



BETY SHIUE DE HSIE

**REGULADORES DE CRESCIMENTO, QUALIDADE E
INTENSIDADE DE LUZ, SISTEMA DE VENTILAÇÃO
NATURAL E ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL NA
MICROPROPAGAÇÃO DE *Lippia rotundifolia* Cham.**

LAVRAS – MG

2017

BETY SHIUE DE HSIE

**REGULADORES DE CRESCIMENTO, QUALIDADE E INTENSIDADE DE
LUZ, SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL E ANÁLISE DA FRAÇÃO
VOLÁTIL NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Lippia rotundifolia* Cham.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Doutora.

Profº. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Profº. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Co-Orientadora

LAVRAS – MG

2017

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

Hsie, Bety Shiue.

Reguladores de crescimento, qualidade e intensidade de luz,
sistema de ventilação natural e análise da fração volátil na
micropropagação de *Lippia rotundifolia* Cham. / Bety Shiue Hsie. -
2017.

113 p. : il.

Orientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

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

Bibliografia.

1. planta medicinal. 2. micropropagação. 3. fração volátil. I.
Brasil Pereira Pinto, José Eduardo. II. Vilela Bertolucci, Suzan
Kelly. III. Título.

BETY SHIUE DE HSIE

REGULADORES DE CRESCIMENTO, QUALIDADE E INTENSIDADE DE LUZ, SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL E ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Lippia rotundifolia* Cham.

GROWTH REGULATORS, QUALITY AND LIGHT INTENSITY, NATURAL VENTILATION SYSTEM AND VOLATILE FRACTION ANALYSIS IN THE MICROPROPAGATION OF *Lippia rotundifolia* Cham.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Propagação, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 10 de abril de 2017

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA

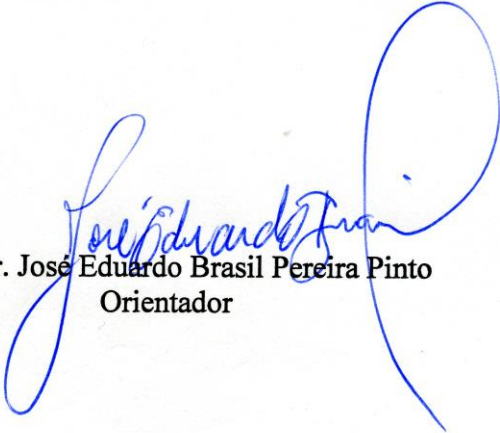
Dr. Osmar Alves Lameira - EMBRAPA Amazônica Oriental

Dra. Priscila Pereira Botrel - IF Sul de Minas, Campus Muzambinho

Dra. Flávia Dionízio Pereira - IF Goiano, Campos Morrinhos

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci - UFLA

Dra. Fernanda Venterim Pacheco - UFLA


Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

LAVRAS - MG

2017

AGRADECIMENTOS

À Deus que esteve comigo durante toda a minha trajetória no curso e na vida, me deu forças para enfrentar todas as dificuldades. Sem a sua ajuda e orientação eu não teria conseguido.

À minha mãe Shiue Shwn Rong Araújo e meu pai Júlio César Figueiredo Araújo, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, e por todo esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha tia Marisa Shiue pelo carinho, apoio e ajuda na minha formação, sem isso nada seria possível.

Ao meu tio Humberto Fernando que me apoiou e sempre acreditou que eu conseguiria.

Ao João Antônio Almeida Granja, por seu amor, compreensão, companheirismo e sua ajuda em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Agricultura e o Horto de Plantas Medicinais, pela oportunidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares pela estrutura e suporte.

Ao meu orientador José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela confiança, suporte e por ter dividido comigo um pouco do seu conhecimento que levarei comigo para sempre.

À minha co-orientadora Suzan Kelly Vilela Bertolucci pela confiança, suporte e por ter dividido comigo um pouco do seu conhecimento que levarei comigo para sempre.

Ao Evaldo, por todo o suporte e disposição para me ajudar.

