucrose concentration and light intensity on growth and photosynthesis of ginger plantlets *in vitro*. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, Sichuan, v. 14, n. 3, p. 356-361, June 2008.

**CAPÍTULO 3 SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL NO
CRESCIMENTO *in vitro* E ANÁLISE POR *headspace*-CG/EM DE
*Plectranthus amboinicus***

RESUMO

Plectranthus amboinicus é uma planta medicinal com propriedade antioxidante, hepatoprotetora e antimicrobiana. O cultivo *in vitro* de espécies de interesse como esta é importante por permitir a propagação em larga escala, obtenção de plantas homogêneas, dentre outras vantagens. No sistema convencional deste tipo de cultivo, as plântulas são mantidas em recipientes fechados, com o objetivo de evitar a contaminação e ressecamento do explante. Pesquisas sugerem que métodos que promovem a ventilação dentro dos recipientes melhoram o crescimento das plantas, além de afetar o metabolismo secundário, pois modificam as condições do microambiente formado. Sendo assim, objetivou-se avaliar o efeito de sistema de ventilação natural no crescimento e na análise da fração volátil por *headspace*-CG/EM de *P. amboinicus* cultivada *in vitro*. Segmentos apicais e nodais contendo um par de folhas foram cultivados sob sistema convencional (SC), sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4). Aos 30 dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao crescimento e fração volátil. Para o crescimento de segmentos apicais, o SVN1 foi o melhor sistema de cultivo. Proporcionou maior valor para todos os parâmetros de crescimento avaliados. Já para os segmentos nodais, o SVN2 possibilitou o melhor crescimento. Produziu plântulas com maior comprimento de parte aérea, número de folhas, comprimento da maior raiz, matérias secas de folhas, caule, raiz e total. Observou-se também que para ambos os segmentos, o pior crescimento foi obtido sob o SVN4. Em relação à fração volátil, para apicais, a maior quantidade de carvacrol foi observada nas plântulas cultivadas sob SVN4. Concluiu-se que o SVN1 otimiza o crescimento *in vitro* de segmentos apicais de *P. amboinicus* e o SVN2 o de nodais. Por outro lado, o SVN4 é prejudicial ao crescimento da espécie, e em segmentos apicais, favorece o acúmulo de carvacrol.

Palavras-chave: Micropropagação. Trocas gasosas. Carvacrol.

ABSTRACT

Plectranthus amboinicus is a medicinal plant with antioxidant, hepatic-protector and antimicrobial properties. The *in vitro* cultivation of species of interest such as this one is important for allowing large-scale propagation, and the obtaining of homogeneous plants, among other advantages. In the conventional system of this type of cultivation, the plantlets are maintained in closed recipients in order to avoid contamination and drying of the explant. Researchers suggest that methods that promote ventilation within the recipients improve plant growth, in addition to affecting secondary metabolism by modifying the conditions of the microenvironment formed. Thus, we aimed at evaluating the effect of the natural ventilation system over the growth and the analysis of the volatile fraction by headspace-CG/EM of *P. amboinicus* cultivated *in vitro*. Apical and nodal segments containing on pair of leaves were cultivated under the conventional system (CS), natural ventilation system with one (NVS1), two (NVS2) and four (NVS4) porous membranes. At 30 days, the plantlets were evaluated regarding growth and volatile fraction. For the growth of the apical segments, NVS1 was the best cultivating system. It provided higher value for all growth parameters evaluated. For the nodal segments, NVS2 allowed better growth. It produced plantlets with greater shoot length, number of leaves, length of the biggest root, and higher content of leaf, stem, root and total dry matter. We also verified that, for both segments, the worst growth was obtained under NVS4. In relation to the volatile fraction, for apical, the higher amount of carvacrol was observed in plantlets cultivated under NVS4. In conclusion, the NVS1 optimizes *in vitro* growth of *P. amboinicus* apical segments, and NVS2, that of nodal segments. On the other hand, NVS4 is prejudicial to the growth of the species, and, in apical segments, favors the accumulation of carvacrol.

Keywords: Micropropagation. Gas exchange. Carvacrol.

1 INTRODUÇÃO

Plectranthus amboinicus é uma planta medicinal pertencente à família Lamiaceae que apresenta óleo essencial e outras classes de metabólitos secundários com efeito antimicrobiano, anticâncer, antioxidante, dentre outros (AGUIAR et al., 2015; KHATTAK et al., 2011; MURUGAN et al., 2013; SELVAKUMAR; NAVEENA; PRAKASH, 2012). A cultura de tecidos é uma ferramenta biotecnológica importante para multiplicar e analisar plantas medicinais (SIAHSAR et al., 2011). Além disso, possibilita a conservação de espécies, obtenção de plantas livres de microrganismos, dentre outras vantagens (CHEONG; MOCK; LI, 2012; COSTE et al., 2012; KAUR; SANDHU, 2015).

No sistema convencional de cultivo *in vitro*, as plântulas são mantidas em recipientes fechados, para evitar a contaminação e o ressecamento do explante (SCHUELTER et al., 2015). Desta forma, o microambiente formado dentro do recipiente apresenta alta umidade relativa, acúmulo de etileno, estagnação de ar e baixa concentração de dióxido de carbono (CO₂). Assim, as plântulas oriundas desta técnica apresentam diversas anomalias, como o mau funcionamento dos estômatos, pouco desenvolvimento epicuticular, baixa concentração de clorofilas, hiperhidricidade, raízes mal formadas e baixa sobrevivência na fase de aclimatização (CHEN, 2004; HAZARIKA, 2006; ISAH, 2015; XIAO; NIU; KOZAI, 2011).

