



**ALEXANDRE ALVES DE CARVALHO**

**MESOCOMPONENTES, QUALIDADE DE LUZ E  
ELICITORES NA MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE  
QUÍMICA VOLÁTIL DE *Chenopodium ambrosioides* L.  
(Chenopodiaceae)**

**LAVRAS - MG  
2017**

**ALEXANDRE ALVES DE CARVALHO**

**MESOCOMPONENTES, QUALIDADE DE LUZ E ELICITORES NA  
MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA VOLÁTIL DE *Chenopodium  
ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)**

Tese 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 obtenção do título de Doutor.

PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2017**

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

Carvalho, Alexandre Alves de.

Mesocomponentes, qualidade de luz e elicitores na  
micropropagação e análise química volátil de *Chenopodium  
ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) / Alexandre Alves de Carvalho.  
- 2017.

97 p. : il.

Orientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Composição volátil. 2. Nutrição mineral. 3. Espectro  
luminoso. I. Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. II. Bertolucci,  
Suzan Kelly Vilela. III. Título.

**ALEXANDRE ALVES DE CARVALHO**

**MESOCOMPONENTES, QUALIDADE DE LUZ E ELICITORES NA  
MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA VOLÁTIL DE *Chenopodium  
ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)**

**MESO COMPONENTS, LIGHT QUALITY AND ELICITORS IN  
MICROPROPAGATION AND VOLATILE CHEMISTRY OF *Chenopodium  
ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)**

Tese 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 obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 08 de março de 2017.

Dr. Adriano Bortolotti da Silva UNIFENAS

Dr. Osmar Alves Lameira EMBRAPA

Dr<sup>a</sup>. Joyce Dória Rodrigues Souza UFLA

Dr<sup>a</sup>. Suzan Kelly Vilela Bertolucci UFLA

PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2017**

## **AGRADECIMENTOS**

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos e recursos financeiros para realização desse trabalho.

Ao professor e orientador José Eduardo Brasil Pereira Pinto, não apenas pela disponibilidade e acompanhamento nessa formação profissional, mas também, pela sua amizade e seus ensinamentos.

À professora Suzan Kelly Vilela Bertolucci, pela coorientação e dedicação.

Aos familiares e amigos que de alguma maneira contribuíram para mais essa conquista.

Aos meus pais Osmar e Ana Maria, à minha esposa Ester e seus familiares e minha irmã e seu esposo, que me acompanham diariamente, sendo o apoio de cada um essencial para minha existência;

E finalmente a Deus, o autor e o consumidor de tudo;

Obrigado!

## RESUMO GERAL

*Chenopodium ambrosioides* L. é uma planta medicinal, popularmente conhecida como Erva-de-santa-maria, mastruz ou epazote, utilizada como anti-helmíntico. No Brasil há o interesse em seu estudo por estar listada na RENISUS. A possibilidade de multiplicar clones em grande quantidade e em pequeno espaço são vantagens da cultura de tecidos. Objetivou-se estudar as concentrações de mesocomponentes, a qualidade de luz e o uso de elicitores no crescimento e na produção de constituintes voláteis *in vitro* de *C. ambrosioides* L. O presente trabalho foi dividido em três artigos. No primeiro artigo, diferentes concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado (0; 185; 370; 740; 1480 mg L<sup>-1</sup>), de cloreto de cálcio dihidratado (0; 220; 440; 880; 1760 mg L<sup>-1</sup>) e de fosfato monopotássico (0; 85; 170; 340; 680 mg L<sup>-1</sup>) do meio MS foram avaliadas. Os intervalos de concentrações de mesocomponentes do meio MS mais adequadas para a manutenção do crescimento de segmentos nodais *in vitro* de *C. ambrosioides* L. são: 1039 a 1069 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 958 a 1301 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 329 a 397 mg L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. O constituinte majoritário Z-ascaridol apresentou maior teor em 352 mg L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e menor teor em 770 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1097 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O. No segundo artigo, segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura e mantidos por 40 dias em uma sala de crescimento com diferentes diodos emissores de luz (LEDs): azul; vermelho; branco; e em combinações entre azul e vermelho (1:1; 2:1; 1:2); e lâmpada fluorescente branca fria. O melhor crescimento de segmentos nodais foi observado nos tratamentos com iluminação provenientes de lâmpadas LEDs branco ou em combinação azul/vermelho (2:1). LEDs monocromáticos na cor azul resultam em incrementos de  $\alpha$ -terpineno e p-cimeno em detrimento de Z-ascaridol. No terceiro artigo, cinco concentrações de quitosana (0; 50; 100; 150; 200 mg L<sup>-1</sup>) e cinco concentrações de ácido salicílico (0; 3; 6; 9; 12 mg L<sup>-1</sup>) foram adicionadas ao meio MS. A quitosana e o ácido salicílico apresentaram efeito negativo no crescimento de segmentos nodais de *C. ambrosioides* L. O constituinte majoritário Z-ascaridol apresentou maior teor em 61,11 mg L<sup>-1</sup> de quitosana e em 7,79 mg L<sup>-1</sup> de ácido salicílico.

Palavras-chave: Composição volátil. Nutrição mineral. Espectro luminoso. Quitosana. Ácido salicílico.

## ABSTRACT

*Chenopodium ambrosioides* L. is a medicinal plant, popularly known as Erva-de-santa-maria, mastruz or epazote, used as anthelmintic. In the Brazil there is interest in your study because it is listed in the RENISUS. The possibility of multiplying clones in large quantities and in small space are advantages of tissue culture. The objective of this study was to study the concentrations of meso components, the light quality and the use of elicitors on the growth and production of volatile constituents of *C. ambrosioides in vitro*. The present work was divided in three experiment. The first was different concentrations of magnesium sulfate heptahydrate (0; 185; 370; 740; 1480 mg L<sup>-1</sup>), calcium chloride dehydrate (0; 220; 440; 880; 1760 mg L<sup>-1</sup>) and monopotassium phosphate (0; 85; 170; 340; 680 mg L<sup>-1</sup>) in the MS medium were evaluated. The most adequate meso components intervals in MS medium for the maintenance of *C. ambrosioides* nodal segments *in vitro* are: 1039 to 1069 mg L<sup>-1</sup> of MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 958 to 1301 mg L<sup>-1</sup> of CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O and 329 to 397 mg L<sup>-1</sup> of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The major constituent Z-ascaridole had the biggest content in 352 mg L<sup>-1</sup> of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and the smallest content in 770 mg L<sup>-1</sup> of MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O and in 1097 mg L<sup>-1</sup> of CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O. In the second, nodal segments were inoculated in culture medium and kept for 40 days in a growth room with different diodes emitting light (LEDs): blue; red; white; and combinations between blue and red (1:1; 2:1; 1:2) and cool white fluorescent lamp. The best growth of nodal segments was observed in the treatments with illumination coming from white LED lamps or in combination blue/red (2:1). Monochromatic LEDs in the color blue result in increments of α-terpinene and p-cymene in detriment of Z-ascaridole. In the third, five concentrations of chitosan (0, 50, 100, 150, 200 mg L<sup>-1</sup>) and five concentrations of salicylic acid (0, 3, 6, 9, 12 mg L<sup>-1</sup>) were added to the MS medium. The chitosan and salicylic acid had a negative effect on the growth and development of *C. ambrosioides* nodal segments. The major constituent Z-ascaridole presented higher content in 61.11 mg L<sup>-1</sup> of chitosan and in 7.79 mg L<sup>-1</sup> of salicylic acid.

Keywords: Volatile composition. Mineral nutrition. Luminous spectrum. Chitosan. Salicylic acid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 A espécie *Chenopodium ambrosioides* L: A- canteiro fertirrigado, B- detalhamento da folha, C- detalhamento da inflorescência..... 14

Figura 2 Mecanismo envolvendo a formação do ascaridol e outros monoterpenos no gênero *Chenopodium*..... 16

### ARTIGO 1

Figura 1 Plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado do meio MS..... 38

Figura 2 Efeito de diferentes concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado do meio MS na: A- altura de plântulas (AL), B- biomassa seca de raízes (BSR), C- biomassa seca de folhas (BSF), D- biomassa seca de caules (BSC) e E- biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro*..... 39

Figura 3 Teor (%) dos principais constituintes voláteis de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado do meio MS..... 42

Figura 4 Plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de cloreto de cálcio dihidratado do meio MS..... 43

Figura 5 Efeito de diferentes concentrações de cloreto de cálcio dihidratado do meio MS na: A- altura de plântulas (AL), B- biomassa seca de raízes (BSR), C- biomassa seca de folhas (BSF), D- biomassa seca de caules (BSC) e E- biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro*..... 44

Figura 6 Teor (%) dos principais constituintes voláteis de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de cloreto de cálcio dihidratado do meio MS..... 46

Figura 7 Plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de fosfato monopotássico do meio MS..... 47

Figura 8 Efeito de diferentes concentrações de fosfato monopotássico do meio MS na: A- altura de plântulas (AL), B- biomassa seca de folhas (BSF), C- biomassa seca de caules (BSC), D- biomassa seca de raízes (BSR) e E- biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro*..... 48

Figura 9 Teor (%) dos principais constituintes voláteis de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de fosfato monopotássico do meio MS..... 51



## ARTIGO 2

- Figura 1 Perfis espectrais no ultravioleta das fontes de luz utilizadas no experimento. A= azul, B=vermelho, C = azul:vermelho (1:2), D= azul:vermelho (2:1), E=azul: vermelho (1:1), F= fluorescente, G= LED branco..... 61
- Figura 2 Plântulas micropropagadas de *Chenopodium ambrosioides* L. sob diferentes qualidades espectrais de luz. LEDs: azul, 2A/1V (2azul:1vermelho), 1A/2V (1azul:2vermelho), branco, 1A/1V (1azul:1vermelho), Verm (vermelha). Fluor (fluorescente)..... 65
- Figura 3 Mecanismo envolvendo a formação do ascaridol e outros monoterpenos no gênero *Chenopodium*..... 71

## ARTIGO 3

- Figura 1 Plântulas micropropagadas de *Chenopodium ambrosioides* L. em diferentes concentrações de quitosana adicionadas ao meio de cultura..... 84
- Figura 2 Efeito de diferentes concentrações de quitosana adicionadas ao meio MS na: A- altura de plântulas (AL), B- biomassa seca de raízes (BSR), C- biomassa seca de folhas (BSF), D- biomassa seca de caules (BSC) e E- biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro*..... 85
- Figura 3 Teor (%) dos principais constituintes voláteis de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de quitosana..... 87
- Figura 4 Mecanismo envolvendo a formação do ascaridol e outros monoterpenos no gênero *Chenopodium*..... 88
- Figura 5 Plântulas micropropagadas de *Chenopodium ambrosioides* L. em diferentes concentrações de ácido salicílico adicionadas ao meio de cultura..... 90
- Figura 6 Efeito de diferentes concentrações de ácido salicílico na: A- altura de plântulas (AL), B- biomassa seca de raízes (BSR), C- biomassa seca de folhas (BSF), D- biomassa seca de caules (BSC) e E- biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro*..... 91
- Figura 7 Teor (%) dos principais constituintes voláteis de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de ácido salicílico..... 93

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Composição inorgânica dos principais meios de cultura.....	19
----------	--	----

### ARTIGO 2

Tabela 1	Altura de plântula (AL - mm), biomassa seca de caule (BSC - mg), de folha (BSF - mg), de raiz (BSR - mg) e total (BST - mg) de segmentos nodais de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes qualidades de luz.....	66
Tabela 2	Clorofila <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> ), clorofila <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> ), relação clorofila <i>b</i> e <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> ), clorofila total (mg g <sup>-1</sup> ) e carotenóides (mg g <sup>-1</sup> ) de segmentos nodais de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes qualidades de luz.....	68
Tabela 3	Teor porcentual dos picos cromatográficos dos principais constituintes da química volátil de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. cultivada <i>in vitro</i> em diferentes qualidades de luz.....	70

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
2.1	<b>Descrição da espécie .....</b>	<b>14</b>
2.2	<b>Micropropagação.....</b>	<b>17</b>
2.3	<b>Nutrição mineral.....</b>	<b>18</b>
2.4	<b>LEDs.....</b>	<b>21</b>
2.5	<b>Elicitores.....</b>	<b>23</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>25</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b>	
	<b>ARTIGO 1</b>	
	<b>CRESCIMENTO VEGETATIVO E ANÁLISE QUÍMICA VOLÁTIL DE <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. EM CULTIVO <i>IN VITRO</i> COM MESOCOMPONENTES.....</b>	<b>31</b>
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>34</b>
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
2.1	<b>Estabelecimento de segmentos apicais .....</b>	<b>35</b>
2.2	<b>Efeito de mesocomponentes no meio de cultura MS .....</b>	<b>36</b>
2.3	<b>Análise estatística.....</b>	<b>37</b>
2.4	<b>Análise química por <i>headspace</i>-CG/EM de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....</b>	<b>37</b>
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
3.1	<b>Efeito de diferentes concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado do meio MS no crescimento de segmentos nodais e na química volátil de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....</b>	<b>38</b>
3.2	<b>Efeito de diferentes concentrações de cloreto de cálcio dihidratado do meio MS no crescimento de segmentos nodais e na química volátil de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....</b>	<b>43</b>
3.3	<b>Efeito de diferentes concentrações de fosfato monopotássico do meio MS no crescimento de segmentos nodais e na química volátil de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....</b>	<b>47</b>
4	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

## ARTIGO 2

### PROPAGAÇÃO *IN VITRO* de *Chenopodium ambrosioides* L.: QUALIDADE DE LUZ NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS

1	INTRODUÇÃO.....	58
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1	Efeito de diferentes qualidades de luz no crescimento de segmentos nodais.....	60
2.2	Análise de pigmentos fotossintéticos.....	62
2.3	Análise química por <i>headspace</i> -CG/EM de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L	63
2.4	Análise estatística.....	64
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

## ARTIGO 3

### CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA E DE ÁCIDO SALICÍLICO NA CULTURA *IN VITRO* E NA PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS DE PLÂNTULAS DE *Chenopodium ambrosioides* L.....

1	INTRODUÇÃO.....	79
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1	Estabelecimento de segmentos apicais.....	81
2.2	Efeito de diferentes concentrações de elicitores no crescimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais.....	81
2.3	Análise estatística.....	82
2.4	Análise química por <i>headspace</i> -CG/EM de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L	82
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4	CONCLUSÕES.....	94
	REFERÊNCIAS.....	94

## 1- INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Chenopodium ambrosioides* L., conhecida como Erva-de-santa-maria, mastruz e epazote, é amplamente distribuída ao longo da América, África e também em países da Europa. A principal utilização da espécie é como anti-helmíntica e essa ação é atribuída ao monoterpene ascaridol, constituinte majoritário do óleo essencial. Também é documentado que esse monoterpene é um potente inibidor *in vitro* do desenvolvimento de *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* (LORENZI; MATOS; FRANCISCO, 2008; MACDONALD et al., 2004; SÁ; SOARES; RANDAU, 2015).

Em 2008, o Ministério da Saúde brasileiro incluiu *C. ambrosioides* L. na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Nacional de Saúde (RENISUS), reconhecendo seu potencial terapêutico (CYSNE et al., 2016; VERISSIMO et al., 2011). Outra aplicação dessa espécie é no uso agrônômico e veterinário. De acordo com Sá, Soares e Randau (2015), seu óleo essencial apresenta importantes atividades biológicas como antifúngica, antiparasitária, inseticida, alelopática, citotóxica e antioxidante. Há o potencial no controle do nematóide *Pratylenchus brachyurus* (MELLO; MACHADO; INOMOTO, 2006), do inseto praga *Sitophilus zeamais* e do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* (JARAMILLO; DUARTE; DELGADO, 2012).

A cultura de tecidos é uma técnica vantajosa, quando aplicada em variedades que necessitam ser propagadas em curto espaço de tempo e em grande escala, além da segurança na qualidade fitossanitária e preservação de caracteres importantes (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006). Para as plantas medicinais, além da necessidade de obtenção de plantas uniformes e preservação de habitats naturais, pode-se produzir também compostos de interesse *in vitro*, através da manipulação de mesocomponentes no meio de cultivo, qualidade de luz onde as plantas serão cultivadas, bem como a utilização de elicitores.

O estudo da nutrição mineral de plantas é essencial, pois os nutrientes minerais são fundamentais para o crescimento e o desenvolvimento de plantas, assim como a produção de metabólitos secundários (GARLET; SANTOS, 2008). Há diversos estudos sobre nutrição vegetal em que são realizados com plantas sob condições de campo ou de casa de vegetação e poucas informações sobre nutrição *in vitro* são reportadas (DINIZ et al., 1999).

Os LEDs são dispositivos eletroluminescentes que apresentam maior vida útil e redução de consumo de energia elétrica quando comparados com outras fontes de luz

(ROCHA et al., 2010). Uma das principais características dos LEDs para a micropropagação de plantas é a emissão de regiões espectrais específicas que podem ser utilizados para regular os níveis de radiação necessários para o crescimento e o desenvolvimento de plantas (DUTTA GUPTA; JATOTHU, 2013). Diferentes qualidades espectrais de luz emitidas por LEDs vêm sendo avaliados na micropropagação e na produção de metabólitos secundários em plantas medicinais (ALVARENGA et al., 2015b; BATISTA et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Elicitores são substâncias exógenas que induzem uma resposta de defesa no vegetal. Elicitores, bióticos e abióticos, podem ser usados para ativar a via do metabolismo secundário e aumentar a produção de terpenos de interesse (LU; TANG; LI, 2016). Nesse contexto, a quitosana e o ácido salicílico se enquadram entre as substâncias abióticas elicitoras.

A quitosana é um polissacarídeo naturalmente encontrado na parede do micélio de alguns fungos e no exoesqueleto dos artrópodes e crustáceos (NGE et al., 2006). Efeitos positivos de quitosana *in vitro* no crescimento e na produção de metabólitos secundários são reportados em *Withania somnifera* (GORELICK et al., 2015), *Atropa belladonna* (HASHIMOTO; YUN; YAMADA, 1993), *Trigonella foenum-graecum* (MERKLI; CHRISTEN; KAPETANIDIS, 1997) e em *Curcuma longa* L. (SATHIYABAMA; BERNSTEIN; ANUSUYA, 2016).

O ácido salicílico é um composto fenólico que está envolvido numa série de processos fisiológicos (PACHECO et al., 2007). Nas duas últimas décadas, o ácido salicílico tem recebido muita atenção devido ao envolvimento em mecanismos de defesa de plantas, estresse biótico e abiótico (SAKHANOKHO; KELLEY, 2009). Pesquisas relatam a ação elicitora do ácido salicílico na biossíntese de paclitaxel e taxanos relacionados (LU; TANG; LI, 2016), no metabolismo do terpeno em *Nigella sativa* (ELYASI et al., 2016) e na acumulação de mono e sesquiterpenos de *Panax ginseng* (RAHIMI et al. 2014).

Não há relatos na literatura sobre a nutrição mineral *in vitro*, a qualidade de luz e o uso de elicitores objetivando o crescimento e a produção de constituintes voláteis da espécie *C. ambrosioides* L. Portanto, objetivou-se avaliar diferentes concentrações de mesocomponentes, LEDs com distintos espectros luminosos e a incorporação de quitosana e ácido salicílico no meio de cultura que podem influenciar o crescimento vegetativo e produção dos constituintes voláteis *in vitro*.

## 2- REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1- Descrição da espécie

*Chenopodium ambrosioides* L. (Figura 1), popularmente conhecida como "Erva-de-santa-maria", "mastruz" e "epazote", possui como centro de origem a América Central e do Sul e pertence à família Chenopodiaceae (LORENZI; MATOS; FRANCISCO, 2008). É uma planta herbácea, com até um metro de altura, caule piloso e sulcado, folhas inteiras e simples, sendo as superiores sésseis e as inferiores pecioladas de dimensões variadas e providas de tricomas (BLANCKAERT et al., 2012; COSTA; TAVARES, 2006; PEREIRA et al., 2010).

Figura 1- A espécie *Chenopodium ambrosioides* L.: A- canteiro fertirrigado, B- detalhamento da folha, C- detalhamento da inflorescência.



Fonte: José Eduardo B. P. Pinto e Alexandre A. de Carvalho (2017).

A Erva-de-santa-maria é cultivada em regiões subtropicais e temperadas e consumida como erva medicinal, vegetal folhoso e condimento, em receitas tradicionais, na América do Sul (JARDIM et al., 2010). Suas sementes apresentam alto grau de dormência revelado pelo baixo poder germinativo e é nesse órgão que apresenta o maior teor de óleo essencial, 80 a 90% de ascaridol (MARTINS; SILVA; JUNIOR, 2010).

A *Chenopodium ambrosioides* L. é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das espécies mais utilizadas entre os remédios tradicionais, como antifebrífugo, antiespasmódico, tônico, auxiliar da digestão, problemas hepáticos, bronquite, tuberculose, hematomas, anti-reumático e antipirético (COSTA; TAVARES, 2006).

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), implementado pelo governo brasileiro, seleciona a Erva-de-santa-maria como uma das 71 espécies ou gêneros, tradicionalmente utilizados no Brasil, selecionadas para possível uso como fitoterápicos a serem prescritos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A maioria dessas plantas carece de estudos científicos que validem seus efeitos (VERISSIMO et al., 2011).

Oliveira et al. (2015) verificaram aumento na quantidade de publicações científicas e depósitos de patentes ao longo dos anos, no entanto, de modo geral, a produção tecnológica envolvendo a espécie *C. ambrosioides* L. é relativamente escassa e tem se desenvolvido de modo mais intenso apenas na China.

No Brasil, a espécie é amplamente utilizada. Em Minas Gerais as folhas e as sementes são utilizadas como anti-helmínticas, repelentes de insetos, contra contusões e corrimento vaginal; no Ceará, a infusão das folhas é utilizada contra gripe; em Brasília, as flores são utilizadas como purgante; no Rio Grande do Sul, é útil contra problemas de estômago, vermes, úlceras e para eliminar pulgas e piolhos; no Mato Grosso, como vermífugo e emoliente; no Pará, contra vermes e fraturas (COSTA; TAVARES, 2006).

Outra aplicação da *C. ambrosioides* L. é no uso agrônômico, como nematicida, antifúngico, repelente de insetos e antioxidante. Segundo Mello, Machado e Inomoto (2006), a planta apresenta potencial para controle de *Pratylenchus brachyurus*, tanto para rotação de cultura quanto pela aplicação de extrato. Seu óleo essencial é um repelente contra insetos sendo mais eficaz contra os que habitam no substrato do que os que se alimentam da parte aérea da planta (CLOYD; CHIASSON, 2007).

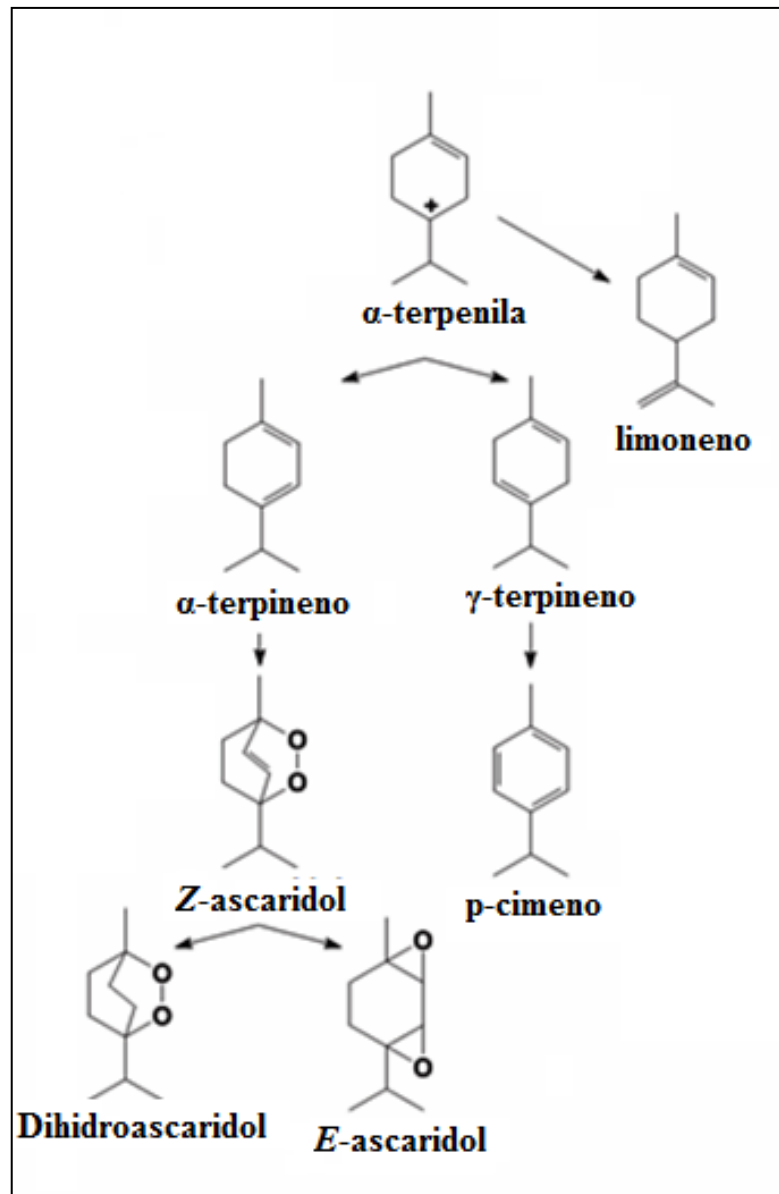
O óleo essencial da espécie é uma mistura de *Z*-ascaridol (58,38%), *p*-cimeno (16,2%),  $\alpha$ -terpineno (9,7%), *E*-ascaridol (4,3%) e limoneno (3,8%). *Z*-ascaridol é um composto



termosensível que se rearranja quando tratado a 150 °C, formando o *E*-ascaridol (CAVALLI et al., 2004).