A todos os companheiros de laboratório, pela amizade, apoio e troca de conhecimentos que muito contribuíram para a concretização desse trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida. Ao CNPq e a FAPEMIG.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A *Lippia rotundifolia* Cham. é uma Verbenaceae endêmica do Cerrado, aromática, caracterizada pela presença de tricomas glandulares em suas folhas, ricos em monoterpenos. A micropropagação tem sido muito utilizada na multiplicação de várias espécies com propriedades medicinais com dificuldade na propagação convencional e para obtenção de um material homogêneo. Objetivou-se com este trabalho foram avaliar a influência de diferentes reguladores de crescimento, espectros de luz, sistema de ventilação natural e concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* de *L. rotundifolia* Cham e compostos químicos da fração volátil. Com base nos resultados dos bioensaios com reguladores de crescimento, observou-se que o TDZ na concentração de 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ com ou sem ANA gerou um maior número de brotações em relação às demais combinações de BAP e ANA, entretanto, foi encontrada alta porcentagem de hiperidricidade e calos. A micropropagação através de segmentos nodais poderia ser considerada o método mais seguro para obtenção de plântulas viáveis (8 a 10 plântulas) livres de calos e hiperidricidade. A manipulação da intensidade e qualidade luminosa no cultivo *in vitro* afeta diretamente tanto na produção de biomassa, quanto no conteúdo de pigmentos fotossintéticos e na composição da fração volátil. As menores intensidade luminosas, 20 e 54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, afetam positivamente no crescimento *in vitro* de *L. rotundifolia*, tendo maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos e acúmulo de biomassa. Quanto a qualidade de luz, o espectro do vermelho e azul combinados estimularam o desenvolvimento das plantas, sendo a combinação 2,5V: 1A que proporcionou melhores resultados biométricos e no conteúdo de clorofila total. Para análise da fração volátil houve menor interferência da qualidade da luz na composição química volátil comparada à intensidade luminosa. O uso do sistema de ventilação natural utilizando membranas porosas manufaturadas é o método de cultivo *in vitro* mais eficiente em relação ao sistema convencional. O sistema de ventilação com duas membranas porosas e com a concentração de sacarose de 15 g L⁻¹ se mostrou o melhor tratamento. Quanto a influência do sistema de ventilação e a concentração de sacarose no meio no teor de compostos da fração volátil, a sacarose parece interferir mais diretamente. Avalia-se que o estudo permitiu a ampliação do conhecimento a cerca da espécie e de seu cultivo *in vitro*. Espera-se que a pesquisa possa prover subsídios à proposição de novos estudos sobre esta espécie dentre outras do Cerrado.

Palavras-chave: Fotoautotrofia, luz, lâmpadas LEDs, membranas porosas.

ABSTRACT

Lippia rotundifolia Cham. is an endemic Verbenaceae of the Cerrado, aromatic, characterized by the presence of glandular trichomes in its leaves, rich in monoterpenes. Micropropagation has been widely used in the multiplication of several species with medicinal properties with difficulty in the conventional propagation and to obtain a homogeneous material. The objectives of the work were to evaluate the influence of different growth regulators, light spectra, natural ventilation system and sucrose concentrations on the *in vitro* growth of *L. rotundifolia* Cham and chemical compounds of the volatile fraction. Based on the results of biasses with growth regulators, it was observed that TDZ at concentrations of 1.5 and 2.0 mg L⁻¹ with or without ANA generated a higher number of shoots compared to all combinations of BAP and ANA , However, a high percentage of hyperhydricity and callus was found. The plant shows high sensitivity to growth regulators, in which high percentages of hyperhydricity and callus formation were observed, which compromised the viability of the seedlings obtained. Based on this, micropropagation through nodal segments could be considered the safest method to obtain viable seedlings (8 to 10 seedlings) free of calluses and hyperhydricity. The manipulation of the intensity and luminous quality in the *in vitro* culture showed to affect directly both the production of biomass, the content of photosynthetic pigments and the composition of the volatile fraction. The lower light intensities, 20 and 54 μmol m⁻²s⁻¹, positively affect growth, having a higher content of photosynthetic pigments and accumulation of biomass. As for light quality, combined red and blue spectrum stimulated better plant development, the combination of 2.5R: 1B obtained better biometric data and total chlorophyll content. In the volatile fraction, the light quality interfered less in the composition of the volatile compounds in relation to the luminous intensity. The use of the natural ventilation system using manufactured porous membranes proved to be a more efficient *in vitro* culture method than the conventional system. The ventilation system with two porous membranes and the sucrose concentration of 15 g L⁻¹ proved to be the best treatment. Regarding the influence of the ventilation system and the concentration of sucrose in the medium on the content of compounds of the volatile fraction, the sucrose seems to interfere more directly. It is evaluated that the study allowed the expansion of knowledge about the species and its *in vitro* culture. It is hoped that the research may provide subsidies for proposing new studies on this species among others in the Cerrado.