O uso de sistema de ventilação natural reduz estas anormalidades. De acordo com Moreira et al. (2013), este sistema diminui a umidade relativa e aumenta a aeração. Além disso, mantém as concentrações de CO₂ adequadas para estimular a fotossíntese (SALDANHA et al., 2012). O aumento da concentração de CO₂ promove o enraizamento e reduz as anomalias de crescimento, podendo melhorar a taxa fotossintética e síntese de metabólitos secundários (CHA-UM et al., 2011; TISSERAT; VAUGHN, 2001; ZHU et al., 2015).

Foram relatados efeitos benéficos da ventilação natural no crescimento *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al., 2012); Abacaxizeiro (Bromeliaceae) (SILVA et al., 2014a); *Thymus vulgaris* L. (BANDEIRA et al., 2007); *Azadirachta indica* A. Juss. (RODRIGUES et al., 2012), dentre outras espécies. Os métodos que promovem ventilação no cultivo *in vitro*, de um modo geral, também podem afetar o metabolismo secundário das plantas. Assim como ocorreu com *Ruta graveolens* L., no trabalho de Mohamed e Ibrahim (2012).

Portanto, é necessário buscar sistemas de cultivo *in vitro* adequados para cada espécie de interesse, que possam substituir o sistema convencional e produzir plantas de maior qualidade. Sendo assim, objetivou-se avaliar os efeitos do sistema de ventilação natural no crescimento e na análise da fração volátil por *headspace*-CG/EM de *P. amboinicus* cultivada *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento *in vitro* da espécie

Para o estabelecimento *in vitro*, segmentos apicais e nodais de plantas de *P. amboinicus* cultivadas em casa de vegetação foram excisados e em seguida, imersos em solução de hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo), por 20 minutos, sob agitação constante. Os explantes foram levados para câmara de fluxo laminar e lavados cinco vezes com água destilada autoclavada.

O material foi inoculado na vertical, em tubos de ensaio contendo 12,5 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com a metade da concentração de sais, na ausência de regulador de crescimento. O meio foi suplementado com 30g/L de sacarose, 6g/L de ágar e o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da autoclavagem (20 min 121°C). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h, sob lâmpada fluorescente com intensidade de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

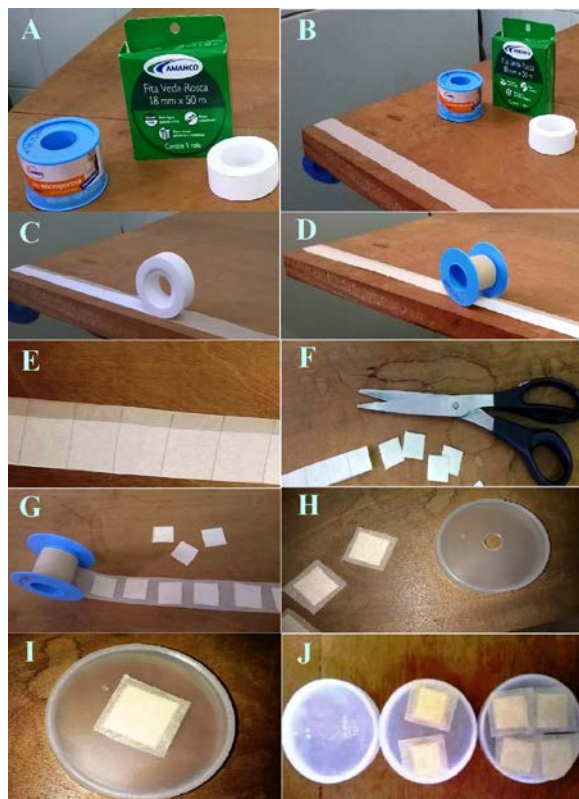
2.2 Sistema de ventilação natural

Segmentos apicais e nodais foram excisados de plântulas já cultivadas *in vitro* e inoculados em frascos contendo 40 mL de meio MS com a metade da concentração de sais, 30g/L de sacarose, 6g/L de ágar e pH $5,7 \pm 0,1$. Inocularam-se os segmentos na vertical e em ambos, foi mantido um par de folhas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4×2 , sendo 4 sistemas de cultivo: sistema convencional (SC), sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4), e 2 tipos de explante : apical e nodal. Os sistemas de ventilação natural foram obtidos pela presença de membranas porosas manufaturadas nas tampas dos recipientes de cultivo.

As membranas foram montadas da mesma forma que no trabalho de Saldanha et al. (2012) (FIGURA 1), com o uso de fita microporosa bege

Cremer® e veda rosca Amanco® (FIGURA 1A). Consistiram de 4 camadas, sendo a primeira de fita microporosa (FIGURA 1B), a segunda de veda rosca (FIGURA 1C) e a terceira novamente de fita microporosa (FIGURA 1D). Cortaram-se estas 3 primeiras camadas em quadrados de 1 cm² (FIGURA 1E-F). Distribuíram-se separadamente os quadrados sobre a face colável da fita microporosa, totalizando 4 camadas (FIGURA 1G). Em seguida, os quadrados foram cortados de forma homogênea e colocados sobre furos de 1,0 cm de diâmetro presentes em tampas rosca transparentes. Foram utilizadas tampas de 0, 1,2 e 4 furos (FIGURA 1H-J).