De acordo com Dembitskya, Shkrobb e Hanusa (2008), a rota metabólica proposta para o ascaridol e outros monoterpenos está demonstrada na figura 2.

Figura 2 - Mecanismo envolvendo a formação do ascaridol e outros monoterpenos no gênero *Chenopodium*



Fonte: DEMBITSKYA; SHKROBB; HANUSA, 2008.

O monoterpeno ascaridol foi inicialmente isolado por um farmacêutico alemão em 1895 (DEMBITSKYA; SHKROBB; HANUSA, 2008). Os pesquisadores Smillie e Pessoa,

em 1924, foram os primeiros a comprovarem que as propriedades anti-helmínticas de *C. ambrosioides* L. atribuem-se ao ascaridol, constituindo teor acima de 50% do óleo essencial. Esse monoterpene é também um potente inibidor *in vitro* do desenvolvimento de *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* (MACDONALD et al., 2004). Não são muitas as espécies vegetais que tem a capacidade de produzir o ascaridol. Além de *C. ambrosioides* L., esse terpenóide é encontrado no óleo essencial de *Peumus boldus*, *Croton regelianus* e *Artemisia molinieri* (SÁ; SOARES; RANDAU, 2015).

No início dos anos 1900, folhas de *C. ambrosioides* L. foram hidrodestiladas para produzir óleo de quenopódio, também conhecido como óleo de Batimore. Foi um dos melhores anti-helmínticos utilizados para tratar ascarídeos e ancilostomídeos em humanos e animais. Após relatos de envenenamento e mortes em seres humanos, provavelmente decorrentes de overdoses, seu uso foi descontinuado e resultou em declínio comercial desse óleo (DEMBITSKYA; SHKROBB; HANUSA, 2008; MACDONALD et al., 2004).

De acordo com Costa e Tavares (2006), *C. ambrosioides* L. foi retirada da Farmacopeia Brasileira devido a essa toxicidade que pode causar convulsões, irritação de mucosas, vômitos, vertigens, dores de cabeça, problemas renais e hepáticos e surdez temporária. Por outro lado, *C. ambrosioides* L., na América Central, é utilizada tradicional por meio da infusão de suas folhas e, segundo observações de MacDonald et al. (2004), essa forma de preparo, tomadas nas doses recomendadas, não produzem intoxicação aguda ou fatalidades em seres humanos, sendo mais segura do que o óleo de Batimore.

## 2.2- Micropropagação

A micropropagação representa uma alternativa viável para a rápida propagação de grande quantidade de clones em um espaço pequeno, além da conservação de germoplasma. Plantas aromáticas são geralmente coletadas nos seus habitats naturais o que agride o meio ambiente, podendo causar a extinção de espécies (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006).

As técnicas de cultura *in vitro*, também são válidas para a produção de compostos, naturalmente presentes, em plantas aromáticas. A necessidade de drogas seguras sem efeitos colaterais implica no uso de ingredientes naturais com segurança comprovada. Estudos em biologia molecular por meio da cultura de tecidos demonstraram a ênfase no uso de métodos biotecnológicos para aumentar a produção de fármacos e aditivos alimentícios, ambos em

qualidade e quantidade (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006; PISTELLI; NOCCIOLI; D'ANGIOLILLO, 2013; RAO; RAVISHANKAR, 2002).

De acordo com Morais et al. (2012), a micropropagação 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. Ainda segundo esses autores, a produção agrícola de plantas medicinais nos padrões farmacêuticos pode ser comprometida pela heterogeneidade dos indivíduos devido à variabilidade genética e bioquímica, e dificuldade de multiplicação.

No cultivo *in vitro* pode-se obter grande quantidade de biomassa vegetal ao utilizar biorreatores e, além disso, aumentar o teor de metabólitos secundários de interesse. Ao comparar a composição do óleo essencial *in vitro* e *in vivo*, Manan et al. (2016) observaram que a quantidade de metil chavicol de *Ocimum basilicum in vitro* (93,71%), superou a quantidade encontrada nas plantas *in vivo* (66, 29%). De acordo com Mendes et al. (2013), a quantidade do monoterpene sabineno foi maior em brotos de *Thymus caespititius* cultivados *in vitro* (40-45%) que em plantas cultivadas *in vivo* (18%).

### 2.3- Nutrição mineral

Os nutrientes minerais são fundamentais para o crescimento das plantas e a produção de óleos essenciais (GARLET; SANTOS, 2008). Os elementos essenciais são definidos como componentes intrínsecos na estrutura ou metabolismo de uma planta ou cuja ausência causa anormalidades graves no crescimento e no desenvolvimento (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

A deficiência de alguns elementos essenciais pode estimular a formação de certas moléculas em detrimento de outras, reforçando o papel exercido pelas condições nutricionais na produção de substâncias pelo metabolismo especial ou secundário (SOUZA et al., 2007)

Os nutrientes na cultura de tecidos são disponibilizados para as plantas pelo meio de cultura. Os meios de cultura são constituídos de diversos compostos tais como, vitaminas, aminoácidos, açúcares, nutrientes e reguladores de crescimento.

Existem diversas formulações elaboradas por pesquisadores para o cultivo *in vitro*. O meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), otimizado para a cultura de calo de tabaco, é o mais empregado na micropropagação.

Basicamente, os meios de cultura diferem entre si pelas concentrações, fontes e essencialidade dos nutrientes minerais. A composição inorgânica dos principais meios de cultura está representada na tabela 1.

Tabela 1- Composição inorgânica dos principais meios de cultura

	<b>WHITE (1954) - W</b>	<b>MURASHIGE e SKOOG (1962) - MS</b>	<b>GAMBOR et al. (1968) - B5</b>	
Macronutrientes (mg.L <sup>-1</sup> )	KNO <sub>3</sub>	80	1900	2500
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	1650	-
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	300	-	-
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	440	150
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	720	370	250
	KCl	65	-	-
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	170	-
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,5	-	150
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	-	-
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	134
Micronutrientes (mg.L <sup>-1</sup> )	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	7	22,3	-
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	10
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3	8,6	2
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5	6,2	3
	KI	0,75	0,83	0,75
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	0,025	0,025
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,25	0,25
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,025	0,025
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	27,8	-
	NaFeEDTA	-	-	28
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	-	37,3	-	
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2,5	-	-	

Fonte: RAMAGE; WILLIAMS, 2002.

O meio de cultura MS caracteriza-se por apresentar concentração iônica total alta; as concentrações de nitrogênio, potássio, zinco e cloro são as mais elevadas quando comparadas com as concentrações correspondentes em outros meios (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995).

Mesocomponentes são os nutrientes requeridos em intermediárias concentrações (WADA et al., 2013). No meio MS esses nutrientes estão presentes no sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), no cloreto de cálcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) e no fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

O fósforo tem função importante na composição do ATP, responsável pelo armazenamento e transporte de energia para processos endergônicos, como a síntese de compostos orgânicos e absorção ativa de nutrientes (MARSCHNER, 2012).

A função mais conhecida do magnésio é a de compor a molécula da clorofila, que são porfirinas magnesianas; o magnésio corresponde a 2,7% do peso das mesmas e representa cerca de 15 a 20% do magnésio total das folhas das plantas. Além desta, outras importantes funções são desempenhadas pelo magnésio, como a ativação enzimática; o magnésio ativa mais enzimas de qualquer outro elemento na planta (FAQUIN, 2005).

O potássio é um dos poucos cátions que não são componentes de estruturas orgânicas. É bastante envolvido na regulação osmótica, na manutenção do equilíbrio eletroquímico em células e seus compartimentos, e na regulação da atividade enzimática (PINTO; FERREIRA, 2015).

O papel do cálcio é participar na síntese da parede celular, divisão e alongação celular, proporcionando rigidez e estrutura às membranas celulares (MARSCHNER, 2012). O Ca desempenha papel importante na morfogênese, por causa da interação com substâncias reguladoras de crescimento e parece haver associação com as citocininas, principalmente nas áreas onde está ocorrendo diferenciação (ARRUDA et al., 2000).

O enxofre tem por função ser grupo ativo de enzimas e coenzimas, sendo também componente de coenzimas (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Esse elemento participa de dois aminoácidos essenciais, a cistina e a metionina, e é componente do acetil-CoA (MARSCHNER, 2012).

As exigências nutricionais em plantas medicinais, aromáticas e condimentares possuem poucos estudos, principalmente sobre quais elementos limitam o crescimento e como os nutrientes afetam a boa produtividade e a produção dos metabólitos secundários (ALVARENGA et al., 2015a; SANTOS et al., 2010).

Os teores de K influenciam na produção de metabólitos secundários. Estudos feitos por Garlet et al. (2007) encontraram maiores teores de óleo essencial em espécies de menta (*M. arvensis* e *M. gracilis* e *M. piperita*) com o aumento da concentração de K na solução nutritiva. Entretanto, a deficiência em K no maracujazeiro doce proporcionou aumento do princípio ativo vitexina (FREITAS; MONNERAT; CURCINO VIEIRA, 2008).

De acordo com Alvarenga et al. (2015a), macro e micronutrientes exercem efeitos significativos no crescimento de *Achillea millefolium*, sendo a ordem dos nutrientes limitantes

Ca = K = N > P > S > Mg, para macronutrientes e Zn > Fe > B > Cu > Mn > Mo, para micronutrientes. Ainda segundo esses autores, a omissão de nutrientes pode ser benéfica, uma vez que aumenta o conteúdo de um ou mais compostos, por exemplo, aumentar o teor de sabineno com omissão de Mg ou cubebeno com a omissão do P. O mesmo pode ser feito com a omissão de Fe, Zn ou Mo para aumentar os teores de cariofileno, composto que tem atividade anti-inflamatória.

## 2.4- LEDs

O termo fotossíntese significa, literalmente, “síntese utilizando a luz”. Os organismos fotossintéticos captam e utilizam a energia solar para oxidar H<sub>2</sub>O, liberando O<sub>2</sub>, e para reduzir CO<sub>2</sub>, produzindo compostos orgânicos, primariamente açúcares. Esta energia estocada nas moléculas orgânicas é utilizada nos processos celulares da planta e serve como fonte de energia para todas as formas de vida (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Em todo o mundo, a lâmpada fluorescente branca, associada ou não com luz natural, tem sido a principal fonte de luz utilizada em salas de cultivo de laboratórios de cultura de tecidos. No entanto, um dos fatores limitantes ao avanço da micropropagação comercial tem sido o custo elevado das mudas, sendo o componente energia elétrica um dos principais. A energia elétrica é utilizada, principalmente, na iluminação e na refrigeração/aquecimento do ambiente de cultivo dos explantes (ROCHA et al., 2010; YEH; CHUNG, 2009).

No início dos anos 60, surgiram os Diodos Emissores de Luz (Light Emitting Diode, LED), que é um dispositivo semicondutor que tem como princípio de funcionamento a eletroluminescência, emitindo luz através da combinação de elétrons e lacunas em um material sólido (PINTO, 2008).

Os LEDs destacam-se das demais fontes de luz por possuírem alta eficiência no processo de geração de luz com baixa produção de calor, pelo longo período de vida, pelo comprimento de onda específico, pela massa e pelo volume pequenos (ROCHA et al., 2010).

Segundo Dutta Gupta e Jatothu (2013), diversos fatores externos e internos regulam o crescimento e o desenvolvimento das plantas *in vitro* e, entre eles, a luz é mais importante. De acordo com Rocha et al. (2010), a qualidade da luz, ou seja, o comprimento de onda específico, a densidade de fluxo de fótons e o fotoperíodo influenciam a morfogênese das plantas cultivadas *in vitro*, assim como na eficiência do processo fotossintético.

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 (ANDRADE et al., 2014; YEH; CHUNG, 2009).

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 (DUTTA GUPTA; JATOTHU, 2013).

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 diferentes composições espectrais de LED no crescimento *in vitro* e na 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.

Alvarenga et al. (2015b) estudaram a qualidade espectral de luz na micropropagação de *Achillea millefolium* e observaram que a massa seca de caules, raízes e total, o número e comprimento de raízes, a sobrevivência e enraizamento foram maiores nas plântulas sob espectro azul. De acordo como esses autores, as proporções de sesquiterpenos foram aumentadas em plantas cultivadas no LED verde e o monoterpene sabineno no LED vermelho.

Silva et al. (2017) submeteram segmentos apicais de *Plectranthus amboinicus* em sala de crescimento sob iluminação proveniente de LEDs (vermelho; azul; 1azul/2,5vermelho; 2,5azul/1vermelho e 1azul/1vermelho) e de lâmpadas fluorescentes. Esses autores observaram que o vermelho monocromático proporcionou o maior comprimento de broto, peso seco e teor de carvacrol.

## 2.5- Elicitores

A comercialização de terpenos é limitada devido ao baixo rendimento de fontes naturais. Muitas plantas medicinais crescem lentamente, são suscetíveis às condições ambientais e estão ameaçadas de extinção. Além disso, o conteúdo de terpenos geralmente apresenta grandes variações, o que não favorece a extração e o controle de qualidade de medicamentos (LU; TANG; LI, 2016).

Ainda de acordo com esses autores, os terpenos são frequentemente metabólitos de defesa naturais contra ataques de patógenos. Elicitores, bióticos e abióticos, podem ser usados para ativar a via do metabolismo secundário e aumentar a produção de terpenos de interesse. Os elicitores bióticos são obtidos de organismos vivos tais como bactérias, vírus e fungos. Os hormônios vegetais (ácido salicílico, jasmonatos, ácido abscísico, etc.) estão envolvidos na resposta aos elicitores e podem ser usados como substitutos dos elicitores bióticos.

Elicitores são substâncias exógenas que induzem uma resposta de defesa no vegetal. Nesse contexto, a quitosana e o ácido salicílico se enquadram entre as substâncias abióticas sinalizadoras, envolvidas principalmente em respostas de defesa sistêmica das plantas por alterar a produção de compostos secundários.

A quitosana é um biopolímero com aplicações em tratamento de águas residuais, papel e celulose, em produtos médicos e cosméticos, biotecnologia, alimentos e rações. Trata-se de um polissacarídeo composto de  $\beta$ -1,4 D-glucosamina ligada a resíduos de N-acetilglucosamina, naturalmente encontrada na parede do micélio de alguns fungos podendo ser obtido por diacetilação da quitina, principal componente do exoesqueleto dos artrópodes e crustáceos (NGE et al., 2006).

Por tratar-se de um polímero natural, o peso molecular de diferentes amostras de quitosana é inconsistente. Muitos valores podem ser obtidos dependendo da procedência da amostra e dos tipos de tratamento que foram empregados na sua obtenção. Para diminuir discrepâncias nas faixas de peso molecular obtidos, classificaram-se as amostras de quitosana segundo a distribuição de peso molecular em: baixo, médio e alto (DEE; RHODE; WACHTER, 2001). Wong (2009) considera as quitosanas como de baixo peso molecular as que apresentarem valores de até 150 KDa, de médio peso molecular de 150 a menos de 700 e de alto peso molecular de 700 a 1000 KDa.



A funcionalidade da quitosana em cultivo *in vitro* de plantas ainda é pouco conhecida (MAIA et al., 2010; SOARES et al., 2014). Entretanto, efeitos positivos de quitosana *in vitro* no crescimento de raízes, rebentos e folhas de plantas ornamentais foram observados (NGE et al., 2006).

Alguns estudos relataram que a quitosana tem potencial para alterar a produção de metabólitos secundários em plantas. Por exemplo: aumentou o teor de aferina A em *Withania somnifera* (GORELICK et al., 2015), escopolamina e hiosciamina em culturas de raízes de *Atropa belladonna* (HASHIMOTO; YUN; YAMADA, 1993) e diosgenina em culturas de raízes de *Trigonella foenum-graecum* (MERKLI; CHRISTEN; KAPETANIDIS, 1997).

No cultivo de *Curcuma longa* L., a aplicação de quitosana estimula a acumulação de curcumina e o crescimento das plantas, dobrando assim a produção de curcumina por planta. Portanto, esse polímero não tóxico, biodegradável, pode ser usado como um composto ecológico para aumentar a produção de curcumina em açafrão (SATHIYABAMA; BERNSTEIN; ANUSUYA, 2016).

De acordo com Deschamps e Simon (2006), o tratamento de *Ocimum basilicum* L. com quitosana não alterou a indução do monoterpene limoneno e a resposta na concentração de outros terpenos foi muito variável em comparação com metil salicilato e metil jasmonato.

O ácido salicílico é um composto fenólico que está envolvido numa série de processos fisiológicos, e tem sido considerado como fazendo parte de nova classe de substâncias de crescimento de plantas, além dos hormônios vegetais (PACHECO et al., 2007).

Nas duas últimas décadas, o ácido salicílico tem recebido muita atenção devido ao envolvimento em mecanismos de defesa de plantas, estresse biótico e abiótico (SAKHANOKHO; KELLEY, 2009). Há pesquisas que demonstram que coronatina, metil jasmonato, ácido salicílico e ácido abscísico são elicitores úteis que podem afetar a biossíntese de paclitaxel e taxanos relacionados (LU; TANG; LI, 2016).

O metil jasmonato e o ácido salicílico têm sido utilizados como elicitores abióticos para a biossíntese de metabólitos secundários, especialmente para induzir o metabolismo do terpeno em *Nigella sativa* (ELYASI et al., 2016). A acumulação de mono e sesquiterpenos e a expressão de enzimas biossintéticas (pirofosfato de isopentenilo e farnesil difosfato sintase) podem ser estimuladas por ácido salicílico em raízes adventícias de *Panax ginseng* (RAHIMI et al. 2014).

Segundo Deschamps e Simon (2006), na elicitação de *Ocimum basilicum* L. com metil salicilato a síntese de terpenos ocorreu em um intervalo de tempo mais curto em comparação com metil jasmonato e quitosana. Por outro lado, o metil jasmonato foi o único elicitor que resultou em aumento no teor de  $\beta$ -cariofileno, 1 8-cineol, linalol e limoneno.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, I. C. A. et al. Effects on growth, essential oil content and composition of the volatile fraction of *Achillea millefolium* L. cultivated in hydroponic systems deficient in macro and microelements. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 329-338, Dec. 2015a.
- 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, Apr. 2015b.
- ANDRADE, A. M. D. 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 Paulo, v. 29, p. 68-79, Março 2014.
- ARRUDA, S. C. C. et al. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 142-154, Nov. 2000.
- 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**, Columbia, v. 52, n. 3, p. 276-282, May. 2016.
- BLANCKAERT, I. et al. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 4, p. 557-573, Apr. 2012.
- CAVALLI, J. F. et al. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, West Sussex, v. 15, n. 5, p. 275-279, Sept./Oct. 2004.
- CLOYD, R. A.; CHIASSON, H. Activity of an essential oil derived from *Chenopodium ambrosioides* on greenhouse insect pests. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 2, p. 459-466, Apr. 2007.
- COSTA, M.; TAVARES, E. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L.(Chenopodiaceae) – erva-de-Santa Maria. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 63-71, Out. 2006.

CYSNE, D. N. et al. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. **Parasitology Research**, Berlin, v. 115, n. 11, p. 4327-4334, Nov. 2016.

DEBNATH, M.; MALIK, C. P.; BISEN, P. S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Dallas-Fort Worth, v. 7, n. 1, p. 33-49, Feb. 2006.

DEE, G. J.; RHODE, O.; WACHTER, R. Chitosan multifunctional marine polymer. **Cosmetics & Toiletries**, v. 116, n. 2, p. 39-42, 2001.

DEMBITSKYA, V.; SHKROBB, I.; HANUSA, L. O. - Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, Olomouc, v. 152, n. 2, p. 209-215, Dec. 2008.

DESCHAMPS, C.; SIMON, J. E. Terpenoid essential oil metabolism in basil (*Ocimum basilicum* L.) following elicitation. **Journal of Essential Oil Research**, Italy, v. 18, n. 6, p. 618-621, Nov./Dec. 2006.

DINIZ, J. D. N. et al. Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1201-1209, Júlio 1999.

SANTOS, R. C. dos et al. Influencia da adubacao NPK no rendimento do óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis*. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, Campo Grande, v. 2, n. 4, p. 316-327, Out./Dez. 2010.

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

ELYASI, R. et al. Spatial modulation and abiotic elicitors responses of the biosynthesis related genes of mono/triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*). **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 240-247, Jan. 2016.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2. ed. Londrina: Editora Planta, 2006

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: Ed. UFLA/FAEPE, 2005.

FREITAS, M. S. M.; MONNERAT, P. H.; CURCINO VIEIRA, I. J. Mineral deficiency in *Passiflora alata* Curtis: Vitexin bioproduction. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, n. 10, p. 1844-1854, 2008.

GARLET, T. M. et al. Crescimento e teor de óleo essencial de mentas com diferentes concentrações de potássio na solução nutritiva. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 230-237, Abril/Junho 2007.

GARLET, T. M. B.; SANTOS, O. S. dos. Nutrient solution and mineral composition of three mint species grown in hydroponic system. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1233-1239, Aug. 2008.

GORELICK, J. et al. Hypoglycemic activity of withanolides and elicited *Withania somnifera*. **Phytochemistry**, Nantes, v. 116, p. 283-289, Aug. 2015.

HASHIMOTO, T.; YUN, D.-J.; YAMADA, Y. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. **Phytochemistry**, Nantes, v. 32, n. 3, p. 713-718, Feb. 1993.

JARAMILLO, B. E.; DUARTE, E.; DELGADO, W. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, La Habana, v. 17, p. 54-64, Mar. 2012.

JARDIM, C. M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, p. 1814-1818, 2010.

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; LUMSDEN, P. J. Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, n. 2, p. 83-109, Jan. 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.; FRANCISCO, J. M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 2008.

LU, X.; TANG, K. X.; LI, P. Plant Metabolic Engineering Strategies for the Production of Pharmaceutical Terpenoids. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, Nov. 2016.

MACDONALD, D. et al. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is (are) not toxic to mammalian smooth muscle. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 92, n. 2, p. 215-221, June 2004.

MAIA, A. J. et al. Efeitos da quitosana no desenvolvimento *in vitro* de videiras cv. merlot e no crescimento micelial do fungo *Elsinoe ampelina*. **Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 1425-1430, Dez. 2010.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Ed. Potafos, 1997.

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**, Columbia, v. 52, n. 3, p. 303-314, June 2016.

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

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3rd. ed. San Diego: Ed. Academic Press, 2012.

MARTINS, G. N.; SILVA, F. D.; JUNIOR, A. A. A. Superação de dormância em sementes de *Chenopodium ambrosioides* L. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 22, p. 205- 209, n. 3, Jul./Dez 2010.

MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M. M. Potencial de controle da erva-de-Santa-Maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 513-516, Set./Out. 2006.

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.

MERKLI, A.; CHRISTEN, P.; KAPETANIDIS, I. Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 9, p. 632-636, June 1997.

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

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

NGE, K. L. et al. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. **Plant Science**, v. 170, n. 6, p. 1185-1190, June 2006.

OLIVEIRA, A. P. D. et al. Prospecção científica e tecnológica de *Chenopodium ambrosioides*, com ênfase nas atividades farmacológicas. **Caderno de prospecção**, Salvador, v. 8, n. 4, p. 828-838, Out./Dez. 2015.

PACHECO, A. et al. Germinação de sementes de camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] e calêndula (*Calendula officinalis* L.) tratadas com ácido salicílico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, p. 61-67, Março 2007.