Key words: *Lippia*, growth regulator, light, LED lamps, porous membranes.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	08
1	INTRODUÇÃO	09
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Aspectos botânicos, agronômicos e químicos da espécie	11
2.2	Químicos voláteis	13
2.2.1	Definições básicas	13
2.2.2	Vias e locais de síntese de terpenóides	14
2.2.3	Fatores que influenciam a produção de óleos essenciais e químicos voláteis	15
2.2.4	Análise da fração volátil por HS-CG/EM	16
2.3	Cultura de tecidos vegetais	17
2.3.1	Conceitos e utilização de cultivo <i>in vitro</i> de plantas medicinais	17
2.3.2	Fatores que afetam o cultivo <i>in vitro</i> de plantas medicinais	19
3.	REFERÊNCIAS	21
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	35
	ARTIGO 1 –REGULADORES DE CRESCIMENTO E RELAÇÃO NO₃:NH₄⁺ NA MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE <i>Lippia rotundifolia</i> Cham.	36
1	INTRODUÇÃO	37
2	DESENVOLVIMENTO	39
3	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
	ARTIGO 2 – INTENSIDADE E QUALIDADE DE LUZ NO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Lippia rotundifolia</i> Cham. E NA ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL	65
1	INTRODUÇÃO	66
2	DESENVOLVIMENTO	68
3	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	82
	ARTIGO 3 - SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL, CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Lippia rotundifolia</i> Cham.	88
1.	INTRODUÇÃO	89
2.	DESENVOLVIMENTO	91
3.	CONCLUSÕES	109
	REFERÊNCIAS	109

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

Lippia rotundifolia Cham. (Verbenaceae), é uma espécie endêmica do Cerrado, encontrada na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais, caracterizada pela presença de tricomas glandulares em suas folhas, ricos em monoterpenos. Dentro dos compostos voláteis encontrados em *L. rotundifolia* estão presentes os compostos majoritários limoneno, mirceno e mircenal (LEITÃO et al., 2008; RESENDE et al., 2015). Espécies do gênero *Lippia* apresentam importância econômica devido ao vasto uso dos seus óleos essenciais e às suas propriedades medicinais (PASCUAL et al., 2001). As propriedades medicinais mais característica nas espécies desse gênero são principalmente antimicrobianas, antifúngica, repelente ou larvicida (BASSOLE et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; PASCUAL et al., 2001; SANTOS; INNECCO; SOARES, 2004).

Estudos agronômicos da espécie relataram seu baixo potencial de germinação da semente, atingindo um máximo de 40 por cento apenas quando submetido a tratamentos com hormônios indutores de germinação. Quanto a métodos de propagação vegetativa convencional, são baixos os percentuais de enraizamento e sobrevivência de mudas. Além disso, atrelado a um alto risco de extinção devido ao seu extrativismo. Portanto, ressalta-se a importância de mais estudos sobre essa espécie (PIMENTA et al., 2007; SALIMENA; SILVA, 2009). O cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui assim uma alternativa para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal (JULIANI et al., 1999; MORAIS et al., 2012). A luz, a umidade, a temperatura, a oxidação, os reguladores de crescimento, a idade do material, etc., afetam o rendimento e a composição da fração volátil (FIGUEIREDO et al., 2008).

A luz é o principal fator ambiental que controla o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo das plantas, sendo afetadas pela irradiância em todos os estágios do seu crescimento (COSTA et al., 2012; COSTA; CHAGAS, 2014). Estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de plantas medicinais e aromáticas têm diferentes respostas em função da intensidade luminosa e do controle do espectro de luz durante o cultivo (ALVARENGA et al., 2015; CHANG; ALDERSON; WRIGHT, 2008). A fonte de luz tradicional utilizada na cultura *in vitro* é a luz branca fluorescente, onde se trabalha geralmente com o objetivo de encontrar a intensidade de luz mais adequada de acordo com cada espécie estudada. Os diodos emissores de luz (LEDs)

como uma nova fonte de energia têm muitas vantagens em comparação com a fonte de luz tradicional, porque os LEDs têm uma vida longa, especificidade de comprimento de onda e largura de banda estreita, o que permite observar diretamente a influência de uma faixa de comprimento de onda mais específica no desenvolvimento da planta (LIN et al., 2011; YEH; CHUNG, 2009).