Figura 1 - Esquema para a montagem das membranas porosas manufactured utilizadas no experimento (A-J).



Fotos: Giulia Duarte. Lavras, 2016.

Aos 30 dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea e da raiz (cm), número de brotações, matérias secas de folhas, caule, raiz e total (mg), área de foliar (cm²) e análise de folhas secas por *headspace*-CG/EM. Para as características de crescimento, foram realizadas 6 repetições, exceto para área foliar, para qual realizaram-se 5. A área foliar foi mensurada através do *software* WinFOLIA™ pelo scanner EPSON PERFECTION V700 PHOTO. Utilizaram-se 5 plântulas de cada tratamento. Em cada plântula, avaliou-se a área de 1 uma folha retirada do 3º par, contado do ápice da parte aérea para raiz.

2.3 Análises químicas por *headspace* -CG/EM

Realizaram-se as análises químicas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA. O “*headspace*” automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM (Cromatógrafo gasoso/Espectrômetro de Massa) foi o extrator utilizado. Primeiramente, foram feitos procedimentos de otimização das condições operacionais, em seguida, foram estabelecidas a temperatura de incubação da amostra (110°C durante 60 min) e a temperatura da seringa (120°C). O volume de injeção foi de 1000 µL da fase de vapor, injetados em modo *split* na razão 20:1.

As amostras constituíram 50 mg de folhas secas de *P. amboinicus*, acondicionadas em *vials* de 20 mL, vedados com septo de silicone /PTFE. A análise foi realizada em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, California, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1 scan/s, com intervalo de aquisição de matérias de 40-400 m/z.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5-MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e da linha de transferência para o EM foram mantidas em 220°C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 50°C, mantido por 1 minuto, seguido por uma rampa de temperatura de 3°C por min até 200°C, seguida de uma rampa de 10°C por minuto até 280°C, mantendo-se em condição isotérmica por 1 min. As concentrações dos constituintes da análise química foram expressas pela porcentagem de área relativa dos sinais do cromatograma total de íons \pm o desvio padrão (n=3).

Identificaram-se os constituintes químicos por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de n-alcenos (C₈-C₂₀, Sigma- Aldrich®, St Louis, USA) e comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007).

2.4 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à ANAVA pelo teste F ($p < 0,05$), utilizando-se o *software* Sisvar®, versão 5.0 (FERREIRA, 2007). Após verificada a significância das variáveis pelo teste F, realizou-se o teste de média Scott-Knott. O teste foi utilizado para a análise de crescimento e da concentração de constituintes majoritários da fração volátil.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os sistemas de cultivo influenciaram o crescimento *in vitro* de plântulas de *P. amboinicus* oriundas de segmentos apicais e nodais (TABELA 1) (FIGURA 2). Houve interação significativa entre os fatores sistema de cultivo e tipo de explante. Segmentos apicais superaram os nodais em número de folhas no cultivo sob SC e em acúmulo de matérias secas de folhas, raiz e total no SVN1. Os nodais superaram os apicais em número de folhas sob SVN1 e SVN2. Além disso, sob o SVN4, os nodais apresentaram maior matéria seca de raiz que os apicais (TABELA 1).

Tabela 1 - Comprimento da parte aérea (cm), área foliar (cm²), número de folhas, comprimento da maior raiz, matérias secas, em mg, de folhas, caule, raiz e total de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais e nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob sistema convencional (SC) e sistemas de ventilação natural, com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4). (Continua)

Comprimento da Parte Aérea (cm)			Área foliar (cm ²)		
Sistema	Apical	Nodal	Sistema	Apical	Nodal
SC	1,97 aB	2,20 aA	SC	2,29 aB	2,16 aC
SVN1	2,52 aA	2,27 aA	SVN1	3,63 aA	4,18 aA
SVN2	2,10 aB	1,97 aA	SVN2	2,96 aA	2,81 aB
SVN4	1,61 aC	1,50 aB	SVN4	1,56 aB	1,54 aC
CV (%) = 12,13			CV (%) = 23,53		
Número de folhas			Comprimento da maior raiz (cm)		
Sistema	Apical	Nodal	Sistema	Apical	Nodal
SC	11,50 aA	7,33 bC	SC	3,38 aB	3,70 aB
SVN1	10,67 bA	14,50 aA	SVN1	5,06 aA	4,73 aA
SVN2	7,83 bB	14,67aA	SVN2	4,38 aA	4,93 aA
SVN4	8,33 aB	10,00 aB	SVN4	2,95 aB	3,62 aB
CV (%) = 15,61			CV (%) = 25,55		