PEREIRA, W. S. et al. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 127, n. 3, p. 602-605, Feb. 2010.

PINTO, E.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Cation transporters/channels in plants: Tools for nutrient biofortification. **Journal of Plant Physiology**, v. 179, p. 64-82, May 2015.

PINTO, R. A. **Projeto e implementação de lâmpadas para iluminação de interiores empregando diodos emissores de luz (LEDs)**. 2008. 138 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

PISTELLI, L.; NOCCIOLI, C.; D'ANGIOLILLO, F. Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from Tuscany Islands. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 60, n. 1, p. 43-50, Feb. 2013.

RAHIMI, S. et al. Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 61, n. 6, p. 811-817, Nov. 2014.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 38, n. 2, p. 116-124, March 2002.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 20, n. 2, p. 101-53, May 2002.

ROCHA, P. S. G. D. et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1922-1928, Set. 2010.

SÁ, R. D.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.: estado da arte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 267-276, 2015.

SAKHANOKHO, H. F.; KELLEY, R. Y. Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red'). **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 8, n. 8, April 2009.

SATHIYABAMA, M.; BERNSTEIN, N.; ANUSUYA, S. Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 87-94, Oct. 2016.

SILVA, S. T. et al. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, p. 1-10, 2017.

SOARES, T. D. C. et al. Quitosana e fitorreguladores na indução da organogênese direta em cultivar de algodão colorido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, p. 839-843, Agosto 2014.

SOUZA, M. A. A. D. et al. Produção de biomassa e óleo essencial de hortelã em hidroponia em função de nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 41-48, Jan./Mar. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2009.

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**, v. 29, n. 3, p. 315-318, Jan. 2012.

VERISSIMO, L. F. et al. Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, p. 1163-1171, Nov./Dez. 2011.

WADA, S. et al. Mesos components (CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) are critical for improving pear micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 49, n. 3, p. 356-365, April 2013.

WONG, T. W. Chitosan and its use in design of insulin delivery system. **Recent patents on drug delivery & formulation**, v. 3, n. 1, p. 8-25, Jan. 2009.

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

**ARTIGO 1****CRESCIMENTO VEGETATIVO E ANÁLISE QUÍMICA VOLÁTIL DE *Chenopodium ambrosioides* L. EM CULTIVO *IN VITRO* COM MESOCOMPONENTES**

**Alexandre Alves de Carvalho<sup>1</sup>, Suzan Kelly Vilela Bertolucci<sup>1</sup>, Giselly Motta da Silva<sup>1</sup>, Samuel Henrique Braga da Cunha<sup>1</sup>, Heitor Luiz Heiderich Roza<sup>1</sup>, José Eduardo Brasil Pereira Pinto<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Setor de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, CEP 37200-000 Email: alexandre.ufla@yahoo.com.br

Preparado Segundo a Norma NBR 6022:2003



## RESUMO

*Chenopodium ambrosioides* L. é uma espécie medicinal utilizada principalmente como anti-helmíntico no mundo. No Brasil, está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Objetivou-se avaliar parâmetros de crescimento e produção de constituintes voláteis *in vitro* dessa espécie em função de diferentes concentrações de mesocomponentes. No crescimento de segmentos nodais, testaram-se diferentes concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado (0; 185; 370; 740; 1480 mg L<sup>-1</sup>), de cloreto de cálcio dihidratado (0; 220; 440; 880; 1760 mg L<sup>-1</sup>) e de fosfato monopotássico (0; 85; 170; 340; 680 mg L<sup>-1</sup>) do meio MS. De modo geral, os mesocomponentes influenciam o crescimento e o desenvolvimento de segmentos nodais *in vitro* de *C. ambrosioides* L. Os intervalos de concentrações de mesocomponentes no meio MS mais adequadas para a manutenção do crescimento de segmentos nodais *in vitro* de *C. ambrosioides* L. são: 1039 a 1069 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 958 a 1301 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 329 a 397 mg L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. O sulfato de magnésio heptahidratado não é limitante para a síntese *in vitro* de ascaridol. Por outro lado, sua síntese é inibida em concentrações acima de 880 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio dihidratado. Para o cloreto de fosfato monopotássico, o teor máximo de Z-ascaridol é obtido em aproximadamente o dobro da concentração do meio MS básico.

Palavras-chave: Erva-de-santa-maria. Micropropagação. Nutrição mineral. Química volátil.

## ABSTRACT

*Chenopodium ambrosioides* L. is a medicinal species used mainly as anti-helminthic around the world. In Brazil, it is in the National List of Medicinal Plants of Interest to the National Health System (RENISUS). The aim of the present study is to assess this species' growth and volatile constituent parameters *in vitro* based on different meso components concentrations. Different magnesium sulfate heptahydrate (0; 185; 370; 740; 1480 mg L<sup>-1</sup>), calcium chloride dehydrate (0; 220; 440; 880; 1760 mg L<sup>-1</sup>) and monopotassium phosphate (0; 85; 170; 340; 680 mg L<sup>-1</sup>) concentrations in the MS medium were tested in the nodal segments. Overall, meso components influenced the growth and development of *C. ambrosioides* nodal segments *in vitro*. The most adequate meso components intervals on MS medium for the maintenance of *C. ambrosioides* nodal segments *in vitro* are: 1039 to 1069 mg L<sup>-1</sup> of MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 958 to 1301 mg L<sup>-1</sup> of CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O and 329 to 397 mg L<sup>-1</sup> of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Magnesium sulfate heptahydrate is not limiting for the *in vitro* synthesis of ascaridole. On the other hand, its synthesis is inhibited at concentrations above 880 mg L<sup>-1</sup> of calcium chloride dihydrate. For monopotassium phosphate chloride, the maximum *Z*-ascaridole content is obtained at approximately twice the concentration of the basic MS medium.

Keywords: Erva-de-santa-maria. Micropropagation. Mineral nutrition. Volatile chemistry.

## 1- INTRODUÇÃO

*Chenopodium ambrosioides* L. é uma erva medicinal, popularmente conhecida como Erva-de-santa-maria, mastruz e epazote (COSTA; TAVARES, 2006). Utilizada como anti-helmíntico, anti-inflamatório, anti-Leishmania, antidiarréico, entre outros usos (CYSNE et al., 2016). A propriedade anti-helmíntica da planta tem sido atribuída à presença do monoterpene ascaridol, sendo poucas as espécies que possuem a capacidade de produzi-lo (SÁ; SOARES; RANDAU, 2015). Seu potencial terapêutico foi reconhecido de tal forma, que o Ministério da Saúde Brasileiro a incluiu na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (VERISSIMO et al., 2011).

Plantas aromáticas são geralmente coletadas nos seus habitats naturais e essa prática agride o meio ambiente, podendo causar a extinção de espécies (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006). Assim, a micropropagação representa uma alternativa viável para a rápida propagação de grande quantidade de clones em um espaço pequeno, além da conservação de germoplasma e da produção de compostos do metabolismo secundário.

De acordo com Wada et al. (2013), para obter sucesso na micropropagação e no armazenamento *in vitro*, a escolha correta do meio de cultura é um dos principais passos para estabelecer um protocolo. Entretanto, o desenvolvimento de um meio apropriado para uma cultura específica é complexo por ser dependente do genótipo e os efeitos da nutrição mineral na morfogênese não são bem compreendidos (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Mesocomponentes são os nutrientes requeridos em intermediárias concentrações (WADA et al., 2013). De acordo com Reed et al. (2013) e Poothong e Reed (2014), os mesocomponentes do meio MS são insuficientes para o bom crescimento e multiplicação de várias espécies de frutíferas.

A maioria dos estudos sobre nutrição mineral de plantas tem sido realizada em condição de campo ou de casa de vegetação. Existem poucas informações com relação à nutrição *in vitro* (DINIZ et al., 1999).

Estudos preliminares indicaram que a redução da concentração de sais do meio MS favoreceu o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de *C. ambrosioides* L. Por outro lado, não há na literatura publicações científicas que contemplem a influência dos mesocomponentes na micropropagação dessa erva medicinal. Portanto, objetivou-se estudar a

influência de diferentes concentrações de mesocomponentes do meio MS no crescimento e na composição química volátil de *C. ambrosioides* L.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Estabelecimento de segmentos apicais

Plantas adultas da espécie *C. ambrosioides* L., da coleção do Horto de Plantas Medicinais da UFLA, foram utilizadas como fonte de sementes. Exsicata da espécie encontra-se depositada no herbário ESAL do Departamento de Biologia da UFLA, sob o registro 10137.

As sementes foram coletadas e semeadas, com o objetivo de obter plantas matrizes, em bandeja de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. Após 60 dias, as plântulas germinadas foram transplantadas para potes de polietileno com capacidade de 3,6 litros contendo o mesmo substrato e mantidas em casa de vegetação com irrigação.

Após 30 dias, as plantas transplantadas serviram como fonte de segmentos apicais que foram coletados e lavados em água corrente e sabão neutro por 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em uma solução de água sanitária a 40% por 10 minutos, seguido de álcool etílico a 70% por 30 segundos e, finalmente, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Ao concluir a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com a metade da concentração original de seus sais, e 3% de sacarose.

Em todos os experimentos, a autoclavagem do meio de cultura foi realizada a 120 °C e 1 atm, por 20 minutos. Os tubos ou frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de  $25 \pm 2$  °C e irradiância de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; o pH do meio de cultura foi aferido para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem e o meio de cultura foi suplementado com 0,6% de ágar.

A variável altura de plântulas (AL), expressa o tamanho da brotação principal medida de sua base até a gema apical e a avaliação foi realizada com o auxílio de paquímetro digital. As biomassas secas de folha (BSF), de caule (BSC) e de raiz (BSR) foram mensuradas em

balança de precisão, após secagem em estufa de circulação forçada de ar a 35 °C por três dias. A biomassa seca total foi obtida pela soma das biomassas secas de raiz, caule e folha.

## 2.2- Efeito de mesocomponentes no meio de cultura MS

Segmentos nodais de aproximadamente 2 cm de comprimento obtidas das plântulas estabelecidas no item 2.1 foram inoculados verticalmente contendo 35 mL de meio de cultura, conforme descrito abaixo para os três ensaios com mesocomponentes. Para cada experimento, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições e a unidade experimental foi representada por um frasco contendo quatro segmentos por repetição. Após 40 dias, foram avaliadas as variáveis altura de plântula (AL) e as biomassas secas de folha (BSF), de caule (BSC), de raiz (BSR) e a total (BST).

### 2.2.1 Sulfato de magnésio heptahidratado

O meio de cultura MS básico com a metade da concentração de sais foi utilizado nos experimentos. No preparo da solução estoque E, não foi inserido o  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  com os demais sais ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Para esse mesocomponente, preparou-se uma solução estoque isolada na concentração de  $14800 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . e, em seguida, foi adicionada ao meio de cultura nas concentrações finais 0; 185; 370; 740;  $1480 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

### 2.2.2 Cloreto de cálcio dihidratado

A solução estoque D foi preparada na concentração de  $8800 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , conforme recomendado por Murashige e Skoog (1962). Dessa solução, cinco concentrações de cloreto de cálcio dihidratado (0; 220; 440; 880;  $1760 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) foram inseridas ao meio MS.

### 2.2.3 Fosfato monopotássico

A solução estoque B ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KI,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) foi preparada sem a adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . De uma solução estoque separada de fosfato monopotássico, na concentração de  $34000 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , foram avaliadas as concentrações finais 0; 85; 170; 340;  $680 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  adicionadas ao meio de cultura.

### 2.3- Análise estatística

As análises foram feitas utilizando-se o software R e o pacote estatístico *ExpDes* (FERREIRA; CAVALCATI; NOGUEIRA, 2011), conforme R Development Core Team (2012). Para os tratamentos cujas médias apresentaram diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade, foi empregado análise de regressão.

### 2.4- Análise química por *headspace*-CG/EM de *Chenopodium ambrosioides* L.

Amostras de folhas de *C. ambrosioides* L. dos experimentos de mesocomponentes foram coletadas de plântulas aos 40 dias de cultivo *in vitro*. O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 35 °C e 60 mg de folhas secas foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 ml, vedados com septo de silicone/PTFE.

Para extração da fração volátil de *C. ambrosioides* L. empregou-se a técnica de *headspace* estático, utilizando-se um extrator/amostrador *headspace* automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. As condições operacionais foram: temperatura de incubação da amostra de 110 °C durante 30 min, temperatura de seringa a 120 °C e, 500 µL da fase de vapor foram injetados no sistema cromatográfico.

As análises químicas foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent®7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent®MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (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 a linha de transferência para o MS foram mantidas em 220 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 40 °C, isotérmico por 1 min, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 200 °C e, finalizado com uma rampa de 10 °C/min até 250 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As concentrações dos constituintes presentes foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os constituintes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literatura (ADAMS, 2007).

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

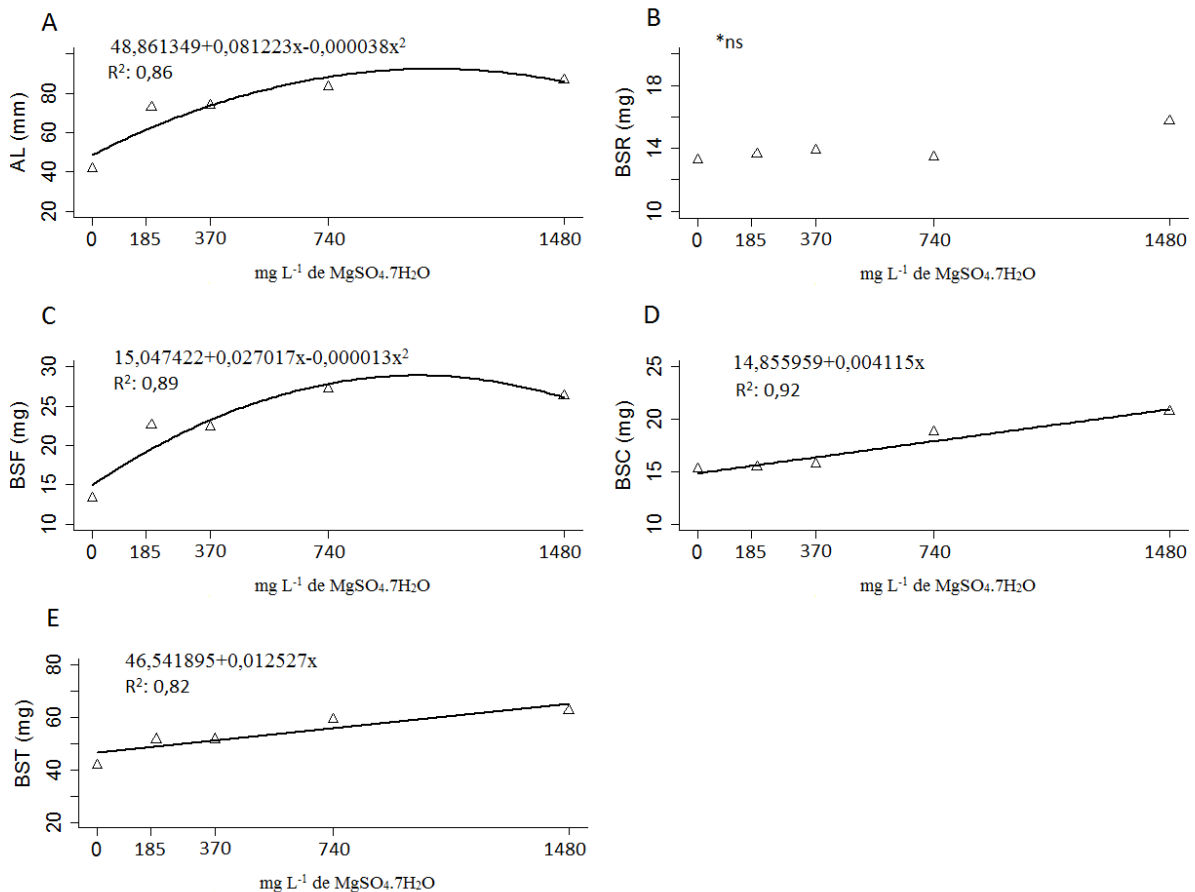
#### 3.1- Efeito de diferentes concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado do meio MS no crescimento de segmentos nodais e na química volátil de *Chenopodium ambrosioides* L.

O meio MS tem, na sua composição original, 370 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio heptahidratado. Os segmentos nodais foram inoculados em diferentes concentrações (0; 185; 370; 740; 1480 mg L<sup>-1</sup>) desse mesocomponente (Figura 1). As variáveis de crescimento do explante - altura, biomassa seca de folha, de caule e total - apresentaram diferenças significativas (Figura 2).

Figura 1- Plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado do meio MS. UFLA, Lavras, 2017



Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado do meio MS na: A- altura de plântulas (AL), B- biomassa seca de raízes (BSR), C- biomassa seca de folhas (BSF), D- biomassa seca de caules (BSC) e E- biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro*. UFLA, Lavras, 2017. \*<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F



Todas as variáveis analisadas, exceto BSR, apresentaram melhores respostas em concentrações de magnésio heptahidratado superiores da recomendada pelo meio MS (370 mg L<sup>-1</sup>). A maior altura estimada foi de 92 mm para a concentração de 1069 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Em relação às biomassas secas, foram aferidos 29; 21 e 65 mg nas concentrações de 1039; 1480 e 1480 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O para folha, caule e total, respectivamente. As médias de biomassa seca de raiz são estatisticamente semelhantes.

O sulfato de magnésio heptahidratado disponibiliza no meio de cultura os macronutrientes enxofre e magnésio. Ressalta-se ainda, por ser esse composto a única fonte de magnésio no meio MS para o crescimento e o desenvolvimento do vegetal *in vitro*.

O magnésio é considerado o maior ativador de enzimas, especialmente daquelas associadas ao metabolismo energético das plantas (PAULA et al., 2015). O Mg<sup>2+</sup> é o cátion



divalente livre mais abundante no citosol das plantas e é o átomo central da molécula de clorofila (SHAUL, 2002).

Baixas concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado adicionados ao meio de cultivo resultaram em plântulas com altura e biomassas secas menores. A altura de 41 mm foi verificada no tratamento 0 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Essa altura é cerca de 56% menor que àquela observada na concentração de 1069 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (92 mm).

Possivelmente, essa diferença pode ser explicada pela disponibilidade de Mg<sup>2+</sup> na solução nutritiva que reduz ou aumenta a concentração de clorofila e as atividades enzimáticas, refletindo no crescimento do vegetal. De acordo com Shaul (2002), a taxa fotossintética é reduzida significativamente em níveis deficientes de magnésio na planta.

Quanto a disponibilidade, a absorção de magnésio é maior com um aumento na oferta desse nutriente no meio de cultura e com aumento do pH do meio (RAMAGE; WILLIAMS, 2002). Diniz et al. (1999) observaram que do magnésio total extraído pelo explante de bananeira, cerca de 60% foi absorvido nos primeiros 20 dias de cultivo, e houve acentuada redução na absorção nos dias posteriores.

Os resultados do presente estudo indicaram que a concentração de magnésio do meio MS é baixa para a micropropagação de *C. ambrosioides* L. Os pesquisadores Adelberg, Delgado e Tomkins (2010), relataram essa informação para *Hemerocallis*, especialmente no crescimento em meios ricos em sacarose e de alta densidade. Wada et al. (2013) concluíram que concentrações acima de 555 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O promoveram melhoria na qualidade de plântulas de pereira *in vitro*.

Por outro lado, concentrações acima de 1069 mg L<sup>-1</sup> e 1039 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, respectivamente, na altura de plântulas e na biomassa seca de folhas, afetaram-nas negativamente.

Quando os níveis de Mg<sup>2+</sup> na célula são altos, sua vasta troca de prótons com o vacúolo pode prejudicar o pH celular e o balanço de ATP, resultando em danos na estrutura celular e lesões necróticas (SHAUL, 2002). Ainda de acordo com esse autor, o excesso de Mg<sup>2+</sup> nas plantas pode inibir a fotossíntese e o crescimento, particularmente durante a desidratação.

As interações entre o magnésio e outros nutrientes também são conhecidas. De acordo com Paula et al. (2015), a absorção de K é inibida quando a concentração de Mg é elevada.

Isso ocorre devido a natureza das relações K:Mg, pois há inibição competitiva entre esses nutrientes.

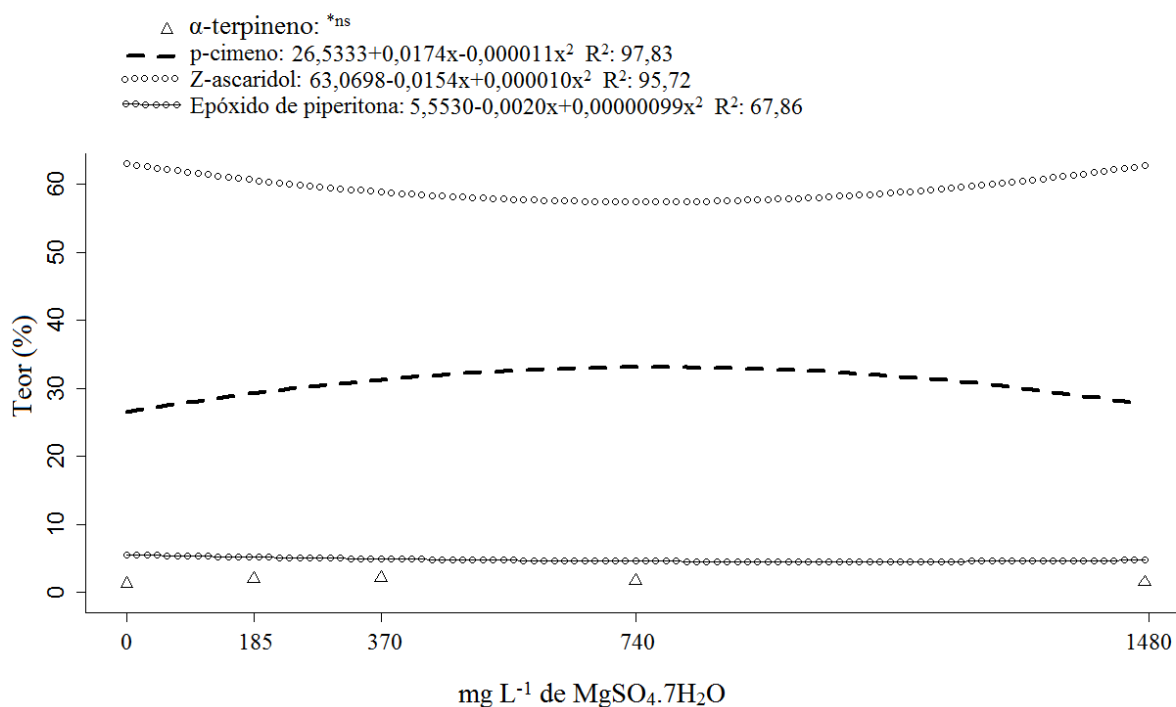
Moreira et al. (2003) observaram, no cultivo de soja, que na presença de altas concentrações de  $Mg^{2+}$ , a absorção de Zn e Mn é prejudicada. De acordo com esses autores, a inibição do  $Mg^{2+}$  sobre a absorção do Zn e do Mn é do tipo não competitiva. O zinco é um elemento muito importante, pois é responsável direto pela síntese do triptofano, um precursor da auxina (ácido indolacético), e indireto pela síntese de proteína (VILLA et al., 2009).

Com base nos dados apresentados a concentração entre 1039 e 1069  $mg L^{-1}$  de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  do meio MS é a mais adequada para a manutenção do crescimento de segmentos nodais de *C. ambrosioides* L.

No que diz respeito à composição química volátil, quatro constituintes representaram cerca de 97% da área relativa total dos picos cromatográficos nas amostras de plântulas cultivadas no meio MS com distintas concentrações de sulfato de magnésio. Os constituintes foram  $\alpha$ -terpineno (2,09%), p-cimeno (32,45%), *Z*-ascaridol (57,41%) e epóxido de piperitona (5,20%), sendo que os teores indicados representam a média dos tratamentos. Cavalli et al. (2004) identificaram cinco constituintes no óleo essencial dessa espécie, caracterizados por *Z*-ascaridol (58,38%), p-cimeno (16,2%),  $\alpha$ -terpineno (9,7%), *E*-ascaridol (4,3%) e limoneno (3,8%).

Comparando a concentração dos compostos voláteis da plântula cultivada em diferentes concentrações de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , houve diferenças significativas entre as áreas relativas dos picos dos constituintes p-cimeno, *Z*-ascaridol e epóxido de piperitona (Figura 3).