Um dos principais fatores que interferem na micropropagação é a manipulação de reguladores de crescimento, tais como auxinas e citocininas, isolados ou em combinações, para determinar um rápido crescimento de células, acompanhado do desenvolvimento organizado de raízes e parte aérea (BALARAJU et al., 2008; DINIZ et al., 2006; GARRIGA CARABALLO et al., 2010). É bastante comum a utilização da interação de auxinas e citocininas no processo de diferenciação, e também para estimular o acúmulo de metabólitos secundários nos tecidos vegetais (CATTELAN et al., 2007; SANGWAN et al., 2001)

O cultivo *in vitro* convencional comumente é heterotrófico ou fotomixotrófico. Os explantes cultivados em recipientes com alta umidade relativa do ar, alta concentração de etileno, baixa concentração de CO₂ e baixa taxa fotossintética, utilizam a sacarose como fonte de carbono exógena. Com a utilização desses métodos a taxa de sobrevivência durante a aclimatização é relativamente baixa (KOZAI; KUBOTA, 2001; ZOBAYED et al., 2004). Com isso, o estímulo de uma micropropagação fotoautotrófica com o objetivo de promover o crescimento e a taxa fotossintética, pode aumentar a sobrevivência durante a aclimatização. Para induzir o crescimento fotoautotrófico torna-se necessário retirar a sacarose do meio de cultivo, aumentar a intensidade luminosa e CO₂ (CRISTIANO; WULFF, 2005). Para isso, a utilização de frascos com sistema de ventilação natural através de membranas permeáveis nas tampas, tem melhorado a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de biomassa seca (SALDANHA et al., 2012; XIAO; KOZAI, 2006).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência de diferentes reguladores de crescimento, espectros de luz, sistema de ventilação natural e concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* de *L. rotundifolia* Cham e composição química volátil.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos botânicos, agronômicos e químicos da espécie.

A família Verbenaceae é composta por 36 gêneros e 1000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005), ocorrendo em regiões tropicais, subtropicais e temperadas da América, África e Índia, sendo um dos centros de mais alta diversidade as regiões subtropicais da América do Sul (SANDERS, 2001). No Brasil, a família é representada principalmente pelos gêneros *Aloysia*, *Clerodendrum*, *Lantana*, *Lippia* e *Verbena*, e as regiões de maior ocorrência são os estados do Sudeste, Bahia, Mato Grosso do Sul, Paraná e Goiás (FUNCH; HARLEY; FUNCH, 2004; GIULIETTI, 2002; GIULIETTI et al., 2005; LORENZI, 1998; SALIMENA-PIRES; GIULIETTI, 1998).

O gênero *Lippia* é o segundo maior da família Verbenaceae, possui aproximadamente 160 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, muitas das quais são ricas em óleos essenciais, cujos maiores centros de dispersão se encontram em países das Américas do Sul e Central, como também em territórios da África tropical (CAVALCANTI et al., 2010; MENDES et al., 2010; PASCUAL et al., 2001; VICCINI et al., 2006). Muitas das espécies brasileiras são endêmicas e estão concentradas na Serra do Espinhaço, Minas Gerais e Goiás, onde crescem entre rochas. Devido às suas características e à atividade humana nestas regiões, como a mineração, por exemplo, estas espécies endêmicas estão em risco de extinção (GIULIETTI et al., 2005; LEITÃO et al., 2008; RESENDE et al., 2015; SALIMENA-PIRES; GIULIETTI, 1998; TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996).

No gênero *Lippia*, a presença de óleos essenciais tem sido associada à presença de tricomas glandulares, os quais normalmente são de formas variadas entre grupos vegetais, mas em geral uniformes dentro de um mesmo táxon (SANTOS; INNECCO; SOARES, 2004; TOZIN; MARQUES; RODRIGUES, 2015). O gênero é caracterizado por apresentar plantas arbustivas ou subarbustivas; inflorescências em espigas, racemos ou corimbos terminais; brácteas verdes imbricadas, membranáceas, róseas, planas ou livres; fruto esquizocarpo (SALIMENA-PIRES; GIULIETTI, 1998; SALIMENA, 2002; SALIMENA; SILVA, 2009).

Desde a década de 90, pode-se observar que muitas espécies do gênero *Lippia* têm sido muito estudadas do ponto de vista químico, com vários trabalhos sobre

espécies brasileiras (LEMOS et al., 1990; STASHENKO et al., 2010; TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996; TREVISAN et al., 2016; VIEIRA, 1999). Apesar de possuírem grande potencial socioeconômico, em virtude da produção de metabólitos secundários, como os óleos essenciais, e pela utilização na medicina popular, são ainda poucos estudos, levando em consideração o grande número de espécies existentes. Os estudos fitoquímicos, farmacológicos e agrônômicos, sendo que, até o momento, nenhuma ação de domesticação foi desenvolvida com essas espécies.