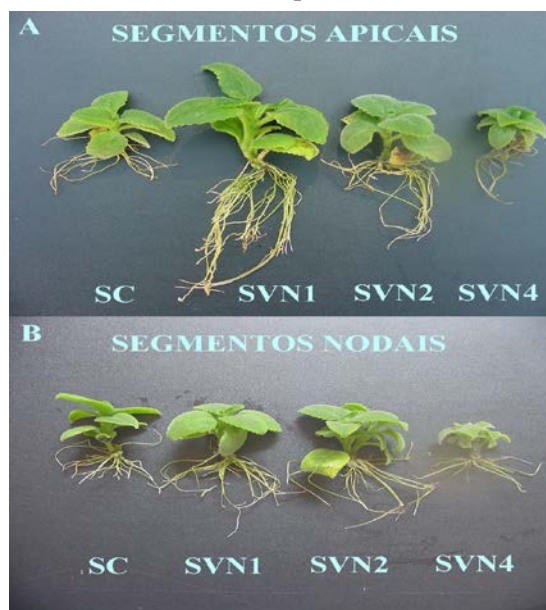
Tabela 1 - Comprimento da parte aérea (cm), área foliar (cm²), número de folhas, comprimento da maior raiz, matérias secas, em mg, de folhas, caule, raiz e total de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais e nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob sistema convencional (SC) e sistemas de ventilação natural, com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4). (Conclusão)

Matéria seca de folhas (mg)			Matéria seca de caule (mg)		
Sistema	Apical	Nodal	Sistema	Apical	Nodal
SC	63,20 aB	64,88 aB	SC	10,90 aB	14,40 aA
SVN1	89,17 aA	67,78 bB	SVN1	14,53 aA	12,55 aA
SVN2	70,36 aB	82,32 aA	SVN2	11,84 aB	14,77 aA
SVN4	41,75 aC	47,33 aC	SVN4	8,97 aB	9,48 aB
CV (%) = 20,35			CV (%) = 20,83		
Matéria seca de raiz (mg)			Matéria seca total (mg)		
Sistema	Apical	Nodal	Sistema	Apical	Nodal
SC	3,78 aD	5,12 aC	SC	77,88 aC	84,50 aB
SVN1	26,77 aA	18,23 bA	SVN1	130,46 aA	98,57 bA
SVN2	15,98 aB	16,50 aA	SVN2	98,18 aB	113,58 aA
SVN4	7,12 bC	9,88 aB	SVN4	57,84 aD	66,70 aC
CV (%) = 12,47			CV (%) = 16,33		

Legenda: CV = coeficiente de variação. Lavras, 2016.

As médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 2 - Aspecto de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais (A) e nodais (B) cultivados *in vitro*, aos 30 dias, sob sistema convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas (SVN4).



Para os segmentos apicais, o SVN1 foi o melhor sistema de cultivo. Pode-se observar que as plântulas oriundas destes segmentos cultivadas sob SVN1 apresentaram o maior valor para todos os parâmetros de crescimento avaliados (TABELA 1). Já para os segmentos nodais, verificou-se que o SVN1 e o SVN2 possibilitaram o melhor crescimento. Estes sistemas produziram plântulas com valores maiores e estatisticamente iguais entre si, para comprimento de parte aérea, número de folhas, comprimento da maior raiz, matérias secas de caule, raiz e total. Diferenciaram na área foliar que foi maior sob SVN1, e na matéria seca de folhas, que foi maior sob SVN2 (TABELA 1). Com isso, considera-se o SVN2 como o mais benéfico para a o cultivo *in vitro* de segmentos nodais da espécie.

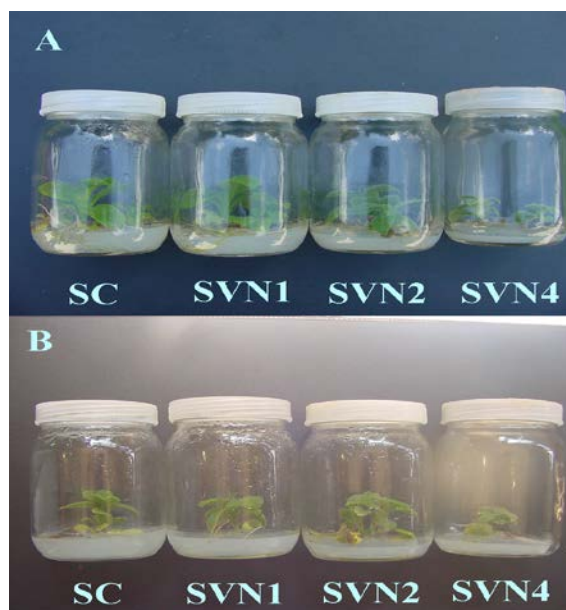
Estes resultados podem estar relacionados ao aumento da fotossíntese causado pela maior disponibilidade de CO₂ sob o SVN1 e SVN2 em relação ao SC. De acordo com Saldanha et al. (2012), o sistema de ventilação natural mantém a concentração de CO₂ dentro do recipiente de cultivo adequada para estimular a fotossíntese. Os mesmos autores verificaram que este sistema melhorou o crescimento *in vitro* de *Pfaffia glomerata*. Assim, no presente trabalho, o aumento da concentração de CO₂ pode ter induzido um aumento de biomassa (SOUZA et al., 2008).

Os resultados do trabalho de Silva et al. (2014b) que cultivaram Abacaxizeiro *in vitro* sob SC e SVN também corrobora em partes com o presente trabalho. O SVN causou efeitos positivos no crescimento das plântulas. Proporcionou maior comprimento de parte aérea e acúmulo de matéria seca que o SC, de um modo geral. Em outro trabalho, com a espécie *Thymus vulgares*, Bandeira et al. (2007) verificaram que a ventilação natural obtida com vedação de algodão, sob o cultivo em MS com 30g/L de sacarose proporcionou maior comprimento de parte aérea e raiz e número de raízes que o SC com uso de filme de polivinilcloreto como vedação. No trabalho de Rodrigues et al. (2012), a espécie *Azadirachta indica* apresentou maior número de brotos com o uso de SVN e os autores verificaram que com o uso do SC ocorreu clorose foliar e senescência.