Figura 3 - Teor (%) dos principais constituintes voláteis de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sulfato de magnésio heptahidratado do meio MS. UFLA, Lavras, 2017. \*<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F



Crescentes concentrações de sulfato de magnésio não influenciaram significativamente as percentagens de área relativa do  $\alpha$ -terpineno. Os menores teores de Z-ascaridol (57,14%) e epóxido de piperitona (4,54%) foram observados nas concentrações de 770 mg L<sup>-1</sup> e 1010 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, respectivamente. O maior teor do p-cimeno (33,41%) foi verificado em 791 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

Pode-se ainda observar que a diminuição no teor do Z-ascaridol resultou em incrementos no p-cimeno, assim como o oposto. De acordo com Dembitskya, Shkrobb e Hanusa (2008), essa relação ocorreu porque ambos constituintes possuem o mesmo precursor. Verifica-se também nessa correlação, em concentrações extremas (0 e 1480 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) a biossíntese do ascaridol é privilegiada em detrimento do p-cimeno.

Estudos sobre os fatores que afetam a composição volátil de *C. ambrosioides* L. são importantes para a obtenção de plantas com maior acúmulo dos compostos de interesse. A variabilidade no teor dos constituintes majoritários e/ou ativos é uma das principais dificuldades de desenvolver fitoterápicos com reprodutibilidade de ação (SÁ; SOARES; RANDAU, 2015).

### 3.2- Efeito de diferentes concentrações de cloreto de cálcio dihidratado do meio MS no crescimento de segmentos nodais e na química volátil de *Chenopodium ambrosioides* L.

O meio MS tem, na sua composição original, 440 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio dihidratado. Os segmentos nodais foram inoculados diferentes concentrações (0; 220; 440; 880; 1760 mg L<sup>-1</sup>) de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Figura, 4). As variáveis de crescimento do explante - altura, biomassa seca de folha e total - apresentaram diferenças significativas (Figura 5).

Figura 4- Plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de cloreto de cálcio dihidratado do meio MS. UFLA, Lavras, 2017.

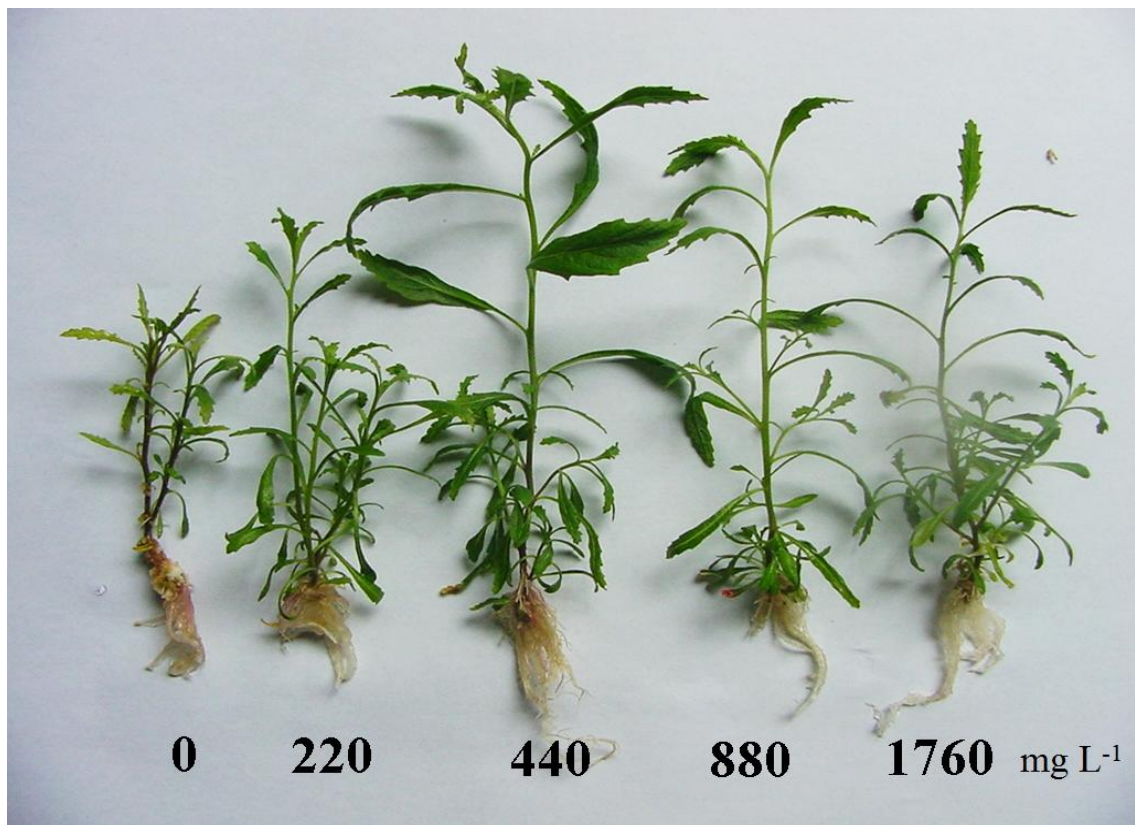
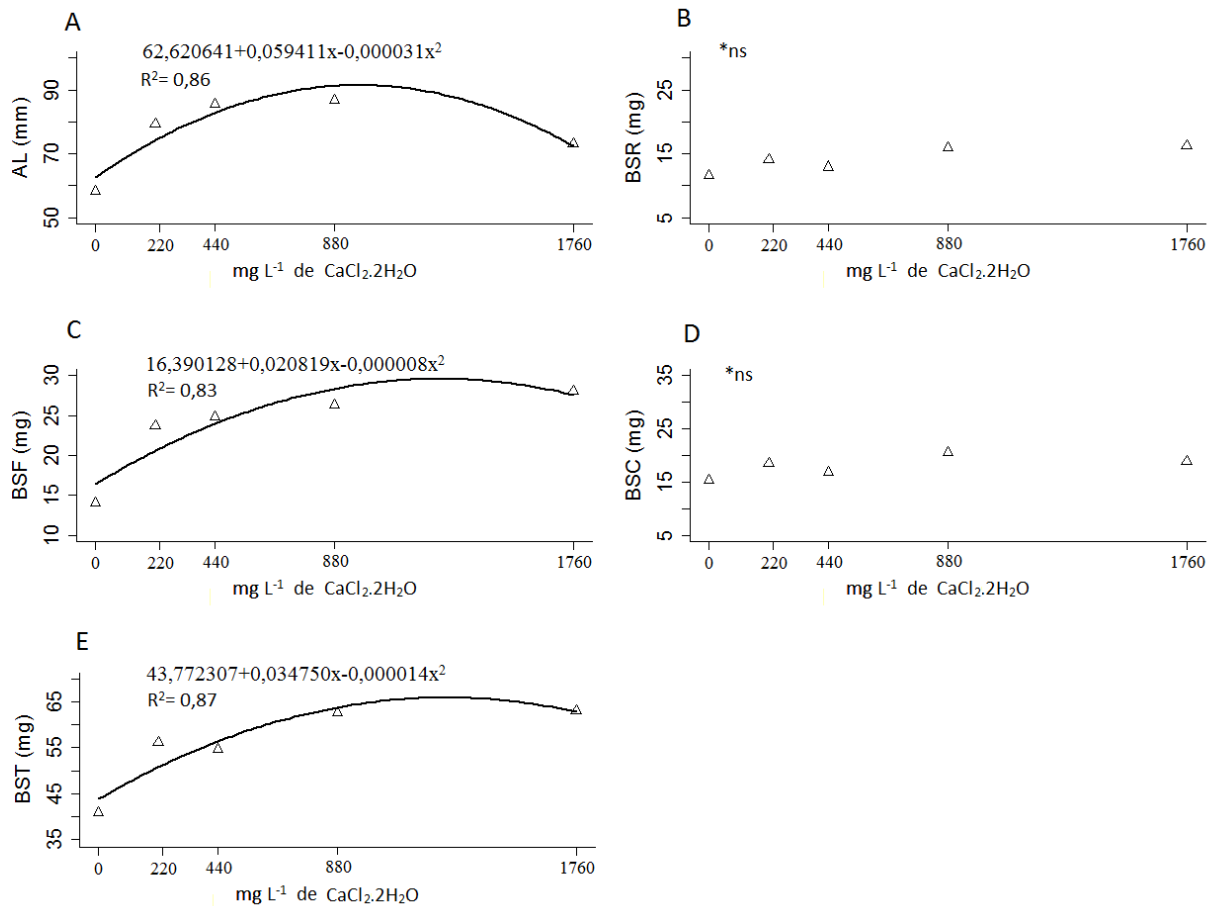


Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações de cloreto de cálcio dihidratado do meio MS na: A- altura de plântulas (AL), B- biomassa seca de raízes (BSR), C- biomassa seca de folhas (BSF), D- biomassa seca de caules (BSC) e E- biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro*. UFLA, Lavras, 2017. \*<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F



Observou-se que as plântulas apresentaram máximo crescimento (91 mm) na concentração de 958 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, após o qual houve redução nos parâmetros avaliados. A maior biomassa seca de folha estimada foi de 30 mg na concentração de 1301 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O. A concentração mais eficiente de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O para o acúmulo de biomassa seca total foi de 1241 mg L<sup>-1</sup> para um ganho de 65 mg, pela análise da curva de regressão. As médias das biomassas secas de caule e de raiz não apresentaram diferenças estatísticas.

O cloreto de cálcio dihidratado, adicionado ao meio MS, é a única fonte que disponibiliza cálcio no meio de cultivo e originalmente, o meio MS possui 440 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.

Jun Takane et al. (1994) observaram superioridade dos explantes de *Gypsophila paniculata* no meio MS, contendo 1760 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> sobre os demais, alcançando em algumas repetições, o dobro do peso sobre os menores. De acordo com Wada et al. (2013), altas concentrações de CaCl<sub>2</sub> foram necessárias para melhorar a qualidade da planta e aumentar comprimento de caule de diversos genótipos de pereira estudados.

O cálcio desempenha papel importante na morfogênese e exerce também função estrutural, por atuar na formação da parede e nos processos de divisão celular (ARRUDA et al., 2000). De acordo com esses autores, na morfogênese há interação com substâncias reguladoras de crescimento, havendo associação com as citocininas.

O Ca é indispensável para as regiões de crescimento (meristemas) onde se processa a divisão mitótica contínua, bem como no desenvolvimento da raiz, atuando nos processos de alongamento celular, desintoxicação dos íons de hidrogênio e divisão celular (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O cálcio apresenta limitações na sua translocação na planta intacta, que, às vezes, são observadas também *in vitro*. Como ele depende da transpiração da planta para seu transporte no xilema, as condições de alta umidade do ar que se estabelecem *in vitro* podem induzir deficiência de cálcio em partes aéreas na micropropagação (SARKAR; PANDEY; CHANEMOUGASOUNDHARAM, 2005).

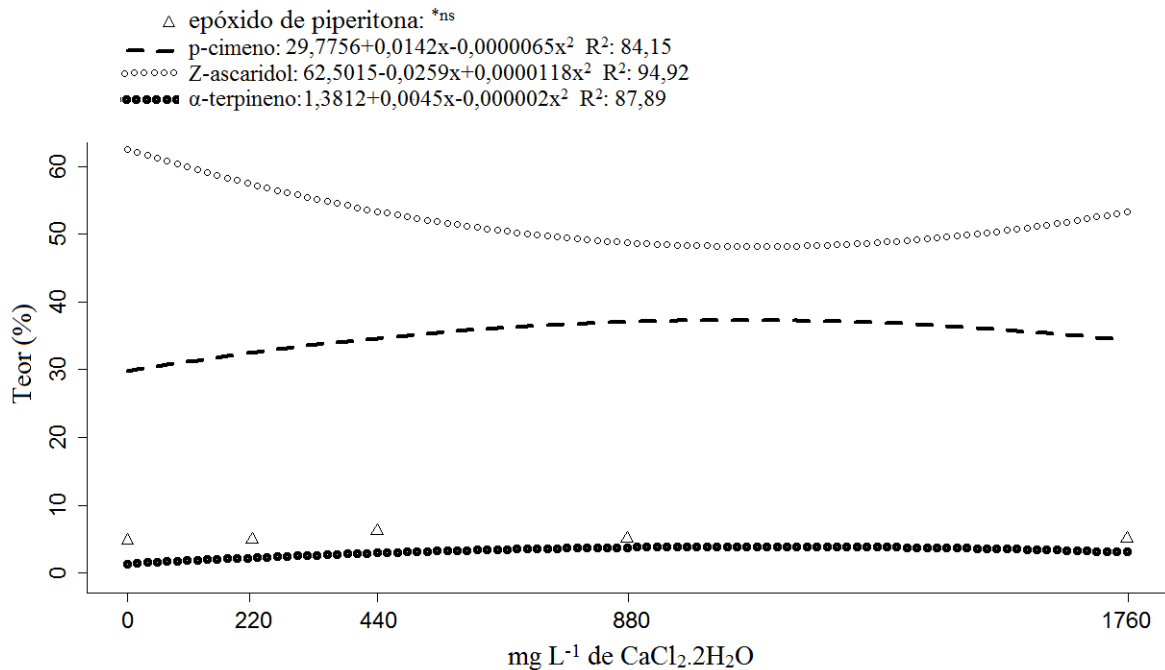
A utilização do Ca pelas plantas *in vitro* pode ser influenciada pelo tipo de tampa do frasco (DINIZ et al., 1999). Esse autor discute a absorção e distribuição do Ca através da planta é dependente do fluxo de massa, e pode ser limitada pela baixa transpiração dos propágulos acondicionados em frascos sob elevada umidade relativa, reduzindo o transporte de íons de baixa mobilidade.

Após atingir a concentração ideal a altura e as biomassas secas de folha e total foram prejudicadas com a provável consequência do excesso de Ca ou pela toxidez do cloro presente no cloreto de cálcio dihidratado. Jun Takane et al. (1994) também observaram esse fenômeno no meio de cultura MS com 3520 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, após o 10º dia de inoculação de explantes de *Gypsophila paniculata*.

Com base nos dados observados a concentração entre 958 a 1301 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O do meio MS é a mais adequada para a manutenção do crescimento de segmentos nodais de *C. ambrosioides* L.

Similarmente, ao observado no experimento com  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , foram observados a presença dos mesmos quatro constituintes voláteis ( $\alpha$ -terpineno, p-cimeno, Z-ascaridol e epóxido de piperitona). Diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  não influenciaram significativamente o teor do epóxido de piperitona. Entretanto, para os demais constituintes identificados houve diferença significativa nas concentrações estudadas (Figura 6).

Figura 6 - Teor (%) dos principais constituintes voláteis de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de cloreto de cálcio dihidratado do meio MS. UFLA, Lavras, 2017. \*<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F



A omissão de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  não inibe a síntese de constituintes voláteis *in vitro*, indicando que concentrações de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  podem ser ajustadas a fim de alcançar o máximo crescimento vegetativo.

Teores entre 48,52 a 48,77% para Z-ascaridol e entre 37,41 a 37,24% para p-cimeno foram observados no intervalo em que o crescimento foi máximo (958 a 1301  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Nesse intervalo foram observados os maiores teores de p-cimeno (37,53%) e  $\alpha$ -terpineno (3,91%) nas concentrações de 1092  $\text{mg L}^{-1}$  e 1125  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente. Por outro lado, a menor concentração de Z-ascaridol (48,28%) foi observada nesse intervalo de concentração de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . O maior teor de Z-ascaridol (62,5%) foi observado na omissão de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .



Assim como em diferentes concentrações de sulfato de magnésio, observa-se a diminuição no teor do Z-ascaridol e o incremento no p-cimeno e  $\alpha$ -terpineno, assim como o oposto. Como já discutido, essa relação ocorreu porque o ascaridol e o p-cimeno possuem o mesmo precursor.

Complementa-se ainda, a correlação existente entre Z-ascaridol e  $\alpha$ -terpineno. A biossíntese do ascaridol a partir do  $\alpha$ -terpineno foi catalisada por uma peroxidase de iodeto solúvel, que foi isolada a partir de homogeneizados das frutas e folhas de *C. ambrosioides* L. (DEMBITSKYA; SHKROBB; HANUSA, 2008).

### 3.3- Efeito de diferentes concentrações de fosfato monopotássico do meio MS no crescimento de segmentos nodais e na química volátil de *Chenopodium ambrosioides* L.

O fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) fornece dois elementos químicos essenciais para o crescimento vegetativo de plântulas *in vitro*, o fósforo e o potássio. O meio MS tem, na sua composição original,  $170 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Os segmentos nodais foram inoculados diferentes concentrações (0; 85; 170; 340;  $680 \text{ mg L}^{-1}$ ) desse mesocomponente (Figura, 7). Todas as variáveis de crescimento do explante avaliadas apresentaram diferenças significativas (Figura 8).

Figura 7 - Plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de fosfato monopotássico do meio MS. UFLA, Lavras, 2017.

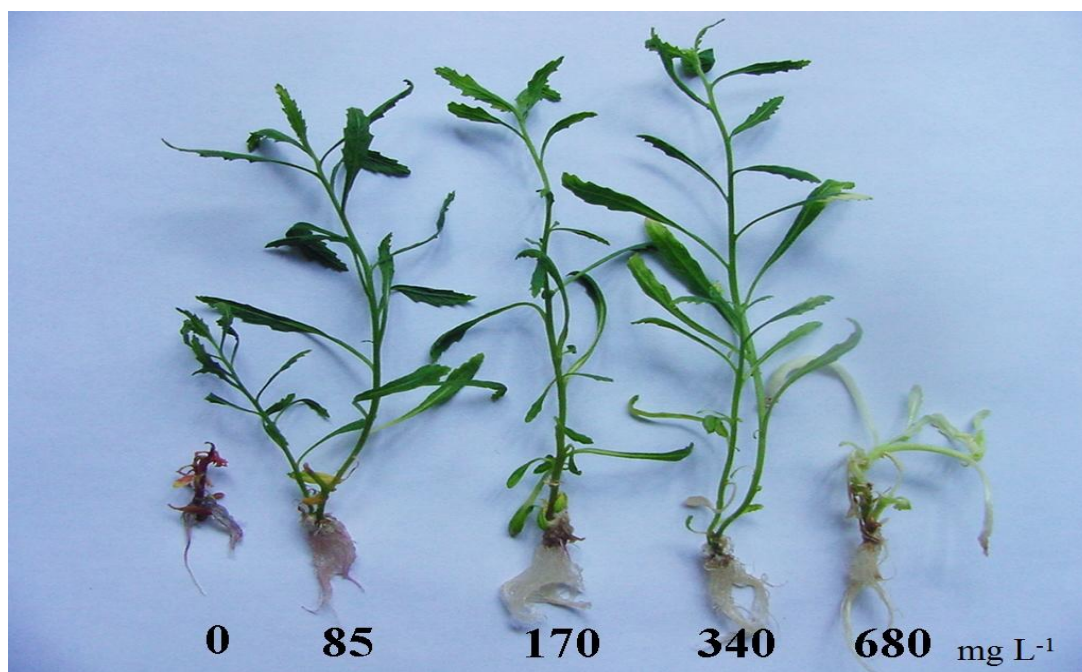
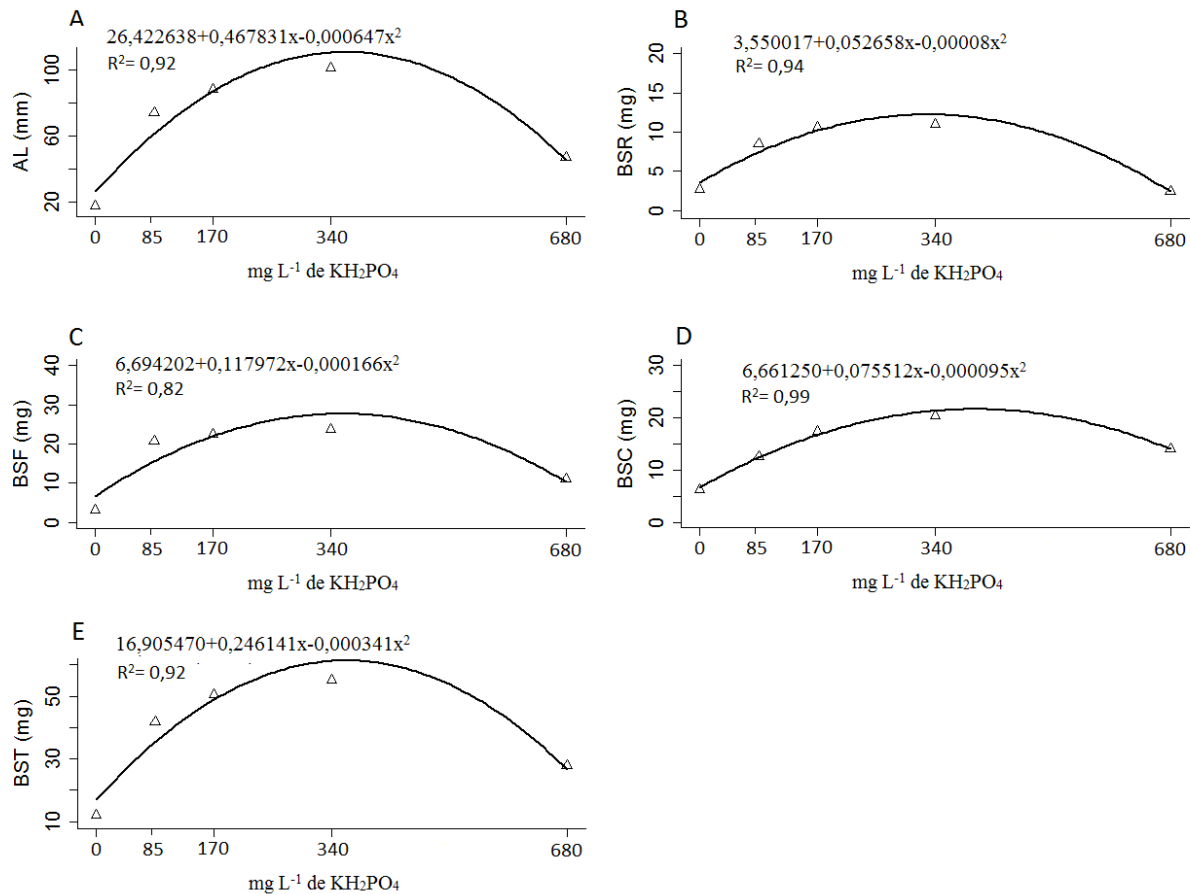




Figura 8 - Efeito de diferentes concentrações de fosfato monopotássico do meio MS na: A- altura de plântulas (AL), B- biomassa seca de folhas (BSF), C- biomassa seca de caules (BSC), D- biomassa seca de raízes (BSR) e E-biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro*. UFLA, Lavras, 2017.



A maior altura estimada foi de 111 mm para a concentração de 361 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Em relação às biomassas secas, foram aferidos 12; 28; 22 e 61 mg nas concentrações de 329; 355; 397 e 361 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para raiz, folha, caule e total, respectivamente.

Vale a pena ressaltar, o tratamento - 0 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - não foi adicionado o fosfato monopotássico na preparação do meio de cultura, entretanto, isso não reflete na omissão total do P e do K nesse meio. De acordo com Ramage e Williams (2002), o ágar contém uma quantidade considerável de minerais contaminantes, por exemplo, ágar Bi-Tek contém 885 mg g<sup>-1</sup> de potássio e 2100 mg g<sup>-1</sup> de fósforo. Essa observação é válida para os demais mesocomponentes.

O fósforo controla diretamente a capacidade de resposta da fotossíntese, desempenha um papel vital na formação de ligações de alta energia e da membrana fosfolipídica, e é um componente integral de várias reações metabólicas e vias de transdução de sinal (PANDEY et al., 2015).

Para todas as variáveis analisadas, concentrações abaixo de 329 mg L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> afetaram-nas negativamente. De acordo com Maathuis (2009), a deficiência de P provoca uma rápida diminuição da taxa fotossintética devido a muitas das etapas intermediárias durante a fixação de carbono envolvendo fosfatos de açúcar. Assim, a demanda de fósforo cloroplasto é alta.

Diniz et al. (1999) observaram que para a micropropagação de bananeira, a maior absorção de P ocorreu nos períodos iniciais de crescimento, chegando a extrair 75% do P do meio de cultivo, aos 30 dias, e a cessar a absorção aos 50 dias, quando ainda permanecia 9% do P no meio. Essa rápida absorção inicial do fósforo também foi relatada por Ramage e Williams (2002) e, de acordo com esses autores, esse fenômeno indica que nos processos iniciais de crescimento da plântula, como o crescimento dos brotos do explante e formação de novos brotos, há demanda de alta quantidade de energia.