Contrastando com este amplo uso popular, relativamente poucos estudos farmacológicos vêm sendo relatados para o gênero *Lippia*, concentrando-se majoritariamente sobre as atividades antimicrobiana, antifúngica, repelente ou larvicida de seus óleos essenciais (FUNARI et al., 2012; GOMIDE et al., 2013; PASCUAL et al., 2001). Dentre as espécies mais estudadas quanto as suas propriedades medicinais e aromáticas estão *Lippia alba* Mill. NE Brown com ação sedativa, antiespasmódica, estomáquica, anti-inflamatória e antipirética (AGUIAR; COSTA, 2005; HENNEBELLE et al., 2008; PEIXOTO et al., 2015; VIANA et al., 2000); *L. siddoides* Cham com efeito antisséptico, anti-inflamatório e cicatrizante (BOTELHO et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2010; LIMA et al., 2011), *L. origanoides* H.B.K. e *L. multiflora* Moldenke com ação contra malária e no tratamento de hipertensão (BASSOLE et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; STASHENKO et al., 2010); *L. gracilis* Schauer com ação analgésica e anti-inflamatória (BITU et al., 2015; GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011; MENDES et al., 2010); *L. chevalieri* Moldenke (BASSOLE et al., 2003), *L. microphylla* Cham. (SIMÕES et al., 2015) um número pequeno quando levando em conta o grande número de espécies que abrange este gênero, e todas com forte potencial medicinal e aromático.

Segundo levantamento realizado por Pascual et al. (2001), deste gênero tem sido isolados ou identificados constituintes químicos de diversas classes, entre elas estão os terpenos, ácidos fenólicos, flavononas, iridroides, cumarinas, alcaloides e saponinas. A composição química do óleo essencial de muitas espécies de *Lippia* tem sido investigada, demonstrando que os compostos limoneno, p-cimeno, β -cariofileno, β -ememeno, α -pineno, α -tujeno, mircenona, carvonacânfora, linalol, 1,8-cineol, neral e timol são os mais frequentemente encontrados (LEITÃO et al., 2008; MAIA et al., 2005; SILVA et al., 2010; SORO et al., 2015; TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996; TREVISAN et al., 2016; ZOGHBI et al., 2002).

Com interesse em espécies de *Lippia* que ocorrem no Brasil, *Lippia rotundifolia* Cham se destaca por ser endêmica do Cerrado e pelo pouco estudo desta espécie. É encontrada na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e está em risco de extinção (LEITÃO et al., 2008; RESENDE et al., 2015). Portanto, torna-se imprescindível a realização de estudos mais aprofundados de âmbito farmacológico, terapêutico e agrônomico, para o cultivo em larga escala e a conservação desta espécie.

A espécie *L. rotundifolia* se caracteriza por possuir um sistema desenvolvido no subsolo, folhas coriáceas, e inflorescências corimbo com flores rosa, é fortemente aromática, devido a uma densa camada de tricomas glandulares. Existem poucos estudos de suas propriedades medicinais, bem como pouco se sabe de sua fitoquímica. Poucos estudos foram realizados no que diz respeito à composição de seu óleo essencial, mas na única literatura a esse respeito foram encontrados como majoritários o limoneno, mircenona, α -pineno e mircenal dentre compostos majoritários (LEITÃO et al., 2008; SALIMENA, 2002). Estudos agrônomicos da espécie são escassos, sabe-se apenas que possui relativamente uma baixa taxa de germinação das sementes, atingindo a um máximo de 40 por cento quando estimuladas com concentrações de GA₃ (PIMENTA et al., 2007). Quanto aos métodos de propagação vegetativa convencional, apontam baixos percentuais de enraizamento e de sobrevivência de mudas (RESENDE et al., 2015; SALIMENA; SILVA, 2009).

Com base nessas informações levanta-se uma dos grandes entraves na utilização das plantas medicinais pelas indústrias farmacêuticas, o fato da maioria deste material vegetal ser proveniente do extrativismo, podendo ocasionar dessa maneira a extinção da espécie (CORREIA JUNIOR; SCHEFFER; MING, 2006; GIULIETTI et al., 2005; VIEIRA, 1999). Essa forma de coleta pode ainda oferecer um produto que não tem regularidade, qualidade e quantidade que o mercado demanda, justificando a importância de mais estudos e desenvolvimento de novas técnicas de cultivo dessa espécie.