Entretanto, no presente trabalho com *P. amboinicus*, não se observou incremento no crescimento com o aumento da ventilação natural através do uso de SVN2 (para segmentos apicais) e SVN4 (para segmentos apicais e nodais). Como pode ser observado na Tabela 4, o cultivo de segmentos apicais sob SVN2 causou redução no comprimento da parte aérea, número de folhas, matérias secas de folhas, caule, raiz e total. O sistema SVN4 causou efeito negativo em todos os parâmetros de crescimento, para ambos os explantes.

Provavelmente, este efeito prejudicial do aumento da ventilação natural ocorreu em partes devido à evaporação de água do meio de cultura, causando redução no volume e aumento na concentração de sais disponível para o crescimento das plântulas (FIGURA 3). De acordo com Gao et al. (2003), excesso de sais afeta a nutrição e a absorção de água pelas plantas.

Figura 3 - Redução no volume do meio de cultura observada no experimento com plântulas de *Plectranthus amboinicus* cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, em frascos de sistema convencional (SC) (fechado) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro (SVN4) membranas porosas.



Legenda: A= segmentos apicais; B=segmentos nodais. Lavras, 2016.

Outra hipótese é que com o aumento da ventilação ocorreu maior evaporação de água da superfície das folhas, podendo ter ocorrido um estresse hídrico. As plantas respondem a esta situação com fechamento dos estômatos, o que reduz a condutância estomática durante um curto tempo de resposta (HSIAO, 1973). Sendo esta uma estratégia de adaptação das plantas, pois

mudanças na condutância estomática causam mudanças no potencial hídrico foliar, alterando a taxa de transpiração (FARQUHAR; SHARKEY, 1982). No entanto, a redução da condutância estomática reduz a assimilação de CO₂, limitando a fotossíntese (ZOBAYED; AFREEN; KOZAI, 2007). Desta forma, o crescimento foi reduzido.

A umidade e trocas gasosas no cultivo *in vitro* são importantes fatores que controlam a morfogênese. O ambiente de cultivo pode afetar a atividade de muitas enzimas causando mudança no processo metabólico e respostas similares à de plantas cultivadas sob condições de estresse (ISAH, 2015). Esta perda de água no recipiente também ocorreu no trabalho de Gonçalves et al. (2008). Os autores analisaram o efeito de diferentes materiais de vedação no cultivo *in vitro* de *Herreria salsaparrilha*. O material de vedação que possibilitava trocas gasosas induziu à perda de água nos recipientes.

Em adição, de um modo geral, observou-se que o SVN, principalmente o SVN1 e o SVN2, em comparação ao SC, melhorou as características das raízes das plântulas de *P.amboinicus* cultivadas *in vitro* (TABELA 1) (FIGURA 2). Com isso, infere-se que o cultivo *in vitro* da espécie sob estes sistemas pode possibilitar maior sobrevivência das plântulas na fase de aclimatização.

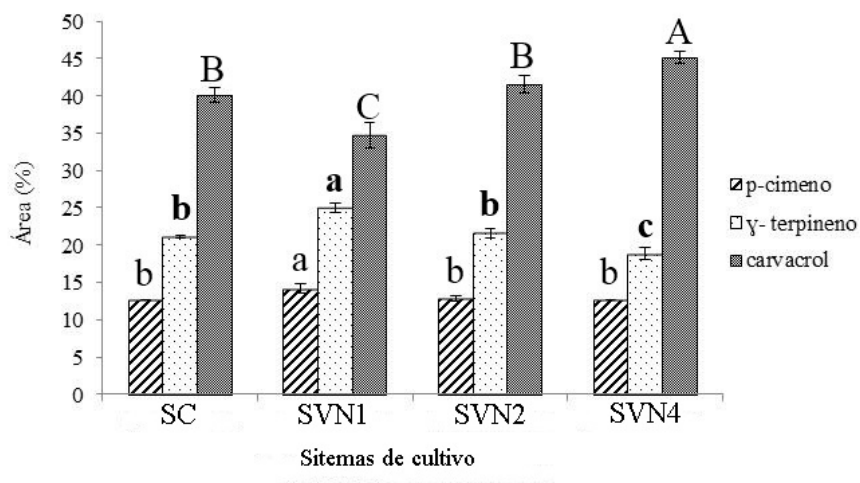
Os diferentes sistemas de cultivo também afetaram a fração volátil de *P.amboinicus* oriunda de segmentos apicais (TABELA 2, FIGURA 4). A composição foi constituída por monoterpenos (83,47 a 86,12%) e sesquiterpenos (12,87 a 16,29%). Um total de 97,33 a 99,76 % dos constituintes químicos foram identificados, os quais representaram um número de 13 a 17 componentes. As diferenças qualitativas foram atribuídas pela ausência de sinais cromatográficos correspondentes aos picos do canfeno, sabineno, (*E*)- β -ocimeno e/ou terpinolene nos tratamentos SC, SVN2 e SVN4.