De acordo com Pandey et al. (2015), limitações no suprimento de fósforo induz mudanças no metabolismo, na fisiologia e na morfologia das plantas. Esses autores relataram a inibição do crescimento das folhas e das raízes e arquitetura radicular, como exemplo de alterações morfológicas.

Ressalta-se ainda que as membranas celulares são importantes barreiras para conter qualquer tipo de estresse abiótico e a limitação P altera sua composição, por ser o fósforo seu imprescindível componente estrutural (PANDEY et al., 2015).

No presente estudo, concentrações acima de 397 mg L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> também afetaram negativamente as variáveis analisadas. O excesso de adubação potássica pode inibir mais acentuadamente o crescimento das plantas do que a carência de K, o que pode estar associado ao desbalanço catiônico em relação ao cálcio e magnésio, provocado pela absorção de luxo do potássio (PRADO et al., 2004). Ramage e Williams (2002) observaram que um aumento na concentração de 20 para 80 mM de K<sup>+</sup> resultou na supressão da morfogênese em 70% dos explantes de tabaco.

Em relação ao fósforo, Ramage e Williams (2002) observaram que meios de cultura com alta concentração de fosfato apresentaram grande quantidade de precipitados e os

explantes produziram baixo número de brotos. Esses autores discutem que a precipitação de minerais pode ser facilitada pela autoclavagem e que durante a autoclavagem,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  reage com o cálcio para formar complexos minerais insolúveis que são indisponíveis para o crescimento e o desenvolvimento do vegetal.

O potássio é um dos poucos cátions que não são componentes de estruturas orgânicas. É bastante envolvido na regulação osmótica, na manutenção do equilíbrio eletroquímico em células e seus compartimentos, e na regulação da atividade enzimática (PINTO; FERREIRA, 2015).

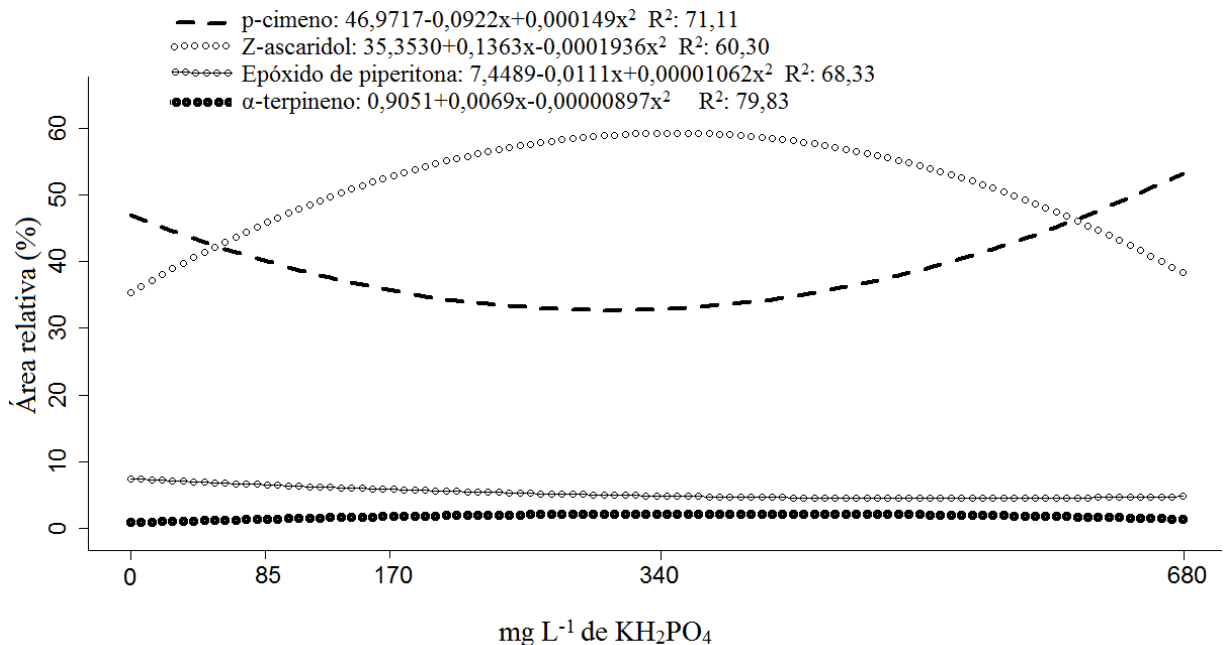
De acordo com Paula et al. (2015), as funções essenciais do K no metabolismo vegetal como fotossíntese, osmorregulação, transpiração, respiração e translocação de fotossintatos não são todas realizadas *in vitro*. A fotossíntese, osmorregulação e transpiração são omitidas na micropropagação devido à baixa intensidade luminosa, baixa difusão de  $\text{CO}_2$  e elevada umidade do ambiente.

Ainda conforme Paula et al. (2015), o comportamento do K em relação ao Ca é de sinergismo. É possível notar que balanços que proporcionam maior absorção de K, também proporcionam maior absorção de Ca.

Com base nos dados apresentados a concentração entre 329 e 397  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  do meio MS é a mais adequada para a manutenção do crescimento de segmentos nodais de *C. ambrosioides* L.

Os constituintes voláteis  $\alpha$ -terpineno, p-cimeno, Z-ascaridol e epóxido de piperitona foram identificados com 97% da área relativa dos picos cromatográficos em plântulas cultivadas em diferentes concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Esse mesocomponente influenciou significativamente as porcentagens de área realtiva de todos os constituintes voláteis identificados (Figura 9).

Figura 9 - Teor (%) dos principais constituintes voláteis de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de fosfato monopotássico do meio MS. UFLA, Lavras, 2017.



Os constituintes químicos p-cimeno (42,55%) e Z-ascaridol (46,17%) corresponderam cerca de 89% da composição química volátil presente nas plântulas de *C. ambrosioides* L. cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . No entanto, houve uma relação inversa entre seus teores, sendo que nas concentrações de 0 e  $680 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  os teores de p-cimeno foram máximos (53,17%) e de Z-ascaridol mínimo (38,51%). O menor teor de p-cimeno (31,84%) foi observado com  $309 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , enquanto o teor máximo de Z-ascaridol (59,34%) foi verificado com  $352 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Os constituintes Z-ascaridol, p-cimeno,  $\alpha$ -terpineno e epóxido de piperitona são monoterpenos (DEMBITSKYA; SHKROBB; HANUSA, 2008). Para a síntese dos monoterpenos são necessárias várias reações de fosforilação, sendo que o principal doador de energia e íon fosfato para a reação é o ATP (MAYRHOFER et al., 2005; RODRIGUES et al., 2004). Conseqüentemente, em plantas deficientes em P haveria menor taxa de fosforilação, diminuindo assim a produção de monoterpenos. No entanto, a ausência de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , única fonte de P do meio básico MS, não foi limitante para a síntese desses monoterpenos *in vitro*.

#### 4- CONCLUSÕES

- Os mesocomponentes influenciam o crescimento e o teor dos principais constituintes voláteis de *C. ambrosioides* L. *in vitro*.
- Os intervalos de concentrações de mesocomponentes no meio MS mais adequadas para a manutenção do crescimento de segmentos nodais *in vitro* de *C. ambrosioides* L. são: 1039 a 1069 mg L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 958 a 1301 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 329 a 397 mg L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- O sulfato de magnésio heptahidratado não é limitante para a síntese *in vitro* de ascaridol. Por outro lado, sua síntese é inibida em concentrações acima de 880 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio dihidratado. Para o cloreto de fosfato monopotássico, o teor máximo de Z-ascaridol é obtido em aproximadamente o dobro da concentração do meio MS básico.

**AGRADECIMENTOS:** FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

#### REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4<sup>th</sup> ed. Illinois: Allured, 2007. 804 p.
- ADELBERG, J. W.; DELGADO, M. P.; TOMKINS, J. T. Spent medium analysis for liquid culture micropropagation of Hemerocallis on Murashige and Skoog medium. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 46, n. 1, p. 95-107, Oct. 2010.
- ARRUDA, S. C. C. et al. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 142-154, Nov. 2000.
- CAVALLI, J. F. et al. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and 13C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, West Sussex, v. 15, n. 5, p. 275-279, Sept./Oct. 2004.
- COSTA, M.; TAVARES, E. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L.(Chenopodiaceae)—erva-de-Santa Maria. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 63-71, Out. 2006.
- CYSNE, D. N. et al. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. **Parasitology Research**, Berlin, v. 115, n. 11, p. 4327-4334, Nov. 2016.

DEBNATH, M.; MALIK, C. P.; BISEN, P. S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Dallas-Fort Worth, v. 7, n. 1, p. 33-49, Feb. 2006.

DEMBITSKYA, V.; SHKROBB, I.; HANUSA, L. O. - Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, Olomouc, v. 152, n. 2, p. 209-215, Dec. 2008.

DINIZ, J. D. N. et al. Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1201-1209, Júlio 1999.

FERREIRA, E. B.; CAVALCATI, P. P.; NOGUEIRA, A. Experimental designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da UFOP**, Ouro Preto, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.

JUN TAKANE, R. et al. Influência do cloreto de cálcio no crescimento de explantes de *Gypsophila paniculata* L. (Caryophyllaceae), cultivados *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, p. 235-239, Maio/Agosto 1994.

MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 250-258, Jun. 2009.

MAYRHOFER, S. et al. Diurnal and Seasonal Variation of Isoprene Biosynthesis-Related Genes in Grey Poplar Leaves. **Plant Physiology**, v. 139, n. 1, p. 474-484, Sept. 2005.

MOREIRA, A. et al. Influência do magnésio na absorção de manganês e zinco por raízes destacadas de soja. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 95-101, Jan. 2003.

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

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. **Topic detection and tracking evaluation**. Disponível em: <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em 15 março 2015.

PANDEY, R. et al. Physiological and molecular alterations in plants exposed to high [CO<sub>2</sub>] under phosphorus stress. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 3-4, p. 303-316, May/Jun. 2015.

PAULA, Y. C. M. et al. Micropropagação de bananeira sob diferentes concentrações de potássio e magnésio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 9, n. 3, p. 43-47, Jun. 2015.

PINTO, E.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Cation transporters/channels in plants: Tools for nutrient biofortification. **Journal of Plant Physiology**, v. 179, p. 64-82, May 2015.

POOTHONG, S.; REED, B. M. Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 132-141, Jan 2014.

PRADO, R. D. M. et al. Aplicação de potássio no estado nutricional e na produção de matéria seca de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, p. 295-299, Ago. 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Software

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 38, n. 2, p. 116-124, March 2002.

REED, B. M. et al. Mineral nutrition influences physiological responses of pear *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 49, n. 6, p. 699-709, Dec 2013.

RODRIGUES, C. R. et al. Nutrição mineral, crescimento e teor de óleo essencial da menta em solução nutritiva sob diferentes concentrações de fósforo e épocas de coleta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 573-578, Jul./Set. 2004.

SÁ, R. D.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.: estado da arte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 267-276, 2015.

SARKAR, D.; K. PANDEY, S.; CHANEMOUGASOUNDHARAM, A. The role of calcium nutrition in potato (*Solanum tuberosum*) microplants in relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, n. 2, p. 221-227, May 2005.

SHAUL, O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. **Biometals**, v. 15, n. 3, p. 309-323, Sep. 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. quarta. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, Jan. 1963.

VERISSIMO, L. F. et al. Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, p. 1163-1171, Nov./Dez. 2011.

VILLA, F. et al. Micropropagação de duas espécies frutíferas, em meio de cultura DSD1, modificado com fontes de boro e zinco. **Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 468-472, Mar./Abr. 2009.

WADA, S. et al. Mesos components (CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) are critical for improving pear micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 49, n. 3, p. 356-365, April 2013.

**ARTIGO 2****PROPAGAÇÃO *IN VITRO* de *Chenopodium ambrosioides* L.: QUALIDADE DE LUZ  
NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS**

**Alexandre Alves de Carvalho<sup>1</sup>, Suzan Kelly Vilela Bertolucci<sup>1</sup>, Diene Xavier Araujo<sup>1</sup>,  
Vytória Piscitelli Cavalcanti<sup>1</sup>, José Eduardo Brasil Pereira Pinto<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Setor de Cultura de Tecidos e Plantas Mediciniais, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, CEP 37200-000 Email: alexandre.ufla@yahoo.com.br

Preparado Segundo a Norma NBR 6022:2003



## RESUMO

*Chenopodium ambrosioides* L. é uma planta medicinal utilizada extensivamente como anti-helmíntico, anti-inflamatório, anti-Leishmania e antidiarréico. Diversos fatores externos e internos regulam o crescimento e o desenvolvimento das plantas *in vitro* e, entre eles, a luz é mais importante. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes espectros de luz no crescimento e na produção de constituintes voláteis *in vitro* de *C. ambrosioides* L., espécie que compõe a lista de interesse em estudos do governo (RENISUS). Segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura e acondicionados por 40 dias em uma sala de crescimento com diferentes diodos emissores de luz (LEDs): azul; vermelho; branco; e em combinações entre azul e vermelho (1:1; 2:1; 1:2); e lâmpada fluorescente branca fria. Alterações na qualidade espectral da luz durante o cultivo *in vitro* de *C. ambrosioides* L. influenciou o crescimento de segmentos nodais. O melhor crescimento de segmentos nodais nos cultivos ocorreu quando os explantes foram mantidos em sala de crescimento com iluminação provenientes de lâmpadas LEDs branco ou em combinação A:V (2:1). LEDs monocromáticos na cor azul inibem a síntese de Z-ascaridol e a luz fluorescente promove maior conversão de  $\alpha$ -terpineno em ascaridol.

Palavras-chave: Espectro de luz. Micropropagação. Ascaridol

## ABSTRACT

*Chenopodium ambrosioides* L. is a medicinal plant extensively used as anthelmintic, anti-inflammatory, anti-Leishmania and antidiarrheal. Several external and internal factors regulate the growth and development of plants *in vitro* and among them light is more important. Therefore, it aimed to evaluate different light qualities which can be influential in growth and volatile compounds production *in vitro* for *C. ambrosioides* L., plant present in the RENISUS list for medicinal plants with high interest in research and use. Nodal segments were inoculated in culture medium and conditioned for 40 days in a growth room with different diodes emitting light (LEDs): blue; red; white; and as combinations blue:red (1:1; 2:1; 1:2); and cool white fluorescent lamp. Changes in the quality of light during cultivation *in vitro* of *C. ambrosioides* L. influences the growth of nodal segments and the best growth of nodal segments in subcultures, the explants must be kept in a growth room with light from white LEDs lamps or combination blue:red (2:1). Blue monochromatic LEDs inhibit the synthesis of *Z*-ascaridole and fluorescent light promotes greater conversion of  $\alpha$ -terpinene to ascaridole.

Keywords: Light spectrum. Micropropagation. Ascaridole.

## 1- INTRODUÇÃO

*Chenopodium ambrosioides* L. é um espécie medicinal, popularmente conhecida por Erva-de-santa-maria, mastruz e epazote. Uma das espécies mais utilizadas no tratamento de verminoses no mundo. No Brasil, encontra-se listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), entre as 71 espécies ou gêneros de interesse do Governo Federal (COSTA; TAVARES, 2006; VERISSIMO et al., 2011).

A ação anti-helmíntica de *C. ambrosioides* L. atribui-se ao monoterpene ascaridol, constituinte majoritário do óleo essencial. Também é atribuído a esse monoterpene, a inibição do desenvolvimento de *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* (LORENZI; MATOS; FRANCISCO, 2008; MACDONALD et al., 2004; SÁ; SOARES; RANDAU, 2015). Há o potencial no uso agrônômico para controle de nematóides (MELLO; MACHADO; INOMOTO, 2006), insetos praga e fungos fitopatogênicos (JARAMILLO; DUARTE; DELGADO, 2012).

A micropropagação representa uma alternativa viável para a rápida propagação de grande quantidade de clones em um espaço pequeno, além da conservação de germoplasma. Plantas aromáticas são geralmente coletadas nos seus habitats naturais o que agride o meio ambiente, podendo causar a extinção de espécies (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006).

Segundo Dutta Gupta e Jatothu (2013), diversos fatores externos e internos regulam o crescimento e o desenvolvimento das plantas *in vitro* e, entre eles, a luz é a mais importante. De acordo com Oliveira, Rocha e Scivittaro (2011), a qualidade da luz, ou seja, o comprimento de onda específico, a densidade de fluxo de fótons e o fotoperíodo influenciam a morfogênese das plantas cultivadas *in vitro*, assim como na eficiência do processo fotossintético. A qualidade luminosa afeta fortemente a fotossíntese, a formação de clorofila, prolongamento de caule e raiz, formação de gemas florais e germinação de sementes (LIM e EON, 2013).

Os Diodos Emissores de Luz (Light Emitting Diode, LED) são dispositivos semicondutores que têm como princípio de funcionamento a eletroluminescência. Os LEDs destacam-se das demais fontes de luz por possuírem alta eficiência no processo de geração de luz com baixa produção de calor, pelo longo período de vida, pelo comprimento de onda específico, pela massa e pelo volume pequeno (ROCHA et al., 2010). 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 (DUTTA GUPTA; JATOTHU, 2013).

A irradiação de luz tem efeitos notáveis na célula vegetal, no crescimento de tecido e na biossíntese de metabolitos secundários (NHUT et al., 2015). A síntese e a acumulação de fitoquímicos de uso medicinal podem ser aumentadas usando diferentes espectros luminosos (MANIVANNAN et al., 2015).

Alvarenga et al. (2015) demonstraram que mudanças na qualidade e na quantidade de luz promoveram alterações no número, no conteúdo e no perfil de constituintes voláteis de *Achillea millefolium*. Diferentes qualidades de luz induziram alterações no perfil de óleos essenciais de *Lippia alba*, mudando até mesmo os constituintes majoritários (BATISTA et al., 2016).

Em *Gentiana* spp, gentiopicrina e *swertiamarin* aumentaram com o cultivo sob vermelho distante e azul (TAKAHASHI et al. 2012), as proporções de sesquiterpenos foram aumentadas em *Achillea millefolium* cultivadas no LED verde e o monoterpene sabineno no LED vermelho (ALVARENGA et al. 2015) e em *Plectranthus amboinicus*, o vermelho monocromático proporcionou o maior teor de carvacrol (SILVA et al. 2017).

De acordo com Oliveira, Rocha e Scivittaro (2011), gradativamente, os LEDs tendem a substituir as lâmpadas fluorescentes nas salas de cultivo dos laboratórios de micropropagação, em razão de proporcionarem maior e melhor desenvolvimento de plantas com menor custo.

Assim, objetivou-se, com este trabalho, estudar diferentes qualidades de luz emitidas por LEDs e lâmpadas fluorescentes na micropropagação de *C. ambrosioides* L. e suas relações com os constituintes voláteis presentes nessa espécie.

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais e de Fitoquímica, do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

Plantas adultas da espécie *C. ambrosioides* L., localizadas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA, foram utilizadas como fonte de sementes. Confirmou-se a existência da exsicata depositada no herbário do Departamento de Biologia dessa Instituição, sob o registro

10137. As sementes foram coletadas e semeadas, com o objetivo de obter plantas matrizes, em bandeja de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. Após 60 dias, as plântulas germinadas foram transplantadas para potes de polietileno com capacidade de 3,6 litros contendo o mesmo substrato e mantidas em casa de vegetação com irrigação.

Após 30 dias, as plantas transplantadas serviram como fonte de segmentos apicais que foram coletados e lavados com água corrente e sabão neutro por 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em uma solução de água sanitária a 40% por 10 minutos, seguido de álcool etílico a 70% por 30 segundos e, finalmente, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Ao concluir a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com a metade da concentração original de sais (0,5 MS), e 3% de sacarose. O pH do meio de cultura foi aferido para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem e o meio de cultura foi suplementado 0,6% de ágar. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada a 120 °C e 1 atm, por 20 minutos. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Após a inoculação, os tubos foram tampados e mantidos em sala de crescimento. Essas plântulas estabelecidas serviram como fontes de segmentos nodais.

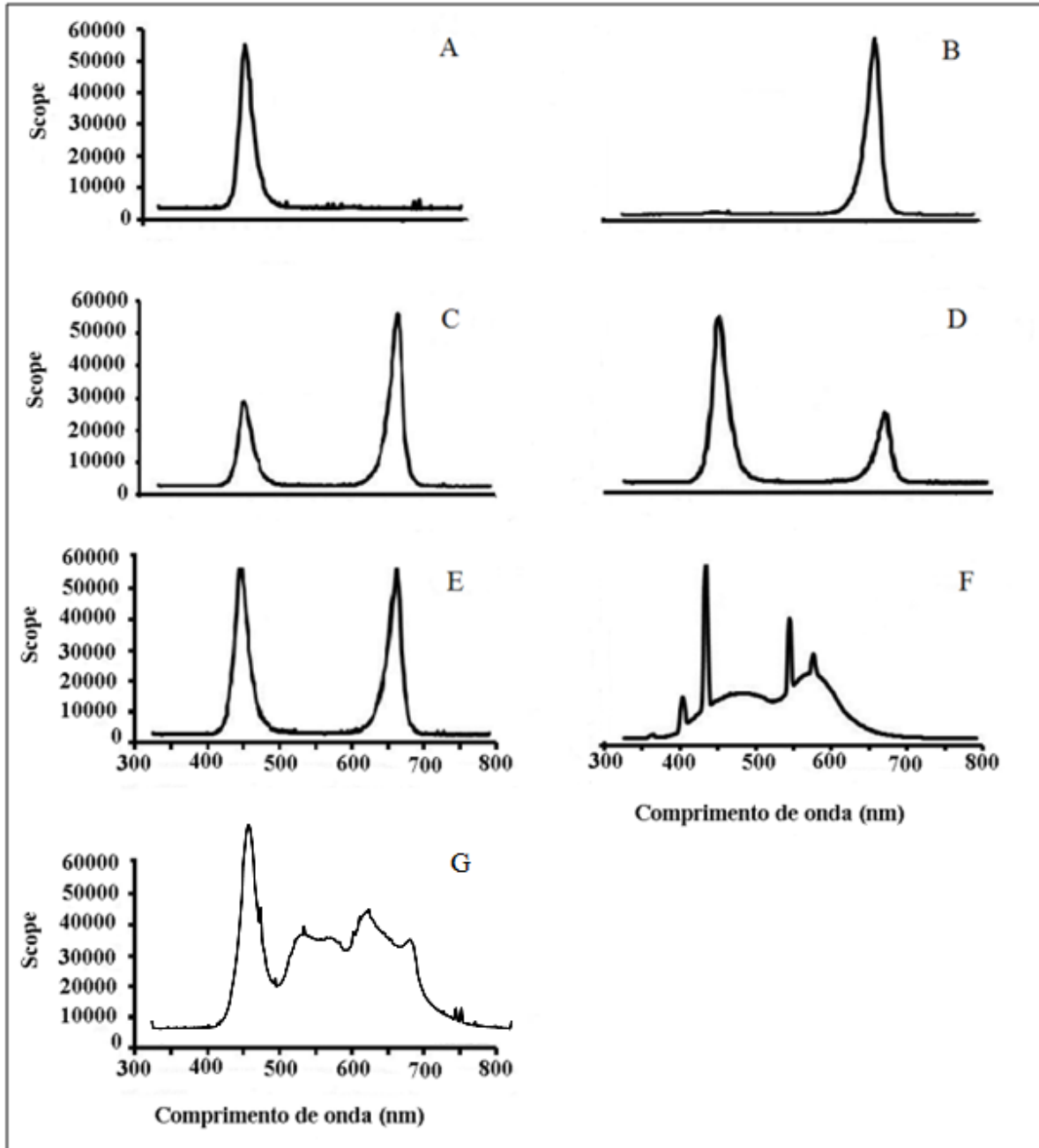
## **2.1- Efeito de diferentes qualidades de luz no crescimento de segmentos nodais**

Segmentos nodais, de aproximadamente 2 cm de comprimento e com 2 gemas axilares, foram inoculados verticalmente em frascos contendo 35 ml de meio de cultura. Procedimentos semelhantes adotados no estabelecimento da planta foram utilizados para elaboração do meio de cultura.

Após o processo de repicagem, os frascos foram acondicionados em sala de crescimento com diferentes diodos emissores de luz (TECNAL<sup>®</sup> Piracicaba, Brasil) com intensidade de  $42 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ : azul; vermelho; branco; e em combinações entre azul e vermelho (1:1; 2:1; 1:2), e lâmpada fluorescente branca fria com irradiância de  $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Osram<sup>®</sup>, Brasil).

Os espectros de luz foram aferidos através do espectrômetro portátil SPECTRA PEN Z850 (Qubit Systems-Kingston, Ontario-USA). Os espectros de absorção no ultravioleta dos LEDs e da lâmpada fluorescente utilizados neste experimento estão representados na Figura 1.