2.2. Químicos voláteis

2.2.1. Definições básicas

Os químicos voláteis presentes numa planta consistem numa mistura complexa de compostos químicos, cada um dos quais possui certas propriedades químicas e físicas

que, em combinação com as suas diferentes proporções, dão aos óleos características distintas. Os químicos voláteis são principalmente compostos por terpenóides (mono-, sesqui- e di-terpenos), estes são entre os compostos secundários mais valiosos produzidos pelas plantas, lado a lado com substâncias fenólicas como os fenilpropanóides (FIGUEIREDO et al., 2008).

O óleo essencial é internacionalmente definido como o produto obtido de uma planta ou das suas partes, por destilação (hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor), ou, para os frutos cítricos, por processo mecânico apropriado sem aquecimento, designado expressão (FIGUEIREDO et al., 2008; FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO, 2007).

Óleos essenciais possuem características físico-químicas peculiares: aparência oleosa a temperatura ambiente; volatilidade; aroma agradável; solubilidade em solventes orgânicos apolares. Geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; não são estáveis em presença de luz, ar, calor, umidade e metais; sendo que algumas destas propriedades são usadas na identificação e controle da qualidade dos óleos essenciais (CASTRO et al., 2004). Sua produção nos vegetais é determinada geneticamente, embora outros fatores possam acarretar alterações na produção dos metabólitos secundários, sobretudo quantitativamente, os quais representam uma interface química entre as plantas e o ambiente (BAKKALI et al., 2008; MORAIS, 2009).

2.2.2. Vias e locais de síntese de terpenóides

Químicos voláteis e óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de plantas aromáticas, sendo geralmente produzidos em estruturas secretoras especializadas, como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou bolsas específicas, que podem ser encontrados em diversas partes da planta tais como casca, folhas, flores e frutos (IBRAHIM et al., 2001). As classes químicas mais encontradas são os fenilpropanóides, terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) e seus derivados oxigenados (BASER; DEMIRCI, 2007; BURT, 2004). A origem desses compostos se dá por vias metabólicas distintas: os terpenóides são pela rota do ácido mevalônico; já a síntese dos fenilpropanóides ocorre pela via do chiquimato (ISMÁN; MIRESMAILLI; MACHIAL, 2011; SANGWAN et al., 2001).

A formação de unidades C₅ básicas, isopentenil-difosfato (IPP) e o de dimetil-alil-difosfato (DMAPP) prosseguem através de duas vias alternativas: a via do ácido mevalônico a partir de acetil-CoA e a via dopiruvato com o gliceraldeído-3-fosfato. A via de piruvato-gliceraldeído-fosfato, localizada nos plastídios, gera os IPP e DMAPP para a biossíntese de hemiterpenos, monoterpenos e diterpenos, enquanto que a via do ácido mevalônico ocorre no citosol e proporciona unidades C₅ para a biossíntese de sesquiterpenos e triterpenos. Na segunda fase da biossíntese de terpenos, IPP e DMAPP se condensam para formar de geranyl-difosfato (GPP), farnesil-difosfato (FPP) e de geranyl-geranyl-difosfato (GGPP), precursores dos monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, respectivamente (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004).

Os terpenóides são entendidos como os terpenos e seus análogos oxigenados, representam uma classe bastante variada e extensa de compostos. Eles são formados por várias unidades de isoprenos (C₅H₈) unidas, isso implica que os terpenóides seguem a razão de cinco átomos de carbono para oito de hidrogênio, quando não há insaturações (duplas ligações ou anéis). Esses compostos são subdivididos em algumas classes de acordo com o número de unidades de isoprenos existentes. Os monoterpenos, tipo mais comum nos óleos essenciais, são isômeros compostos por duas unidades de isopreno, isto é, possuem 10 átomos de carbono. Os sesquiterpenos, por sua vez são formados por três unidades, ou seja, 15 carbonos, enquanto, os diterpenos, os triterpenos e os tetraterpenos (carotenoides) são formados, respectivamente, por quatro, seis e oito unidades isoprênicas (BASER; DEMIRCI, 2007; CARSON; HAMMER, 2011; STEWART, 2006).

2.2.3. Fatores que influenciam a produção de óleos essenciais e químicos voláteis

A composição química dos químicos voláteis depende de uma grande variedade de fatores que vão desde as especificidades edafoclimáticas do local onde a planta se encontra até o método utilizado para a obtenção do produto. A literatura considera o tipo de planta e as características do solo (macro e micro nutrientes), a disponibilidade hídrica e a intensidade luminosa como importantes fatores na determinação tanto da quantidade produzida, de óleo essencial e químicos voláteis, como mudanças na sua composição química (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MORAIS, 2009).