Tabela 2 - Constituintes voláteis de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob sistema de cultivo convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quarto (SVN4) membranas porosas na tampa do recipiente de cultivo. UFLA, Lavras, 2016

SISTEMAS DE CULTIVO (SEGMENTOS APICAIS)					
Área (%) ± DP					
Constituintes	IR ¹	SC	SVN1	SVN2	SVN4
α-tujeno	923	1,52 ± 0,03	1,99 ± 0,06	1,64 ± 0,01	1,43 ± 0,06
α-pineno	928	0,60 ± 0,00	0,75 ± 0,03	0,66 ± 0,01	0,60 ± 0,02
canfeno	942	-	0,10 ± 0,00	-	-
sabineno	970	-	0,06 ± 0,00	-	-
β-micerno	990	1,48 ± 0,03	1,94 ± 0,05	1,63 ± 0,07	1,53 ± 0,07
α-felandreno	1002	0,47 ± 0,00	0,65 ± 0,02	0,56 ± 0,01	0,45 ± 0,01
α-terpineno	1013	4,46 ± 0,03	5,08 ± 0,08	4,52 ± 0,02	3,87 ± 0,12
p-cimeno	1022	12,69 ± 0,01	14,14 ± 0,62	12,81 ± 0,39	12,72 ± 0,02
β-felandreno	1024	0,64 ± 0,03	0,83 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,70 ± 0,03
(E)-β-ocimeno	1046	-	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,14 ± 0,00
γ-terpineno	1056	21,17 ± 0,15	25,00 ± 0,71	21,60 ± 0,63	18,84 ± 0,84
terpinolene	1084	-	0,12 ± 0,00	-	-
4-terpineol	1171	0,31 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,25 ± 0,00
carvacrol	1305	40,13 ± 1,02	34,75 ± 1,75	41,57 ± 1,19	45,16 ± 0,88
(E)-cariofileno	1410	9,55 ± 0,02	7,37 ± 0,35	7,33 ± 0,31	7,05 ± 0,15
α-trans-bergamoteno	1432	4,91 ± 0,00	4,22 ± 0,00	4,33 ± 0,14	4,44 ± 0,07
α-humuleno	1444	1,83 ± 0,00	1,33 ± 0,00	1,52 ± 0,05	1,38 ± 0,04
Constituintes identificados (%)		99,76	97,33	99,30	98,56
Nº de constituintes		13	17	14	14

¹Índice de retenção relativo à série n-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP5-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (n=3)

Figura 4 - Concentração de constituintes majoritários de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos apicais cultivados *in vitro*, aos 30 dias, sob diferentes sistemas de cultivo convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas na tampa do recipiente de cultivo (SVN4).



Legenda: As barras representam o desvio padrão ($n=3$). As médias que apresentam a mesma letra dentro os valores para um determinado constituinte não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Lavras, 2016.

Os principais constituintes químicos da fase de vapor foram o *p*-cimeno, γ -terpineno e carvacrol, os quais representaram em média área de 75,15% da composição química total (TABELA 1). Os diferentes sistemas de cultivo influenciaram significativamente o teor porcentual desses constituintes (FIGURA 4). O maior teor de carvacrol ($45,16\% \pm 0,88$) foi observado nas plântulas cultivadas sob SVN4. Por outro lado, os menores teores de *p*-cimeno e γ -terpineno também foram observados com este tratamento (FIGURA 4).

De acordo com Crocoll (2011), o carvacrol é biossintetizado em *Origanum* e *Thymus*, a partir da orto-hidroxilação do γ -terpineno ou α -terpineno.

O menor teor de γ -terpineno observado sob SVN4 pode ter ocorrido devido à sua conversão à carvacrol. Do mesmo modo, o SVN4 pode também ter proporcionado a biotransformação *in vitro* de *p*-cimeno a carvacrol. Polouse e Croteau (1978) propuseram que a biossíntese de carvacrol tem origem no γ -terpineno, que por sua vez sofre uma aromatização a *p*-cimeno e, em seguida, uma hidroxilação em C2.

O SVN1 foi o que mais prejudicou o acúmulo de carvacrol *in vitro*. Nota-se que este tratamento não proporcionou a conversão *in vitro* de *p*-cimeno e γ -terpineno em carvacrol, já que os maiores teores de *p*-cimeno e γ -terpineno foram observados sob o SVN1 (FIGURA 4). Pode-se observar que a concentração de carvacrol foi crescente na seguinte ordem: SVN1, SVN2 e SVN4 (FIGURA 4). Na mesma ordem, as concentrações de γ -terpineno e *p*-cimeno foram decrescentes. A maior concentração de CO₂ presente no microambiente afeta a produção de monoterpenos. Baixa disponibilidade de CO₂ resulta em baixas taxas fotossintéticas. Taxa fotossintética reduzida diminui a disponibilidade de gliceraldeído-3-fosfato (GA₃) que é um dos substratos para a produção de terpenos (SCHURGERS et al., 2009).

A fase de vapor das amostras de folhas de plântulas de *P. amboinicus* oriundas de segmentos nodais, cultivadas sob diferentes sistemas de cultivo, não apresentou diferenças quantitativas consideráveis (TABELA 3). A composição química total abrangeu a faixa de 97,78% a 99,12%, em que os três constituintes majoritários, *p*-cimeno, γ -terpineno e carvacrol, representaram juntos cerca de 73,70% da totalidade dos constituintes químicos (TABELA 3).