Figura 1 - Perfis espectrais no ultravioleta das fontes de luz utilizadas no experimento. A= azul, B=vermelho, C = azul:vermelho (1:2), D= azul:vermelho (2:1), E=azul:vermelho (1:1), F= fluorescente, G= LED branco.



O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), constituído de cinco repetições e a unidade experimental representada por dois frascos contendo três segmentos por repetição.

Após 40 dias, foram avaliadas as variáveis altura de plântula (AL) e as biomassas secas de folha (BSF), de caule (BSC), de raiz (BSR) e total (BST). Procedeu-se também a análise de pigmentos fotossintéticos e análise dos compostos voláteis das folhas.

A variável altura de plântula (AL), expressa o tamanho da brotação principal medida de sua base até a gema apical e a avaliação foi realizada com o auxílio de paquímetro digital. A biomassa seca de folha (BSF), de caule (BSC) e de raiz (BSR) foram mensuradas em balança de precisão após secagem em estufa de circulação forçada de ar a temperatura constante de 35 °C por três dias.

## 2.2- Análise de pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos analisados foram clorofila *a*, clorofila *b*, relação *b/a*, clorofila total e carotenóides. A extração foi realizada conforme metodologia descrita por LICHTENTHALER (1987).

Sob luz verde, coletaram-se 150 mg de matéria fresca de folhas. Em seguida, em um gral contendo 3 mL de acetona 80% (v/v) e CaCO<sub>3</sub>, estes 150 mg de folhas foram macerados. Posteriormente, com o uso de papel filtro, filtrou-se para um balão volumétrico de 5 ml o extrato completando o volume com acetona 80%. Imediatamente após este procedimento, foi realizada a leitura da absorbância (A) a 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides, respectivamente. A leitura foi efetuada no espectrômetro TECAN INFINITY M200 PRO operado com o sistema de processamento de dados I-control<sup>®</sup> versão 3.37. Para cada tratamento, foram analisadas folhas de 3 plântulas, e as leituras foram realizadas em triplicata.

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

### 2.3- Análise química por *headspace*-CG/EM de *Chenopodium ambrosioides* L.

Amostras de folhas de *C. ambrosioides* L. dos experimentos de qualidade espectral de luz foram coletadas de plântulas aos 40 dias de cultivo *in vitro*. O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 35 °C e 60 mg de folhas secas foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 ml, vedados com septo de silicone/PTFE.

Para extração da fração volátil de *C. ambrosioides* L. empregou-se a técnica de *headspace* estático, utilizando-se um extrator/amostrador *headspace* automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. As condições operacionais foram: temperatura de incubação da amostra de 110 °C durante 30 min, temperatura de seringa a 120 °C e, 500 µL da fase de vapor foram injetados no sistema cromatográfico.

As análises químicas foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent®7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent®MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (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 a linha de transferência para o MS foram mantidas em 220 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 40 °C, isotérmico por 1 min, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 200 °C e, finalizado com uma rampa de 10 °C/min até 250 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As concentrações dos constituintes presentes foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os constituintes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literatura (ADAMS, 2007).



## **2.4- Análise estatística**

As análises foram feitas utilizando-se o software R e o pacote estatístico *ExpDes* (FERREIRA; CAVALCATI; NOGUEIRA, 2011), conforme R Development Core Team (2012).

Para os tratamentos cujas médias apresentaram diferença significativa foi empregado o teste de Scott Knott, adotando-se 5% como nível de significância.

## **3- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O crescimento vegetativo e a síntese de constituintes voláteis *in vitro* de plântulas de *C. ambrosioides* L. foram afetados pela qualidade espectral de luz (Tabela 1, Figura 2).

Figura 2- Plântulas micropropagadas de *Chenopodium ambrosioides* L. sob diferentes qualidades espectrais de luz. LEDs: azul, 2A/1V (2azul:1vermelho), 1A/2V (1azul:2vermelho), branco, 1A/1V (1azul:1vermelho), Verm (vermelha). Fluor (fluorescente). UFLA, Lavras, 2017.



As médias analisadas da variável altura de plantas não apresentaram diferenças significativas. Porém, as médias de biomassas secas de caule, folha, raiz e total foram estatisticamente diferentes nos espectros de luz (Tabela 1).

Tabela 1 - Altura de plântula (AL - mm), biomassa seca de caule (BSC - mg), de folha (BSF - mg), de raiz (BSR - mg) e total (BST - mg) de segmentos nodais de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro* em diferentes qualidades de luz.

Tratamento	AL	BSC	BSF	BSR	BST
AZUL	59,09	8,84 b	11,48 c	13,54 b	33,86 c
A:V (2:1)	61,26	16,32 a	21,82 a	23,40 a	61,54 a
VERMELHO	71,17	15,16 a	11,52 c	21,42 a	48,10 b
A:V (1:2)	67,20	16,92 a	19,52 b	23,16 a	59,60 a
BRANCO	69,74	15,24 a	23,16 a	23,74 a	62,14 a
A:V (1:1)	59,01	13,23 a	24,78 a	18,52 b	56,53 a
FLOURESCENTE	61,05	13,66 a	19,74 b	18,31 b	51,71 b
CV (%)	14,11	15,38	14,40	19,15	13,53

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

A espécie *C. ambrosioides* L., cultivada na luz monocromática azul, foi muito prejudicada no acúmulo de biomassa dos órgãos vegetativos. Os menores valores da biomassa seca de caule, folha, raiz e total foram observados com a utilização de LEDs na cor azul. No entanto, Alvarenga et al. (2015) cultivando *in vitro* *Achillea millefolium* reportaram que o espectro monocromático do azul acumulou a maior biomassa seca, portanto, a resposta de crescimento *in vitro* depende muito do genótipo.

Para a biomassa seca de folhas, maiores acúmulos de matéria seca ocorreram nos tratamentos A:V (2:1 e 1:1) e Branco. As combinações A:V (2:1 e 1:1), o monocromático Vermelho e o LED Branco resultaram em maior crescimento para biomassa seca de raiz. A biomassa seca total foi alcançada com a luz branca e em todas as combinações entre vermelho e azul (Tabela 1). A espécie *C. ambrosioides* L. respondeu melhor no acúmulo de biomassa seca, quando há uma combinação de azul e vermelho e na luz branca onde há luz azul e vermelha (Figura 1), do que nas luzes monocromáticas e fluorescentes (Tabela 1).

De acordo com Nhut et al. (2015), o efeito da luz no vegetal ocorre principalmente para fornecer energia necessária e para regular o crescimento, a diferenciação e o metabolismo. Estudos recentes têm mostrado como diferentes partes da região visível de radiação eletromagnética afetam várias vias metabólicas em plantas (ALVARENGA et al., 2015; BATISTA et al., 2016).

A altura de plântulas foi estatisticamente semelhante. No entanto, observou-se que o vermelho monocromático resultou em maior valor absoluto de 71,17 mm. Já, o acúmulo de matéria seca de folhas e, conseqüentemente, a biomassa seca total foram menos afetados nesse espectro luminoso. Esse fato pode ser explicado pelos sintomas visuais de clorose,

internódios mais longos e abscisão foliar observados somente em plântulas submetidas a esse tratamento (Figura 2).

Takahashi et al. (2012) avaliaram o efeito diferentes composições espectrais de LED no crescimento *in vitro* de *Gentiana* spp. De acordo com esses autores, a luz vermelha aumentou o comprimento de internódios e o número de folhas, sugerindo melhoria no crescimento dessa erva medicinal. Para a espécie *C. ambrosioides* L. esta melhoria não foi observada.

A melhoria do crescimento das plântulas causada pelo vermelho pode estar relacionada à maior sensibilidade do fitocromo sob este espectro. Os picos de absorbância do fitocromo estão em sua maioria no vermelho (600 a 700 nm), vermelho distante (700 a 800 nm) e em menor quantidade no azul (400 a 500 nm). Os criptocromos absorvem a luz azul (RUNKLE; HEINS, 2001). O fitocromo atua ativando enzimas como, por exemplo, as associadas à síntese de auxinas que é um hormônio que proporciona o crescimento. Desta forma, a produção deste hormônio é mantida em plantas cultivadas sob espectro de luz vermelho e degradada em plantas cultivadas sob luz azul (MARKS; SIMPSON, 1999).

Vale à pena ressaltar ainda que em todos os tratamentos, com exceção do azul monocromático, houve a incidência de comprimento de onda na região do vermelho mesmo que em menor proporção (Figura 1). Verificou-se, portanto, ao analisar as variáveis de crescimento, que *C. ambrosioides* L. exige a presença desses espectros de luz, indicando possível envolvimento do fitocromo nos processos relacionados a seu desenvolvimento.

De acordo com Topchiy et al. (2005), diferenças na qualidade da radiação espectral influenciaram a composição de proteínas pigmentadas, que é uma importante característica para o funcionamento dos aparelho fotossintético. As médias de clorofila *a*, *b*, total, carotenóides e relação *b* e *a* apresentaram diferenças estatísticas para todos os tratamentos estudados (Tabela 2).

Tabela 2 - Clorofila *a* (mg g<sup>-1</sup>), clorofila *b* (mg g<sup>-1</sup>), relação clorofila *b* e *a* (mg g<sup>-1</sup>), clorofila total (mg g<sup>-1</sup>) e carotenóides (mg g<sup>-1</sup>) de segmentos nodais de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro* em diferentes qualidades de luz.

Tratamento	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	<i>b/a</i>	Clorofila total	Carotenóide
AZUL	0,93 b	0,90 b	0,93 b	1,83 c	0,60 b
A:V (2:1)	2,10 a	0,98 b	0,46 d	3,10 a	1,13 a
VERMELHO	1,02 b	1,14 a	1,23 a	2,15 c	0,79 b
A:V (1:2)	1,13 b	0,72 c	0,62 c	1,83 c	0,69 b
BRANCO	1,17 b	0,57 d	0,48 d	1,73 c	0,62 b
A:V (1:1)	1,30 b	0,52 d	0,39 d	1,78 c	0,53 b
FLUORESCENTE	1,97 a	0,70 c	0,36 d	2,68 b	0,63 b
CV (%)	16,61	15,07	22,44	14,32	21,08

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

A utilização de lâmpadas fluorescentes e a combinação A:V (2:1) resultaram em maior conteúdo de clorofila *a* (Tabela 2). A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar o primeiro estágio do processo fotossintético (fotoquímica), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (STREIT et al., 2005).

Maiores médias para clorofila *b* e para a relação *b/a* foram observadas no vermelho monocromático (Tabela 2). De acordo com Streit et al. (2005), a clorofila *b* é um pigmento acessório sintetizado através da oxidação do grupo metil da clorofila *a* para um grupo aldeído. A luz vermelha desempenha importante função na fotossíntese das plantas, as folhas de plântula são alongadas e o conteúdo de clorofila é reduzido (LIM e EOM, 2013).

Alvarenga et al (2015) observaram que a proporção de clorofila *b/a* é elevado no espectro azul para *Achillea millefolium* L., indicando que o excesso energético resultante do fitocromo excitado está sendo descarregada em clorofila *b*. De acordo com esses autores, o espectro de luz azul foi o melhor para o crescimento *in vitro* de *A. millefolium* L. Para a *C. ambrosioides* L., as luzes monocromáticas não foram as melhores para o crescimento.

De acordo com Manivannan et al. (2015), a luz é um fator primário importante para síntese de clorofila. Tratamentos utilizando LEDs influenciaram muito a síntese de clorofila em *Rehmannia glutinosa*, sendo LEDs vermelhos que proporcionaram maior aumento desse pigmento. Entretanto, ao analisar as variáveis de crescimento, esses autores sugeriram a utilização de LEDs azuis para melhor produção *in vitro* dessa erva.

O LED azul monocromático foi que mais influenciou negativamente o crescimento das plântulas (Tabela 1). Segundo Lim e Eon (2013), a exposição por mais que duas semanas a esse espectro, pode afetar negativamente o crescimento de brotos de estacas de plantas que apresentam morfologia foliar similar a de *Ocimum basilicum*. Os autores verificaram que nesta situação, o LED azul degradou a clorofila total da espécie. Fenômeno similar pode ter ocorrido com *C. ambrosioides* L. (Tabela 2). A diminuição de pigmentos fotossintéticos está relacionada à redução na fotossíntese foliar e, conseqüentemente, baixo desempenho fotossintético (BATISTA et al., 2016).

De modo geral, para *C. ambrosioides* L. o LED branco e a combinação A:V (2:1) resultaram maiores médias para todas as variáveis significativas de crescimento (Tabela 1). Observa-se ainda, maiores médias de clorofila *a*, clorofila total e carotenóides para essa combinação de LEDs azuis e vermelhos (Tabela 2).

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 quimiotipos da espécie *Lippia alba* cultivada *in vitro*.

A menor eficiência na multiplicação e no crescimento de brotações sob lâmpadas fluorescentes brancas decorre, provavelmente, do fato de essas emitirem diferentes comprimentos de onda entre 350 nm e 750 nm, sendo somente aqueles compreendidos entre 400 nm e 700 nm os mais importantes para a fotossíntese. Uma ampla gama de comprimentos de onda parece ser desnecessária por ser de baixa qualidade para a promoção do crescimento de plantas, além do mais, o sistema consome mais energia elétrica pela geração de calor e por isso os cultivos não devem ser colocados perto da fonte de luz, pois podem sofrer de foto-estresse (DUTTA GUPTA; JATOTHU, 2013).

As massas e níveis de pigmentos fotossintéticos mais elevados em plantas submetidas à combinação de LEDs azuis e vermelhos devem-se ao maior aproveitamento da luz na região do espectro visível. Maiores taxas fotossintéticas podem ser conseguida quando uma folha é iluminada com luz na região vermelha e na região do azul (BATISTA et al., 2016).

De acordo com Streit et al. (2005), as clorofilas tendem a ser foto-oxidadas sob alta irradiação e os carotenóides podem prevenir essa perda. Portanto, maiores teores de carotenóides são benéficos para a proteção do aparelho fotossintético e, conseqüentemente, para o crescimento da planta.

A irradiação de luz tem efeitos notáveis na célula vegetal, no crescimento de tecido e na biossíntese de metabolitos secundários (NHUT et al., 2015). O conhecimento da relação entre a qualidade da luz e a composição fitoquímica fornece uma base para novos estudos a nível genético que pode elucidar como essa regulação ocorre, permitindo assim a produção de compostos de interesse (BATISTA et al., 2016).

Assim, como para o acúmulo de biomassa, a luz monocromática azul afetou negativamente o teor de Z-ascaridol, constituinte químico responsável pela atividade anti-helmíntica de *C. ambrosioides* L. Também nos tratamentos com maiores proporções de luz azul - monocromática e A:V (2:1) - houve menores teores de epóxido de piperitona. Por outro lado, esta fonte artificial de luz induziu aumento nos teores de  $\alpha$ -terpineno e p-cimeno (Tabela 3).

Tabela 3 - Teor porcentual dos picos cromatográficos dos principais constituintes da química volátil de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes qualidades de luz. UFLA, Lavras, 2017.

Tratamento	$\alpha$ -terpineno	p-cimeno	Z-ascaridol	Epóxido de piperitona
AZUL	4,83 a	37,08 a	53,21 b	4,50 c
A:V (2:1)	2,46 b	26,96 b	65,84 a	4,53 c
VERMELHO	1,49 b	24,15 c	66,99 a	6,67 a
A:V (1:2)	1,89 b	24,88 c	67,73 a	5,03 b
BRANCA LED	2,19 b	27,34 b	65,13 a	5,28 b
A:V (1:1)	1,56 b	29,98 b	62,48 a	5,62 b
FLOURESCENTE	1,11 b	28,73 b	63,98 a	6,43 a
CV (%)	36,46	6,84	3,79	7,92

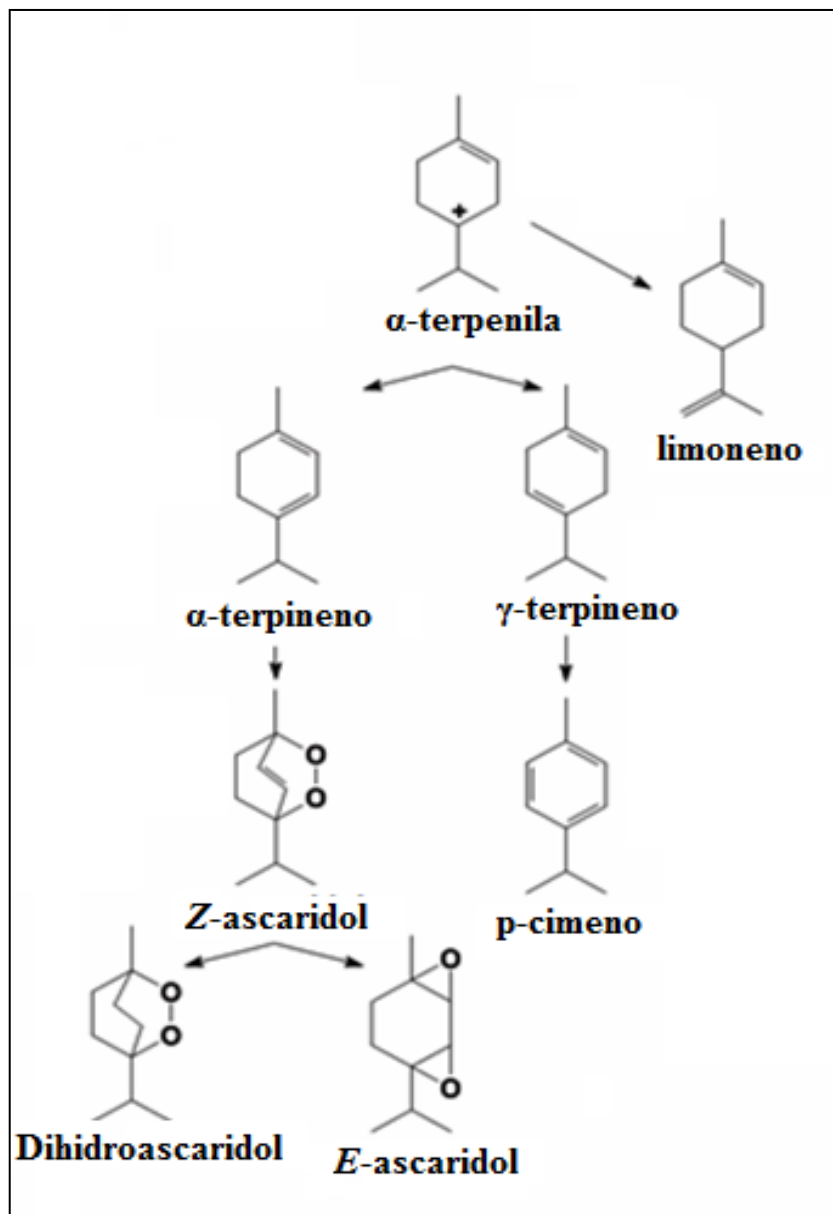
<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

De acordo com Johnson e Croteau (1984), a biossíntese não enzimática do ascaridol requer um processo luminoso que envolve a foto-oxidação do  $\alpha$ -terpineno. A conversão do  $\alpha$ -terpineno em ascaridol na presença de luz também já foi demonstrada em estudos de síntese química empregando técnicas modernas de microfotocímica (SHVYDKIV, 2013). Nota-se que com exceção do tratamento da luz monocromática azul, todas as demais fontes de luz converteram  $\alpha$ -terpineno em Z-ascaridol. Embora não tenha havido diferença estatística entre os tratamentos, a luz fluorescente apresentou o menor valor numérico para o teor de  $\alpha$ -terpineno indicando que essa luz promove maior conversão do  $\alpha$ -terpineno. Shvydkiv (2013) corroboram com o presente estudo, pois também demonstrou em seus estudos fotoquímicos

que a conversão de  $\alpha$ -terpineno foi maior quando usou a irradiação com lâmpada fluorescente quando comparada a conversão constituinte sob LED branca.

Vários autores tem demonstrado que a biossíntese de terpenos sofre regulação dependente de luz (MAYRHOFER et al., 2005). A biossíntese dos monoterpênos ascaridol e p-cimeno tem como precursor comum o cátion terpenila. A conversão do cátion terpenila em  $\alpha$ -terpineno leva a formação do ascaridol e  $\gamma$ -terpineno é convertido em p-cimeno (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo envolvendo a formação do ascaridol e outros monoterpênos no gênero *Chenopodium*.



FONTE: DEMBITSKYA; SHKROBB; HANUSA, 2008.



A conversão do cátion terpenila em  $\alpha$  ou  $\gamma$ -terpineno ocorrem em reações de deslocamento de hidreto para migração da carga na formação desses isômeros (LAFEVER; CROTEAU, 1993). A luz monocromática azul parece favoreceu a reação de deslocamento de hidreto para formação do  $\gamma$ -terpineno, posteriormente convertido a p-cimeno. Enquanto, os demais tratamentos a rota mais favorecida foi para a conversão do cátion terpenila para  $\alpha$ -terpineno e, conseqüentemente, Z-ascaridol.

#### 4- CONCLUSÕES

- Alterações na qualidade de luz durante o cultivo *in vitro* de *Chenopodium ambrosioides* L. influencia o crescimento de segmentos nodais;
- Para o melhor crescimento de segmentos nodais, os explantes devem ser mantidos em sala de crescimento com iluminação provenientes de lâmpadas LEDs branco ou em combinação A:V (2:1);
- Para o melhor crescimento de segmentos nodais de *Chenopodium ambrosioides* L., a fonte de irradiação necessita de uma combinação de azul e vermelho, sendo que luzes monocromáticas não desempenham bom crescimento para a espécie;
- LEDs monocromáticos na cor azul inibem a síntese de Z-ascaridol e a luz fluorescente promove maior conversão de  $\alpha$ -terpineno em ascaridol

**AGRADECIMENTOS:** FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4<sup>th</sup> ed. Illinois: 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, April. 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**, Columbia, v. 52, n. 3, p. 276-282, May 2016.

COSTA, M.; TAVARES, E. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L.(Chenopodiaceae)–erva-de-Santa Maria. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 63-71, Out. 2006.

DEBNATH, M.; MALIK, C. P.; BISEN, P. S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Dallas-Fort Worth, v. 7, n. 1, p. 33-49, Feb. 2006.

DEMBITSKYA, V.; SHKROBB, I.; HANUSA, L. O. - Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, Olomouc, v. 152, n. 2, p. 209-215, Dec. 2008.

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

FERREIRA, E. B.; CAVALCATI, P. P.; NOGUEIRA, A. Experimental designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da UFOP**, Ouro Preto, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.

JARAMILLO, B. E.; DUARTE, E.; DELGADO, W. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, La Habana, v. 17, p. 54-64, Mar. 2012.

JOHNSON, M. A.; CROTEAU, R. Biosynthesis of ascaridole: Iodide peroxidase-catalyzed synthesis of a monoterpene endoperoxide in soluble extracts of *Chenopodium ambrosioides* fruit. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 235, n. 1, p. 254-266, Nov. 1984.

LAFEVER, R. E.; CROTEAU, R. Hydride Shifts in the Biosynthesis of the p-Menthane Monoterpenes  $\alpha$ -Terpinene,  $\gamma$ -Terpinene, and  $\beta$ -Phellandrene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 301, n. 2, p. 361-366, Mar. 1993.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p.350-382, 1987.

- LIM, Y. J.; EOM, S. H. Effects of different light types on root formation of *Ocimum basilicum* L. cuttings. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 552-555, Dec. 2013.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J.; FRANCISCO, J. M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 2008.
- MACDONALD, D. et al. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 92, n. 2-3, p. 215-221, June 2004.
- MANIVANNAN, A. et al. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 105-113, Feb. 2015.
- MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 2, p. 133-142, June 1999.
- MAYRHOFER, S. et al. Diurnal and Seasonal Variation of Isoprene Biosynthesis-Related Genes in Grey Poplar Leaves. **Plant Physiology**, v. 139, n. 1, p. 474-484, Sept. 2005.
- MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M. M. Potencial de controle da erva-de-Santa-Maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 513-516, Set./Out. 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, July 1962.
- NHUT, D. T. et al. Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 299-308, Mar. 2015.
- NIST SPEECH GROUP WEBSITE. **Topic detection and tracking evaluation**. Disponível em: <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em 15 março 2015.
- OLIVEIRA, R. P. de; ROCHA, P. S. G. da.; SCIVITTARO, W. B. **Estruturação de Sistema de LEDs em Laboratório de Cultura de Tecidos**. Pelotas: Ed. Embrapa Clima Temperado, 2011.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Software
- ROCHA, P. S. G. D. et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1922-1928, Set. 2010.
- RUNKLE, E. S.; 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**, v. 126, n. 3, p. 275-282, 2001.