Outros fatores como clima, época do ano, localização geográfica da espécie, ataque de patógenos e fatores genéticos também influenciam no tipo de material

obtido (CASTELO; MENEZZI; RESCK, 2010; FIGUEIREDO et al., 2008). O estágio em que se encontra o indivíduo é outro fator que modifica de forma significativa o conteúdo dos metabólitos secundários. Provavelmente isso ocorre em virtude das necessidades da planta se modificar conforme a etapa de seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2005).

2.2.4. Análise da fração volátil por HS-GC/EM

O método de extração utilizado principalmente em materiais provenientes de cultura de tecido vegetal é o *headspace*. O *headspace* acoplado a cromatografia gasosa (HS-GC) em ambas as suas versões dinâmica e estática é utilizado principalmente por permitir a determinação de analitos em baixas concentrações. No *headspace* estático, a extração da fração volátil é realizada num único passo ou num número limitado de passos. A amostra é submetida a uma temperatura pré-selecionada que varia de acordo com a amostra utilizada até certo período de tempo até que o equilíbrio é atingido entre a fase de amostra e a fase gasosa do frasco de amostra. Subsequentemente, uma alíquota única é injetada no GC, que o leva então à coluna onde os compostos químicos voláteis são separados da maneira usual (HANDA et al., 2008).

Por outro lado, a técnica de *headspace* dinâmico consiste em dois ou três passos separados, sendo o primeiro a extração contínua de gás. A amostra é purgada continuamente com um gás inerte (o gás de purga), até que todos os compostos químicos da fração volátil sejam removidos. Durante este passo, a fração volátil extraída do recipiente da amostra é conduzida através de uma *trap*, que está a uma temperatura mais baixa ou contendo um adsorvente. Esta *trap* retarda os analitos voláteis purgados da amostra. Quando a extração da fração volátil está completa, os analitos condensados ou adsorvidos pelo aquecimento rápido da *trap* agora são purgados com o gás de arraste (HANDA et al., 2008).

A CG-EM é uma ferramenta de análise poderosa, pois, além de fornecer o tempo de retenção dos diferentes constituintes da amostra, ainda pode fornecer informações sobre suas estruturas através dos espectros de massas gerados em cada pico (MCNAIR; MILLER, 2009). A reprodutibilidade desses espectros permitiu a construção de bibliotecas comerciais de compostos como NIST/WPA/NIH e Wiley Registry of Mass Spectral Data (MARRIOTT; SHELLIE; CORNWELL, 2001; SHELLIE et al., 2002). Com o advento das bibliotecas espectrais foram desenvolvidos procedimentos de busca

que utilizam ferramentas estatísticas e computacionais para identificar os compostos da amostra através da comparação do espectro de massas obtido experimentalmente com espectros de referência (AUSLOOS et al., 1999; HÜBSCHMANN, 2015; SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011; STEIN, 1995).

Van den Dool e Kratz (1963) constataram, no entanto, que o tempo de retenção podia ser diretamente empregado no cálculo dos índices de retenção quando houvesse um gradiente de temperatura. Define-se, assim, índice de retenção como o tempo de retenção de um composto normalizado pelo tempo de retenção de dois n-alcenos eluídos adjacientemente (CASTELLO, 1999; GONZALEZ; NARDILLO, 1999; MÜHLEN; MARRIOTT, 2011). Os índices de retenção, após determinados, são comparados com valores de tabelas de referência (HÜBSCHMANN, 2015; MCNAIR; MILLER, 2009). Ao contrário dos índices de Kovats, os índices de retenção linear podem variar com as condições operacionais como o fluxo do gás carreador ou a programação de temperatura, assim, é importante que as condições experimentais sejam sempre as mesmas e iguais àquelas empregadas na referência utilizada para comparações (ZHAO et al., 2005).

2.3. Cultura de tecidos vegetais

2.3.1. Conceitos e utilização do cultivo *in vitro* de plantas medicinais

Uma das características mais notáveis das plantas está na capacidade de suas células somáticas desdiferenciar e retomar a divisão celular e produzir novas plantas. Entretanto, a alteração do programa ontogenético é um complexo mecanismo, pois nem todas as células adquirem competência para expressar a desdiferenciação celular. Dessa maneira, a caracterização fisiológica de tecidos e órgãos é fundamental para aplicação do princípio da desdiferenciação celular visando a organogênese ou a embriogênese somática *in vitro* (GUEYE et al., 2009; LAKSHMANAN; TAJI, 2000).