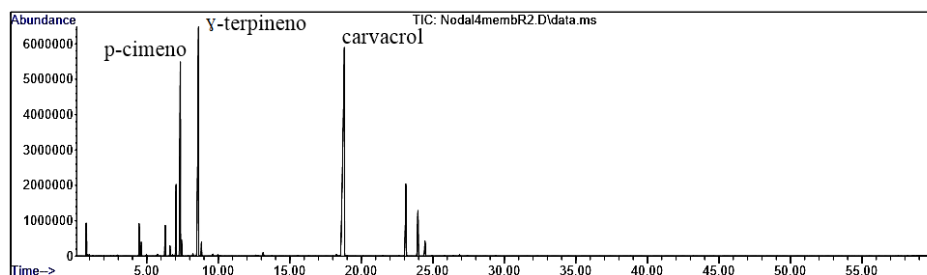
Tabela 3 - Constituintes voláteis de plântulas de *Plectranthus amboinicus* oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob sistema de cultivo convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro (SVN4) membranas porosas na tampa do recipiente de cultivo. Lavras, 2016

SISTEMAS DE CULTIVO (SEGMENTOS NODAIS)					
Área (%) ± DP					
Constituintes	IR ¹	SC	SVN1	SVN2	SVN4
α -tujeno	923	1,95 ± 0,09	1,99 ± 0,07	1,95 ± 0,08	1,83 ± 0,02
α -pineno	928	0,75 ± 0,03	0,76 ± 0,02	0,81 ± 0,02	0,77 ± 0,01
canfeno	942	-	-	-	0,10 ± 0,01
sabineno	970	-	0,05 ± 0,00	-	0,08 ± 0,00
β -micerno	990	1,96 ± 0,01	1,78 ± 0,07	2,01 ± 0,04	1,96 ± 0,04
α -felandreno	1002	0,53 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,63 ± 0,00	0,64 ± 0,02
α -terpineno	1013	5,22 ± 0,11	5,42 ± 0,23	5,27 ± 0,02	4,89 ± 0,05
p-cimeno	1022	13,41 ± 0,49	14,17 ± 0,64	14,67 ± 0,73	13,54 ± 0,64
β -felandreno	1024	0,82 ± 0,02	0,87 ± 0,03	0,89 ± 0,03	0,86 ± 0,02
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1046	0,16 ± 0,00	-	0,20 ± 0,00	0,21 ± 0,01
γ -terpineno	1056	24,55 ± 0,14	25,34 ± 1,21	24,11 ± 0,55	23,00 ± 0,11
terpinolene	1084	-	-	0,15 ± 0,00	0,13 ± 0,00
4-terpineol	1171	0,17 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01
carvacrol	1305	35,77 ± 0,61	33,86 ± 1,02	35,49 ± 0,82	36,91 ± 1,01
(<i>E</i>)-cariofileno	1410	7,35 ± 0,01	7,97 ± 0,311	6,65 ± 0,07	7,01 ± 0,08
α - <i>trans</i> -bergamoteno	1432	4,07 ± 0,13	4,57 ± 0,002	3,82 ± 0,06	4,28 ± 0,11
α -humuleno	1444	1,35 ± 0,00	1,47 ± 0,013	1,26 ± 0,02	1,29 ± 0,01
Constituintes identificados (%)		98,06	99,12	98,19	97,78
Nº de constituintes		14	14	15	17

¹Índice de retenção relativo à série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP5-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (n=3)

A Figura 5 apresenta o perfil cromatográfico da fração volátil analisada, destacando os três principais componentes químicos. Sutis diferenças químicas qualitativas foram observadas entre os tratamentos que apresentaram entre 14 e 17 constituintes químicos. Os constituintes químicos que determinaram a variação qualitativa foram os monoterpenos hidrocarbonetos canfeno, sabineno, (*E*)- β -ocimeno e terpinolene que não foram detectados ou apresentaram área percentual relativa máxima de 0,21 %.

Figura 5 - Cromatograma total de íons representativo, obtido por análise de *headspace*-CG/EM, de folhas de plântulas de *Plectranthus amboinicus* cultivadas *in vitro*, aos 30 dias, sob sistema de cultivo convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4) nas tampas dos recipientes de cultivo. Lavras, 2016



Comparando-se de forma quantitativa os constituintes majoritários da fração volátil analisada em folhas de plântulas oriundas de segmentos apicais, com os obtidos em folhas de plântulas oriundas de segmentos nodais, pode-se observar analisando as tabelas 2 e 3 que as de segmentos apicais apresentaram maior acúmulo de carvacrol que as de nodais sob os tratamentos SC, SVN2 e SVN4. Além disso, a concentração de γ -terpineno sob SVN4 nas de nodais foi maior que nas de apicais. Já para a concentração de *p*-cimeno não foram observadas diferenças consideráveis.

4 CONCLUSÃO

O sistema de ventilação natural causa impactos no crescimento de plântulas de *P. amboinicus* cultivadas *in vitro*, tanto nas oriundas de segmentos apicais, como nas oriundas de segmentos nodais. Além disso, também afeta quantitativamente e qualitativamente a composição volátil de folhas de plântulas oriundas de segmentos apicais, e qualitativamente a composição volátil de folhas de plântulas oriundas de segmentos nodais. O SVN 1 e o SVN2, em geral, melhoram o crescimento *in vitro* da espécie, principalmente o enraizamento. O crescimento ótimo de segmentos apicais é alcançado com o uso de SVN1 e de nodais, com o SVN2.