SÁ, R. D.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.: estado da arte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 267-276, 2015.

SHVYDKIV, O. **Microphotochemistry-a new resources efficient synthesis tool approach**. 2013. Tese de Doutorado. Dublin City University. 2013

SILVA, S. T. et al. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, p. 1-10, 2017.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 748-755, Mai./Jun. 2005.

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**, v. 29, n. 3, p. 315-318, Jan. 2012.

TOPCHIV, N. M. et al. The effect of additional red irradiation on the photosynthetic apparatus of *Pisum sativum*. **Photosynthetica**, v. 43, n. 3, p. 451-456, Mar. 2005.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, Jan. 1963.

VERISSIMO, L. F. et al. Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, p. 1163-1171, Nov./Dez. 2011.

**ARTIGO 3****CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA E DE ÁCIDO SALICÍLICO NA CULTURA *IN VITRO* E NA PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS DE *Chenopodium ambrosioides* L.**

**Alexandre Alves de Carvalho<sup>1</sup>, José Eduardo Brasil Pereira Pinto<sup>1</sup>, Suzan Kelly Vilela Bertolucci<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Setor de Cultura de Tecidos e Plantas Mediciniais, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, CEP 37200-000 Email: alexandre.ufla@yahoo.com.br

Preparado Segundo a Norma NBR 6022:2003

## RESUMO

*Chenopodium ambrosioides* L. é uma espécie medicinal, na existência de poucas, que possui a capacidade de produzir o monoterpeno ascaridol. A esse monoterpeno é atribuído às propriedades terapêuticas como anti-helmíntico, anti-inflamatório, anti-Leishmania e antidiarréico. Objetivou-se avaliar parâmetros de crescimento e produção de constituintes voláteis em função de diferentes concentrações de quitosana e de ácido salicílico. No cultivo *in vitro* dessa espécie, avaliaram-se cinco concentrações de quitosana (0; 50; 100; 150; 200 mg L<sup>-1</sup>) e cinco concentrações de ácido salicílico (0; 3; 6; 9; 12 mg L<sup>-1</sup>) adicionadas ao meio MS. A quitosana e o ácido salicílico apresentaram efeito negativo no crescimento de segmentos nodais de *C. ambrosioides* L. O teor dos principais constituintes químicos voláteis foi influenciado pelas diferentes concentrações de quitosana e de ácido salicílico *in vitro*. O constituinte majoritário *Z*-ascaridol apresentou maior teor, 55 % e 70 %, respectivamente, em 61,11 mg L<sup>-1</sup> de quitosana e em 7,79 mg L<sup>-1</sup> de ácido salicílico.

Palavras-chave: Erva-de-santa-maria. Micropropagação. Elicitores. Ascaridol.

## ABSTRACT

*Chenopodium ambrosioides* L. is a medicinal species, which has the ability to produce the monoterpene ascaridole, among very few species. Monoterpene is assigned the therapeutic properties as anthelmintic, anti-inflammatory, anti-Leishmania and antidiarrheal. The objective of this study was to evaluate growth parameters and production of volatile constituents of this species *in vitro* in function of different concentrations of chitosan and of salicylic acid. In the growth of nodal segments, five concentrations of chitosan (0; 50; 100; 150; 200 mg L<sup>-1</sup>) and five concentrations of salicylic acid (0; 3; 9; 12 mg L<sup>-1</sup>) were added in the MS medium. Chitosan and salicylic acid showed a phytotoxic effect on the growth of nodal segments of *C. ambrosioides*. The content of the main constituents of the volatile chemistry is influenced by the different concentrations of chitosan and of salicylic acid *in vitro*. The major constituent *Z*-ascaridole presented the highest content, 55 e 70 %, in 61.11 mg L<sup>-1</sup> of chitosan and in 7.79 mg L<sup>-1</sup> of salicylic acid.

Keywords: Erva-de-santa-maria. Micropropagation. Elicitor. Ascaridole.

## 1- INTRODUÇÃO

*Chenopodium ambrosioides* L. é uma erva medicinal da família Chenopodiaceae, popularmente conhecida como Erva-de-santa-maria, mastruz e epazote. As propriedades terapêuticas da espécie são geralmente atribuídas ao óleo essencial, sendo o monoterpene ascaridol o seu constituinte majoritário. Esse monoterpene é um poderoso anti-helmíntico, além de inibidor do desenvolvimento de *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*. A espécie *C. ambrosioides* L. foi selecionada pelo governo brasileiro para possível uso como fitoterápicos a serem prescritos pelo Sistema Único de Saúde (LORENZI; MATOS; FRANCISCO, 2008; MACDONALD et al., 2004; SÁ; SOARES; RANDAU, 2015; VERISSIMO et al., 2011).

A variabilidade genética, bioquímica, a dificuldade de multiplicação e a extinção de espécies são alguns fatores que podem comprometer o uso das plantas medicinais para propósitos farmacêuticos. Em plantas medicinais, a micropropagação auxilia na conservação do germoplasma, como também na produção de mudas homogêneas e de qualidade, além de auxiliar na seleção e melhoramento de genótipos com potencial para serem utilizados pela indústria farmacêutica (DEBNATH; MALIK; BISEN, 2006; MORAIS et al., 2012).

Na cultura de tecidos vegetais, os metabólitos secundários podem ser alterados quantitativamente e qualitativamente pela alteração na composição nutricional do meio, presença de reguladores de crescimento isolados ou combinados, adição de elicitores ou por exposição a fatores de estresse (NITZSCHE et al., 2004; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002).

Elicitores bióticos e abióticos vêm sendo amplamente empregados em cultura de tecidos vegetais, com o intuito de maximizar a produção de compostos químicos de interesse. A submissão de plantas a estresses abióticos tem sido apontada como estimulador da biossíntese de metabólitos secundários incluindo terpenos, flavonóides, alcaloides, betacianinas e fenilpropanoides, entre outros (BHUIYAN; ADACHI, 2003; ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

A quitosana é um biopolímero com aplicações em tratamento de águas residuais, papel e celulose, em produtos médicos e cosméticos, biotecnologia, alimentos e rações (NGE et al., 2006). Trata-se de um polissacarídeo composto de  $\beta$ -1,4 D-glucosamina ligada a resíduos de N-acetilglucosamina, naturalmente encontrada na parede do micélio de alguns fungos



podendo ser obtido por diacetilação da quitina, principal componente do exoesqueleto dos artrópodes e crustáceos (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008).

Alguns estudos relatam que a quitosana tem potencial para alterar a produção de metabólitos secundários em plantas. Por exemplo: aumentou o teor de aferina A em *Withania somnifera* (GORELICK et al., 2015), escopolamina e hiosciamina em culturas de raízes de *Atropa belladonna* (HASHIMOTO; YUN; YAMADA, 1993), diosgenina em culturas de raízes de *Trigonella foenum-graecum* (MERKLIET et al., 1997) e curcumina em *Curcuma longa* L. (SATHIYABAMA; BERNSTEIN; ANUSUYA, 2016).

O ácido salicílico é um composto fenólico que está envolvido numa série de processos fisiológicos, e tem sido considerado como fazendo parte de nova classe de substâncias de crescimento de plantas, além dos fitohormônios. É sintetizado a partir do aminoácido fenilalanina e é encontrado em folhas, inflorescências de plantas termogênicas e em plantas atacadas por patógenos (PACHECO et al., 2007).

Nas duas últimas décadas, o ácido salicílico tem recebido muita atenção devido ao envolvimento em mecanismos de defesa de plantas, estresse biótico e abiótico (SAKHANOKHO; KELLEY 2009). Há pesquisas que demonstram que ácido salicílico afeta a biossíntese de paclitaxel e taxanos relacionados (LU; TANG; LI, 2016); terpenos em *Nigella sativa* (ELYASI et al., 2016); mono e sesquiterpenos e a expressão de enzimas biossintéticas (pirofosfato de isopentenilo e farnesil difosfato sintase) em *Panax ginseng* (RAHIMI et al. 2014).

Assim, objetivou-se, com este trabalho, estudar a influência de diferentes concentrações de quitosana e de ácido salicílico em suplementação ao meio MS no crescimento de *C. ambrosioides* L. e suas relações com os constituintes voláteis *in vitro*.

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais e de Fitoquímica, do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

Em todos os experimentos, a autoclavagem do meio de cultura foi realizada a 120 °C e 1 atm, por 20 minutos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de  $25 \pm 2$  °C e irradiância de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; o pH do meio de

cultura foi aferido para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem e o meio de cultura foi suplementado com 0,6% de ágar.

A variável altura de plântulas (AL), expressa o tamanho da brotação principal medida de sua base até a gema apical e a avaliação foi realizada com o auxílio de paquímetro digital. A biomassa seca de folha (BSF), de caule (BSC) e de raiz (BSR) foram mensuradas em balança de precisão após secagem em estufa de circulação forçada de ar a 35 °C por três dias. A biomassa seca total foi obtida pela soma das biomassas secas de raiz, caule e folha.

## **2.1 Estabelecimento de segmentos apicais**

Plantas adultas da espécie *C. ambrosioides* L., localizadas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA, foram utilizadas como fonte de sementes. Confirmou-se a existência da exsicata depositada no herbário do Departamento de Biologia dessa Instituição, sob o registro 10137.

As sementes foram coletadas e semeadas, com o objetivo de obter plantas matrizes, em bandeja de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. Após 60 dias, as plântulas germinadas foram transplantadas para potes de polietileno com capacidade de 3,6 litros contendo o mesmo substrato e mantidas em casa de vegetação com irrigação.

Após 30 dias, as plantas transplantadas serviram como fonte de segmentos apicais que foram coletados e lavados em água corrente e sabão neutro por 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em uma solução de água sanitária a 40% por 10 minutos, seguido de álcool etílico a 70% por 30 segundos e, finalmente, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Ao concluir a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com a metade da concentração original de seus sais, e 3% de sacarose.

## **2.2- Efeito de diferentes concentrações de elicitores no crescimento *in vitro* de segmentos nodais**

Segmentos nodais de aproximadamente 2 cm de comprimento de plântulas estabelecidas *in vitro* foram inoculados verticalmente em frascos, de 250 mL, contendo 35 mL do mesmo meio de estabelecimento suplementados com elicitador. Para cada experimento com

elicitação, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições e a unidade experimental foi representada por um frasco contendo quatro segmentos por repetição.

Após 40 dias, foram avaliadas as variáveis altura de plântula (AL), as biomassas secas de folha (BSF), de caule (BSC), de raiz (BSR) e total (BST), e análise química dos constituintes voláteis.

#### 2.2.1 - Elicitação com quitosana

Foi utilizada quitosana em pó de baixo peso molecular (50-190 KDa) da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Chemicals, SP, Brasil, com 75 - 85% de desacetilação. Uma solução estoque de quitosana na concentração de 4000 mg L<sup>-1</sup> foi preparada em ácido clorídrico 1N. Em seguida, foi adicionada ao meio de cultura nas concentrações finais 0; 50; 100; 150; 200 mg L<sup>-1</sup>, antes da autoclavagem.

#### 2.2.2 - Elicitação com ácido salicílico

Uma solução etanólica estoque a 50 mg mL<sup>-1</sup> de ácido salicílico (plant cell culture tested, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) foi preparada. Em seguida foi misturada ao meio de cultura nas concentrações finais de 0; 3; 6; 9; 12 mg L<sup>-1</sup>.

### 2.3- Análise estatística

As análises foram feitas utilizando-se o software R e o pacote estatístico *ExpDes* (FERREIRA; CAVALCATI; NOGUEIRA, 2011), conforme R Development Core Team (2012).

Para os tratamentos cujas médias apresentaram diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade, foi empregado análise de regressão.

### 2.4- Análise química por *headspace*-CG/EM de *Chenopodium ambrosioides* L.

Amostras de folhas de *C. ambrosioides* L. dos experimentos com elicitação foram coletadas de plântulas aos 40 dias de cultivo *in vitro*. O material vegetal foi seco em estufa de

circulação forçada de ar a 35 °C e 60 mg de folhas secas foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 ml, vedados com septo de silicone/PTFE.

Para extração da fração volátil de *C. ambrosioides* L. empregou-se a técnica de *headspace* estático, utilizando-se um extrator/amostrador *headspace* automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. As condições operacionais foram: temperatura de incubação da amostra de 110 °C durante 30 min, temperatura de seringa a 120 °C e, 500 µL da fase de vapor foram injetados no sistema cromatográfico.

As análises químicas foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent®7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent®MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (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 a linha de transferência para o MS foram mantidas em 220 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 40 °C, isotérmico por 1 min, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 200 °C e, finalizado com uma rampa de 10 °C/min até 250 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As concentrações dos constituintes presentes foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

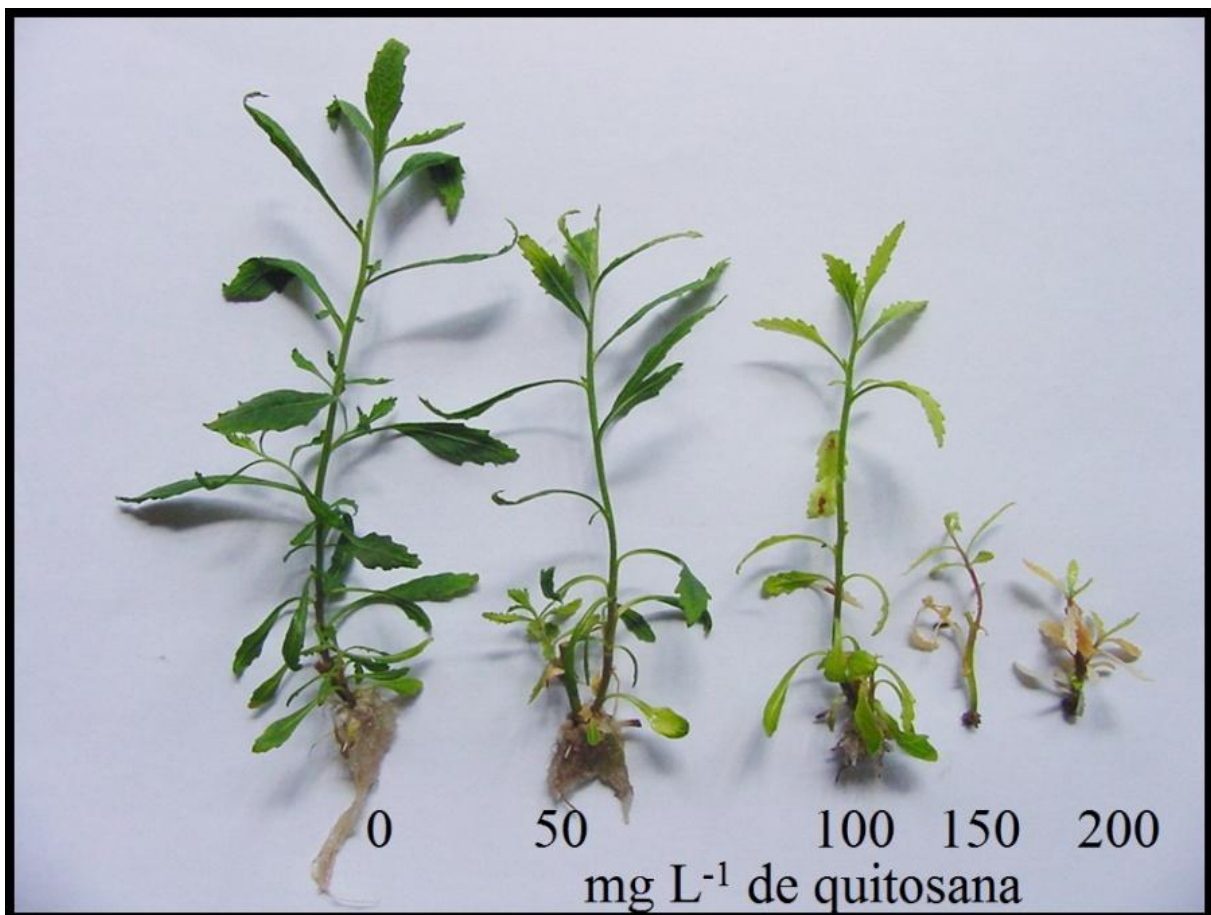
Os constituintes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literatura (ADAMS, 2007).

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1- Elicitação com quitosana

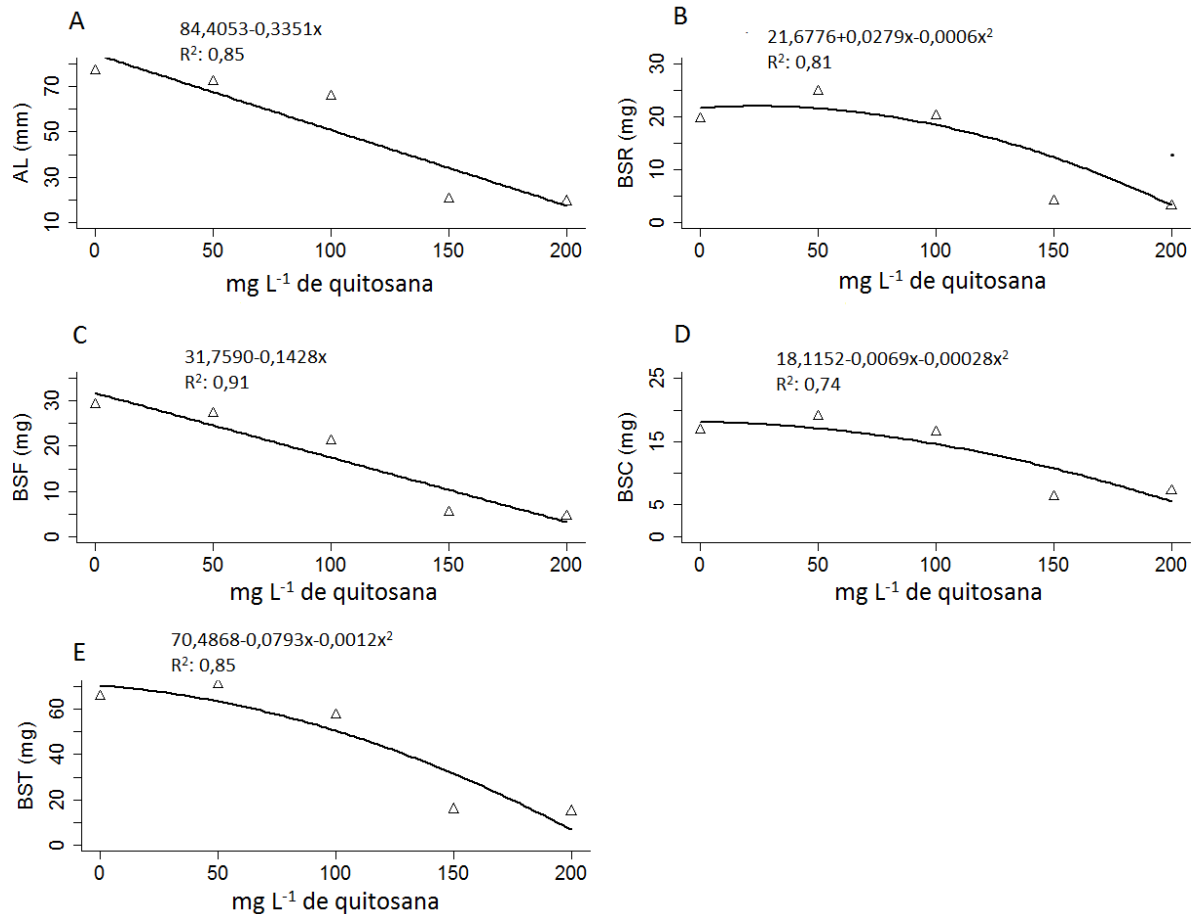
A quitosana afetou negativamente o crescimento *in vitro* de *C. ambrosioides* L. (Figura 1 e 2).

Figura1- Plântulas micropropagadas de *Chenopodium ambrosioides* L. em diferentes concentrações de quitosana adicionadas ao meio de cultura. UFLA, Lavras, 2017.



Diferenças estatísticas significativas foram observadas para todas as variáveis de crescimento analisadas. A altura de plântulas e a biomassa seca de folhas decresceram linearmente em função das doses crescentes de quitosana e para as demais variáveis analisadas verificou-se significância para regressão quadrática.

Figura 2- Efeito de diferentes concentrações de quitosana adicionadas ao meio MS na: A- altura de plântulas (AL), B- biomassa seca de raízes (BSR), C- biomassa seca de folhas (BSF), D- biomassa seca de caules (BSC) e E- biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro*.



Na ausência de quitosana observaram-se os melhores resultados para altura (84,41 mm) e biomassa seca de folhas (31,76 mg). Em relação às biomassas secas, foram estimadas 22,00; 17,99 e 66,56 mg nas concentrações de 23,25; 12,32 e 33,04 mg L<sup>-1</sup> de quitosana para raiz, caule e total, respectivamente.

A quitosana também apresentou efeito fitotóxico em plântulas de videira cv. Merlot, no entanto, material desenvolvido *in vitro* normalmente é muito mais sensível do que plantas de videiras em situação de campo (MAIA et al. 2010). Esses autores estudaram concentrações similares de quitosana no crescimento *in vitro* de plântulas de videira e verificaram para as variáveis, comprimento médio da parte aérea, massa fresca da planta inteira, porcentagem de estacas enraizadas e porcentagem de estacas brotadas que houve decréscimo linear em função

das doses de quitosana. Em relação às variáveis, número de raízes, comprimento médio de raízes e número de folhas não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Por outro lado, Nge et al. (2006) relatam em sua pesquisa o efeito estimulador da quitosana no crescimento *in vitro* de orquídeas. De acordo com os resultados obtidos por esses pesquisadores, a quitosana tem a capacidade de estimular a indução de diferenciação de tecido de orquídea.

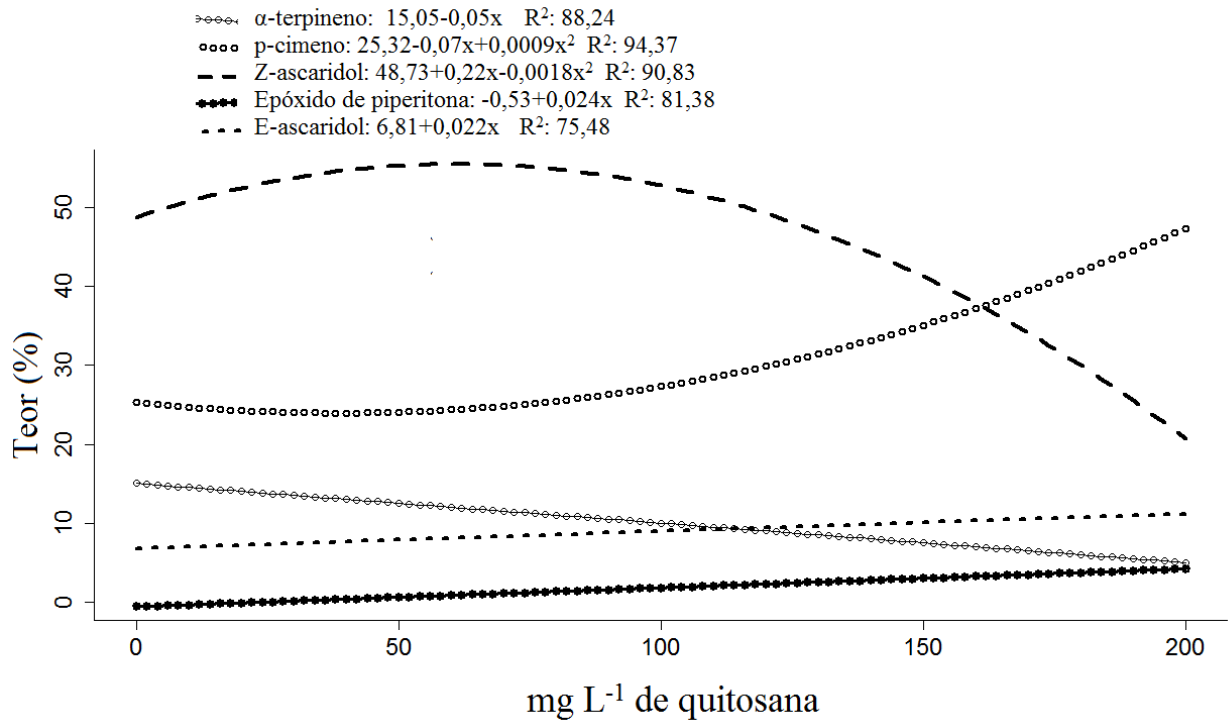
Estudos realizados com outras culturas sugeriram efeito positivo deste biopolímero na morfogênese *in vitro*. Com intuito de testar a eficácia da quitosana na organogênese direta da cultivar de algodão colorido BRS Rubi, Soares et al. (2014) suplementaram o meio MS com 15 mg L<sup>-1</sup> desse biopolímero. Esses autores relataram que os explantes alongaram e se mostraram mais vigorosos quando se utilizou apenas a quitosana, mas não produziram novos brotos. A quitosana não atua isoladamente no superbrotamento da cv. BRS Rubi, constituindo apenas uma fonte de nitrogênio orgânico.

Com base nos dados apresentados pode-se concluir que as concentrações acima de 33 mg L<sup>-1</sup> de quitosana apresentam efeito negativo para os parâmetros de crescimento analisados.

As análises químicas por *headspace*-CG/EM indicaram que a presença de cinco constituintes atingiram em média 95,69% da composição química total. Os constituintes foram  $\alpha$ -terpineno (9,86%), p-cimeno (31,59%), Z-ascaridol (43,31%), epóxido de piperitona (1,90%) e E-ascaridol (9,03%). Cavalli et al. (2004) identificaram cinco constituintes no óleo essencial de *C. ambrosioides* L., caracterizados por Z-ascaridol (58,38%), p-cimeno (16,2%),  $\alpha$ -terpineno (9,7%), E-ascaridol (4,3%) e limoneno (3,8%).

Comparando a concentração dos constituintes voláteis da plântula cultivada em diferentes concentrações de quitosana, houve diferenças significativas entre as áreas relativas dos picos de todos constituintes identificados (Figura 3).

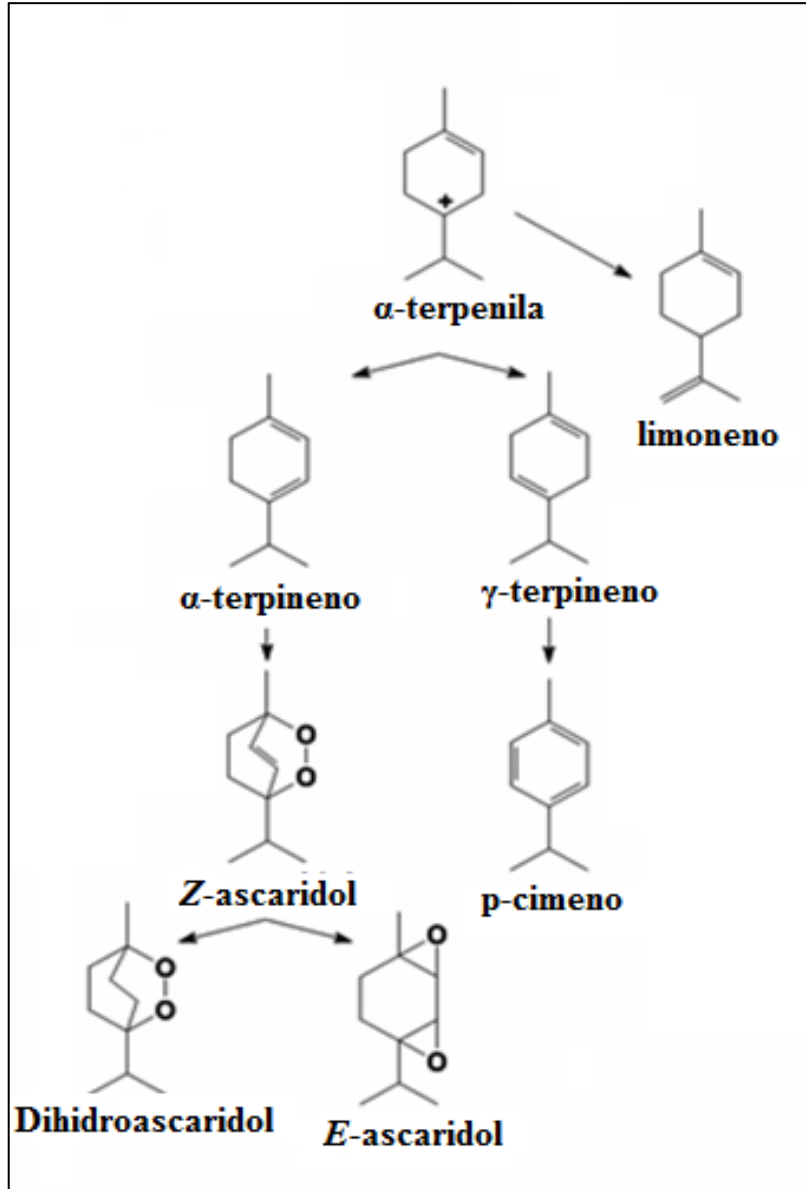
Figura 3 - Teor (%) dos principais constituintes voláteis de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de quitosana.



Os compostos p-cimeno, *E*-ascaridol e epóxido de piperitona acumularam teores máximos na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> de quitosana. O maior teor de  $\alpha$ -terpineno foi verificado na ausência de quitosana. Com base na via biossintética proposta por Dembitskya Shkrobb e Hanusa (2008) (Figura 4), a quitosana favoreceu a conversão de  $\alpha$ -terpineno em *Z*-ascaridol, numa concentração ótima de 61,11 mg L<sup>-1</sup>.



Figura 4 - Mecanismo envolvendo a formação do ascaridol e outros monoterpenos no gênero *Chenopodium*.



Fonte: DEMBITSKAYA; SHKROBB; HANUSA, 2008.

O tratamento de plantas com elicitores abióticos é muito utilizado como estratégia para a produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos, sendo esta produção relacionada à indução de genes responsáveis pela resposta de defesa, ativando a via dos metabólitos secundários (QIAN et al., 2006). A adição de quitosana no meio de cultura influenciou a biossíntese dos constituintes químicos, seja para mais ou para menos, contudo, percebe-se que o uso da quitosana em baixa concentração ( $61,11 \text{ mg L}^{-1}$ ) eleva a produção do constituinte majoritário Z-ascaridol.

Nota-se que doses crescentes de quitosana diminuem os teores de Z-ascaridol, os teores de p-cimeno aumentam. Isto ocorre devido ambos serem biossintetizados a partir do mesmo precursor biossintético, o cátion terpenila. Conforme a reação de deslocamento de hidreto ocorre a formação de  $\alpha$ -terpineno, precursor do Z-ascaridol ou de  $\gamma$ -terpineno, precursor do p-cimeno (DEMBITSKYA; SHKROBB; HANUSA, 2008; LAFEVER; CROTEAU, 1993).

Estudos sobre os fatores que afetam a composição volátil de *C. ambrosioides* L. são importantes para a obtenção de plantas com maior acúmulo dos compostos de interesse. A variabilidade no teor dos constituintes majoritários e/ou ativos é uma das principais dificuldades de desenvolver fitoterápicos com reprodutibilidade de ação (SÁ; SOARES; RANDAU, 2015).

Putalun et al. (2007) estudaram o efeito da quitosana na acumulação de um sesquiterpeno antimalárico (artemisinina) em raízes de *Artemisia annua* L. A produção de artemisinina foi aumentada em seis vezes pela adição de 150 de mg L<sup>-1</sup> de quitosana no meio de cultura. De acordo com esses pesquisadores, do ponto de vista biotecnológico, o aumento na produtividade de artemisinina possui valor prático, podendo assim ser recomendado para produção desse bioativo em grande escala por meio de biorreatores.

A capacidade da quitosana de induzir ou melhorar a resistência de plantas ao ataque de patógenos parece estar diretamente proporcional com a sua eficácia na elicitação de um conjunto complexo de resposta de defesa do vegetal tal como a acumulação de fitoalexinas e a expressão de genes e proteínas relacionados com a defesa (FERRI et al., 2009). Esses autores demonstraram que o efeito da quitosana na indução de mecanismos de defesa de *Vitis vinifera* pode estar relacionado com a sua capacidade para aumentar o conteúdo intracelular de vários antioxidantes, em particular resveratrol.

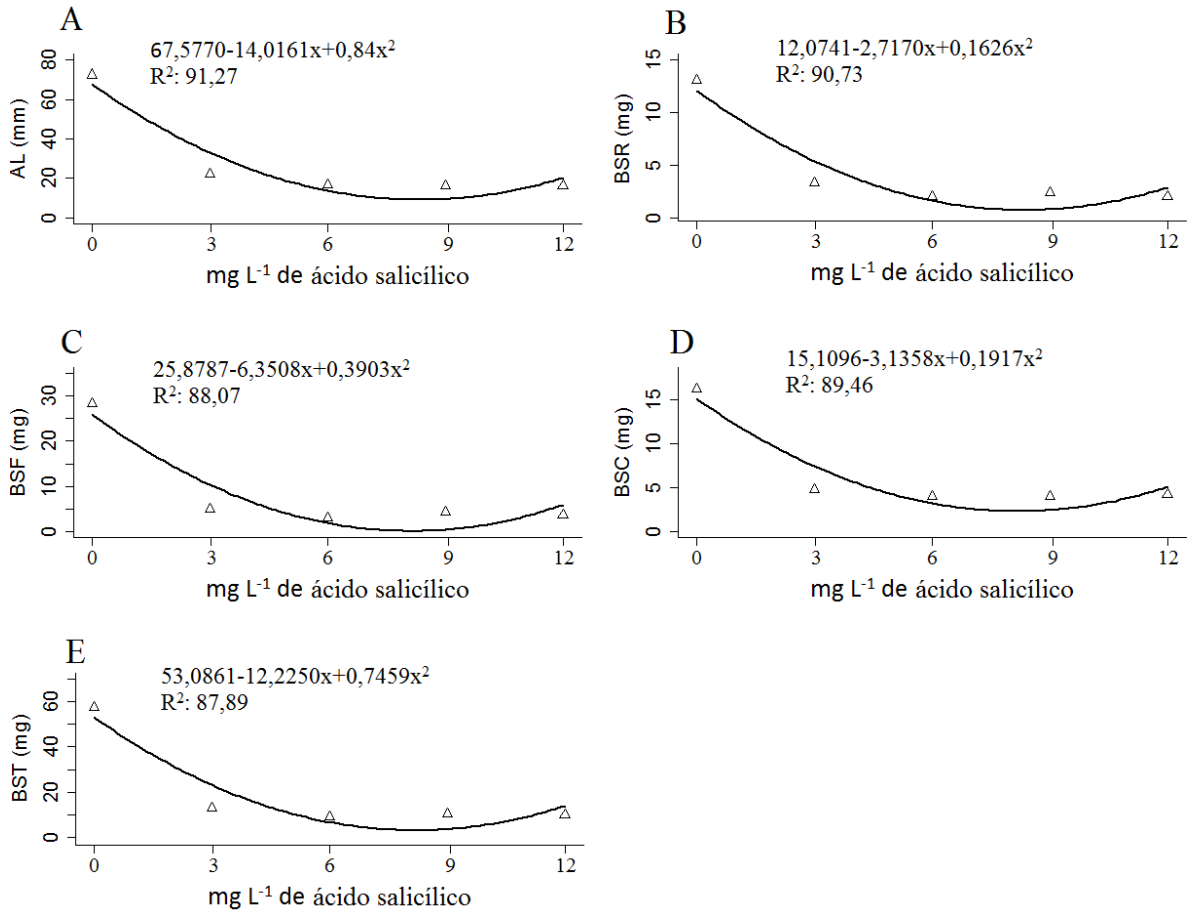
### **3.2- Elicitação com ácido salicílico**

O ácido salicílico afetou negativamente o crescimento *in vitro* de *C. ambrosioides* L. Todas as variáveis de crescimento analisadas apresentaram diferenças significativas, ajustadas por regressão quadrática (Figura 5 e 6).

Figura 5- Plântulas micropropagadas de *Chenopodium ambrosioides* L. em diferentes concentrações de ácido salicílico adicionadas ao meio de cultura.



Figura 6- Efeito de diferentes concentrações de ácido salicílico na: A- altura de plântulas (AL), B- biomassa seca de raízes (BSR), C- biomassa seca de folhas (BSF), D- biomassa seca de caules (BSC) e E- biomassa seca total (BST) de plântulas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas *in vitro*.



As plântulas apresentaram máximo crescimento e maiores biomassas secas sem a suplementação de ácido salicílico no meio de cultura. A menor média estimada de altura foi de 9,11 mm na concentração de 8,34 mg L<sup>-1</sup> de ácido salicílico. Em relação às menores médias de biomassas secas, foram estimadas 0,72; 0,04; 2,29 e 3,00 mg nas concentrações de 8,35; 8,14; 8,18 e 8,19 mg L<sup>-1</sup> de ácido salicílico para raiz, folha, caule e total, respectivamente.

O ácido salicílico é um hormônio vegetal que, quando aplicado exogenamente, pode inibir o crescimento da planta (KERBAUY, 2004), como foi observado nesse experimento. A aplicação do ácido salicílico pode inibir a germinação, interferir na absorção das raízes, reduzir a transpiração, causar a abscisão das folhas, alterar o transporte de íons, induzindo

uma rápida despolarização das membranas, ocasionando um colapso no potencial eletroquímico (KERBAUY, 2004).

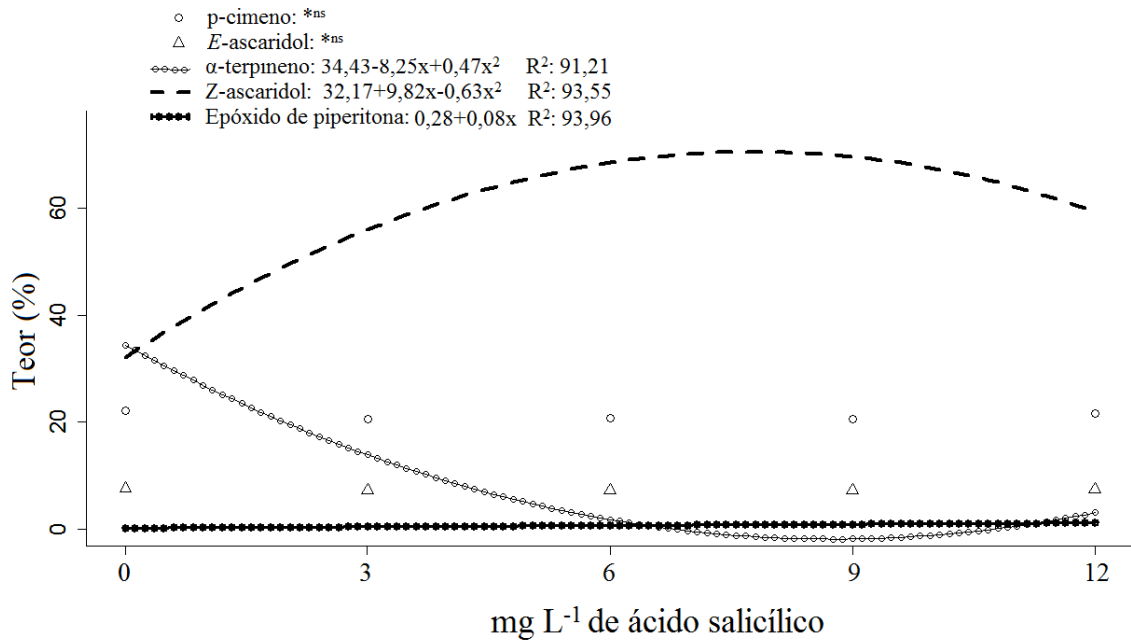
Segundo Conceição, Fortes e Silva (1999) retardantes de crescimento, como o ácido salicílico, são um grupo de componentes sintéticos que reduzem o alongamento da haste e, geralmente, aumentam a coloração verde das folhas. Fortes e Pereira (2001) relataram que o crescimento das hastes de batata é retardado com a adição de ácido salicílico ao meio de cultura associado com o manitol, a partir da concentração de 30 mg L<sup>-1</sup>. Pancheva, Popova e Uzunova (1996) demonstraram em seus estudos que o tratamento a longo prazo de mudas de cevada com ácido salicílico reduz o crescimento das plantas e a fotossíntese. As alterações observadas nos parâmetros fotossintéticos podem ser resultado do efeito mediado pelo fechamento estomático, causando redução no fornecimento de CO<sub>2</sub> ou os efeitos do ácido salicílico sobre a capacidade de fixação de CO<sub>2</sub>, com o declínio da atividade da Rubisco.

De acordo com Singh et al. (2016), a aplicação de ácido salicílico que resulta em melhorias no crescimento de plantas *in vitro* é relatado por poucos pesquisadores. Esses autores demonstraram que concentrações mais baixas de ácido salicílico (5 mg L<sup>-1</sup>) favoreceram o crescimento de micropropágulos de roseira *in vitro*, enquanto maiores concentrações retardaram o crescimento. Observaram também que a adição de ácido salicílico antes da autoclavagem do meio MS ou após, por meio de filtração, não resultou em qualquer diferença significativa no parâmetro de crescimento.

O efeito dos elicitores depende de muitos fatores, tais como: concentração, tempo de elicitação e o estágio de crescimento da cultura no momento da estimulação. Além disso, a resposta a um determinado agente elicitor pode variar de espécie para espécie e é crucial determinar as concentrações adequadas para otimizar a produção dos metabólitos de interesse (NAMDEO, 2007).

A Figura 7 representa o perfil cromatográfico obtido por *headspace*-CG/EM para as amostras de folhas de *C. ambrosioides* L. cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de ácido salicílico. Mais de 96% da área relativa dos picos do cromatograma total de íons foram identificados. Os constituintes voláteis presentes e suas respectivas faixas de teores foram:  $\alpha$ -terpineno (3,11 a 34,43%), p-cimeno (20,60 a 22,20%), Z-ascaridol (32,17 a 57,03%), epóxido de piperitona (0,28 a 1,24%) e E-ascaridol (7,25 a 7,59%).

Figura 7- Teor (%) dos principais constituintes voláteis de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de ácido salicílico. \*<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F



Na ausência de ácido salicílico,  $\alpha$ -terpineno e Z-ascaridol apresentaram teores quase equivalentes. No entanto, com o aumento das concentrações de ácido salicílico, os teores de Z-ascaridol aumentam, enquanto os teores de  $\alpha$ -terpineno diminuem. Conforme a rota metabólica proposta por Dembitskya, Shkrobb e Hanusa (2008) (Figura 4), o ácido salicílico favorece a conversão de  $\alpha$ -terpineno em Z-ascaridol, sendo que a conversão máxima de ascaridol ocorre com 7,79 mg L<sup>-1</sup> de ácido salicílico no meio de cultura.

A aplicação exógena de ácido salicílico nas plantas pode desencadear rotas fundamentais para o crescimento e o desenvolvimento, bem como a expressão de genes relacionados à defesa, produzindo compostos como alcaloides e polifenóis, resultando na defesa, proteção e resistência aos patógenos, sendo considerado um elicitador abiótico (YAO; TIAN, 2005).

Mandal (2010) estudou os elicitores quitosana, ácido salicílico, salicilato de metila e metil jasmonato no cultivo *in vitro* de *Solanum melongena* L. De acordo com esse pesquisador, os quatro elicitores aumentaram o conteúdo fenólico nas raízes em comparação

ao tratamento controle, entretanto, o ácido salicílico se mostrou o mais eficiente na síntese desses compostos.

Com base nos dados apresentados, as concentrações utilizadas de ácido salicílico apresentam efeito negativo para os parâmetros de crescimento analisados, porém na análise dos compostos voláteis a elicitação de *C. ambrosioides* L. se mostra favorável, aumentando significativamente os teores de Z-ascaridol, apontado com responsável pela atividade anti-helmíntica dessa espécie.

#### 4- CONCLUSÕES

- A quitosana e o ácido salicílico apresentaram efeito negativo no crescimento de segmentos nodais de *C. ambrosioides* L.
- O ácido salicílico e a quitosana favorecem a conversão de Z-ascaridol em  $\alpha$ -terpineno, numa concentração ótima de 7,79 mg L<sup>-1</sup> e 61,11 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

**AGRADECIMENTOS:** FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

#### REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4<sup>th</sup> ed. Illinois: Allured, 2007. 804 p.

BHUIYAN, M. N. H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 9, p. 1117-1124, Dec. 2003.

CAVALLI, J. F. et al. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, West Sussex, v. 15, n. 5, p. 275-279, Sept./Oct. 2004.

CONCEIÇÃO, A. M. D.; FORTES, G. R. D. L.; SILVA, J. B. D. Influência do ácido acetilsalicílico, da sacarose e da temperatura na conservação *in vitro* de segmentos caulinares de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, Nov. 1999.

DEBNATH, M.; MALIK, C. P.; BISEN, P. S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Dallas-Fort Worth, v. 7, n. 1, p. 33-49, Feb. 2006.

DEMBITSKYA, V.; SHKROBB, I.; HANUSA, L. O. - Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, Olomouc, v. 152, n. 2, p. 209-215, Dec. 2008.

ELYASI, R. et al. Spatial modulation and abiotic elicitors responses of the biosynthesis related genes of mono/triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*). **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 240-247, Jan. 2016.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista iberoamericana de polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435-451, 2008.

FERREIRA, E. B.; CAVALCATI, P. P.; NOGUEIRA, A. Experimental designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da UFOP**, Ouro Preto, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.

FERRI, M. et al. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. **Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 610-624, Sept. 2009.

FORTES, G. R. D. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 1261-1264, Oct. 2001.

GORELICK, J. et al. Hypoglycemic activity of withanolides and elicited *Withania somnifera*. **Phytochemistry**, Nantes, v. 116, p. 283-289, Aug. 2015.

HASHIMOTO, T.; YUN, D.-J.; YAMADA, Y. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. **Phytochemistry**, Nantes, v. 32, n. 3, p. 713-718, Feb. 1993.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2004.

LAFEVER, R. E.; CROTEAU, R. Hydride Shifts in the Biosynthesis of the p-Menthane Monoterpenes  $\alpha$ -Terpinene,  $\gamma$ -Terpinene, and  $\beta$ -Phellandrene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 301, n. 2, p. 361-366, 1993.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.; FRANCISCO, J. M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 2008.

LU, X.; TANG, K. X.; LI, P. Plant Metabolic Engineering Strategies for the Production of Pharmaceutical Terpenoids. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, Nov. 2016.



MACDONALD, D. et al. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 92, n. 2–3, p. 215-221, June 2004.

MAIA, A. J. et al. Efeitos da quitosana no desenvolvimento *in vitro* de videiras cv. merlot e no crescimento micelial do fungo *Elsinoe ampelina*. **Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 1425-1430, Dez. 2010.

MANDAL, S. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 47, p. 8038-8047, Nov. 2010.

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

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

NAMDEO, A. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 69-79, Jan./May. 2007.

NGE, K. L. et al. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. **Plant Science**, v. 170, n. 6, p. 1185-1190, June 2006.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. **Topic detection and tracking evaluation**. Disponível em: <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em 15 março 2015.

NITZSCHE, A. et al. Chemical and Biological Characterization of Cinnamic Acid Derivatives from Cell Cultures of Lavender (*Lavandula officinalis*) Induced by Stress and Jasmonic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2915-2923, May 2004.

PACHECO, A. et al. Germinação de sementes de camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] e calêndula (*Calendula officinalis* L.) tratadas com ácido salicílico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, p. 61-67, Março 2007.

PANCHEVA, T. V.; POPOVA, L. P.; UZUNOVA, A. N. Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 57-63, Jan. 1996.

PUTALUN, W. et al. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 7, p. 1143-1146, July 2007.

QIAN, Z. G. et al. Novel Chemically Synthesized Salicylate Derivative as an Effective Elicitor for Inducing the Biosynthesis of Plant Secondary Metabolites. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 1, p. 331-333, July 2006.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Software

RAHIMI, S. et al. Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 61, n. 6, p. 811-817, Nov. 2014.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101-153, 2002.

SÁ, R. D.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.: estado da arte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 267-276, 2015.

SAKHANOKHO, H. F.; KELLEY, R. Y. Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red'). **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 8, n. 8, April 2009.

SATHIYABAMA, M.; BERNSTEIN, N.; ANUSUYA, S. Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 87-94, Oct. 2016.

SINGH, A. K. et al. Effect of exogenous supply of salicylic acid on *in vitro* growth and development of rose micropropagules. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 7, n. 6, p. 12034 - 12039, June 2016.

SOARES, T. D. C. et al. Quitosana e fitorreguladores na indução da organogênese direta em cultivar de algodão colorido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, p. 839-843, Agosto 2014.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VERISSIMO, L. F. et al. Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, p. 1163-1171, Nov./Dez. 2011.

YAO, H.; TIAN, S. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, n. 3, p. 253-262, Mar. 2005.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 4, p. 283-333, June 2005.