O SVN4 é prejudicial ao crescimento *in vitro* de ambos os explantes, mas é o sistema que proporciona o maior acúmulo de carvacrol por plântulas de *P. amboinicus* oriundas de segmentos apicais. Por outro lado, os menores teores de *p*-cimeno e γ -terpineno em plântulas oriundas destes segmentos também ocorrem sob este sistema. Para algumas variáveis de crescimento, o efeito do sistema de cultivo foi dependente do tipo de explante utilizado. Isso também ocorreu para a quantidade dos constituintes majoritários carvacrol e γ -terpineno.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.
- AGUIAR, J. J. S. et al. Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. **European Journal of Integrative Medicine**, New York, v. 7, n. 2, p. 151-156, Apr. 2015.
- BANDEIRA, J. M. et al. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. nota científica. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 472-474, 2007. Suplemento.
- CHA-UM, S. et al. Promoting root induction and growth of in vitro macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, p. 435-444, Sept. 2011.
- CHEN, C. Humidity in plant tissue culture vessels. **Biosystems Engineering**, London, v. 88, n. 2, p. 231-241, June 2004.
- CHEONG, E. J.; MOCK, R.; LI, R. Elimination of five viruses from sugarcane using *in vitro* culture of axillary buds and apical meristems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 3, p. 439-445, June 2012.
- COSTE, A. et al. *In vitro* propagation and cryopreservation of *Romanian* endemic and rare *Hypericum* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, n. 2, p. 213-226, Aug. 2012.
- CROCOLL, C. **Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme**. 2011. 143 p. Dissertation (Zur Erlangung des Akademischen Grades Doctor Rerum Naturalium) - Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, 2011.
- DOOL, H. van den; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-467, 1963.

FARQUHAR, G. D.; SHARKEY, T. D. Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 33, p. 317-345, 1982.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de Análise de Variância**. Versão 5.0. Lavras: DEX/UFLA, 2007.

GAO, X. et al. Overexpression of *SOD2* Increases Salt Tolerance of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 4, p. 1873-1881, Dec. 2003.

GONÇALVES, L. A. et al. *In vitro* propagation of *Herreria salsaparrilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, p. 243-250, 2008.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue cultured plants. **Current Science**, Columbus, v. 85, n. 9, p. 1704-1712, Sept. 2003.

HSIAO, T. C. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto., v. 24, p. 519-570, 1973.

ISAH, T. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. **Acta Biologica Cracoviensia**, Krakow, v. 57, n. 2, p. 9-28, Dec. 2015.

KAUR, A.; SANDHU, J. S. High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: cost analysis for agri-business industry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 120, n. 1, p. 339-350, 2015.

KHATTAK, M. M. A. K. et al. Anti-bacterial and anti-fungal activity of coleus leaves consumed as breast-milk stimulant. **Nutrition & Food Science**, London, v. 43, n. 6, p. 582-590, 2013.

MOHAMED, M. A. H.; IBRAHIM, T. A. A. Enhanced *in vitro* production of *Ruta graveolens* L. coumarins and rutin by mannitol and ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, p. 335-343, June 2012.

MOREIRA, A. L. et al. Crescimento de *Cattleya walkeriana* em diferentes sistemas de micropropagação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURUGAN, K. et al. Larval and pupal toxicity effects of *Plectranthus amboinicus*, *Bacillus sphaericus* and predatory copepods for the control of the dengue vector, *Aedes aegypti*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 41, n. 3, p. 307-316, July 2013.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Chemistry web book**. 2008. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 8 maio 2016.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 187, p. 307-314, 1978.

RODRIGUES, M. et al. Effects of flask sealing and growth regulators on in vitro propagation of neen (*Azadirachta indica* A.Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 48, n. 1, p. 67-72, Feb. 2012.

SALDANHA, C. W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, n. 3, p. 413-422, Sept. 2012.

SCHURGERS, G. et al. European emissions of isoprene and monoterpenes from the Last Glacial Maximum to presente. **Biogeosciences**, Orono, v. 6, n. 12, p. 2779-2797, 2009.

SELVAKUMAR, P.; NAVEENA, B. E.; PRAKASH, D. Studies on the antidandruff activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and *Eucalyptus globulus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Canberra, v. 2, p. S715-S719, 2012. Supplement 2.

SHUELTER, A. R. et al. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial *in vitro* de plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* DUNAL). **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 14, n. 3, p. 183-190, jul./set. 2015.

SIAHSAR, B. et al. Application of biotechnology in production of medicinal plants. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Dubai, v. 11, n. 3, p. 439-444, 2011.

SILVA, A. B. da et al. Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) micropropagado. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 380-386, mar./abr. 2014a.

SILVA, A. B. da et al. In vitro growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 61, n. 6, p. 883-890, nov./dez. 2014b.

SOUZA, A. P. et al. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 1116-27, Aug. 2008.

TISSERAT, B.; VAUGHN, S. F. Essential oils enhanced by ultra-high carbon dioxide levels from Lamiaceae species grown in vitro and in vivo. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 4, p. 361-368, June 2001.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 149-158, May 2011.

ZHU, C. et al. Historical and experimental evidence for enhanced concentration of artemisinin, a global anti-malarial treatment, with recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide. **Climatic Change**, Dordrecht, v. 132, n. 2, p. 295-306, Sept. 2015.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 59, n. 2, p. 109-116, Mar. 2007.