A alteração do programa ontogenético é regulada, especialmente, pela auxina exógena que, de acordo com sua concentração, pode favorecer determinada rota do desenvolvimento celular (CHRISTIANSON; WARNICK, 1988; FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; SUGIYAMA, 1999). Numa primeira fase, denominada de aquisição de competência organogenética, ocorrem alterações citológicas em resposta aos sinais hormonais. Entende-se por competência celular a habilidade das

células somáticas em expressar a capacidade da desdiferenciação celular. A fase seguinte é a de determinação em que o programa celular é direcionado para um alvo morfogênético específico. A última fase é a da diferenciação em que as células expressam a morfogênese ou a calogênese (CHRISTIANSON; WARNICK, 1983; DUCLERCQ et al., 2011).

Em relação aos reguladores de crescimento, a concentração e o balanço de auxinas e citocininas são fatores determinantes na diferenciação celular e no padrão de desenvolvimento *in vitro* (GUEYE et al., 2009; JUNAID et al., 2007; MOTOIKE et al., 2007). As auxinas desencadeiam os processos de desdiferenciação e rediferenciação *in vitro*, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas dos explantes (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003). As citocininas estimulam a divisão celular e podem induzir a embriogênese somática. O conhecimento dos fatores que regulam o processo de desdiferenciação e rediferenciação celular é uma etapa fundamental na regeneração de plantas *in vitro* (MELLO; MELO; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2000).

O cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui assim uma alternativa para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal. Técnicas como micropropagação, culturas de calos, raízes e suspensão celular de plantas medicinais, aromáticas e condimentares podem ser aplicadas, visando não só a propagação em escala comercial de genótipos superiores como a produção de metabólitos secundários (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2001; MATKOWSKI, 2008; MURTHY; LEE; PAEK, 2014; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002). Além disso, podem ser consideradas como ferramentas promissoras para a preservação de recursos genéticos vegetais, bem como para a propagação comercial de plantas medicinais (DICOSMO; MISAWA, 1995; MORAIS et al., 2012; SONIYA; DAS, 2002)

A micropropagação é um método alternativo de propagação vegetativa amplamente estudada nas diversas espécies vegetais, sendo a técnica dentro da cultura de tecidos que mais tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Entre as vantagens da utilização está a possibilidade de obter várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; a redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; as melhores condições sanitárias; a reprodução do genótipo da planta-mãe, com fidelidade durante a multiplicação e a propagação

vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (ERIG; SCHUCH, 2005; GUPTA; KHANUJA; KUMAR, 2001).

Quando plantas medicinais estão sendo propagadas para a extração de metabólitos secundários, como por exemplo, o óleo essencial, fatores como condições climáticas, água e doenças interferem na produção desses metabólitos (CHANG; ALDERSON; WRIGHT, 2008; DÖRNENBURG; KNORR, 1995; MORAIS, 2009; ZUZARTE et al., 2010). Desta forma, a micropropagação é um instrumento interessante para se simular condições ambientais em um ambiente completamente controlado (CANTER; THOMAS; ERNST, 2005; DINIZ et al., 2006; PACHECO et al., 2016; ZOBAYED; SAXENA, 2004).

2.3.2. Fatores que afetam o cultivo *in vitro* de plantas medicinais

Protocolos de micropropagação são específicos para cada espécie, pois cada espécie vegetal possui particularidade sejam fisiológicas, como anatômicas e adaptações próprias a condições ambientais de origem. Fatores desde a escolha do tipo de explante, escolha do tipo de meio de cultivo adequado, concentração de solutos e minerais no meio, uso ou não de reguladores de crescimento, intensidade luminosa adequada, aclimatização, são fatores que interferem na eficiência do cultivo *in vitro* (GEORGE, 1993; HERRERA-MORENO; CARRANZA; CHACÓN-SÁNCHEZ, 2013; MORAIS, 2009). Os meios de cultura mais utilizados são o MS desenvolvido por Murashige e Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o WPM (Wood Plant Medium) formulado por Lloyd e McCown (LLOYD; MCCOWN, 1980), o B5 estabelecido por Gamborg (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968) e o White (WHITE, 1943).

Um dos principais fatores que interferem na micropropagação é a manipulação de reguladores de crescimento, tais como auxinas e citocininas, isolados ou em combinações, para determinar um rápido crescimento de células, acompanhado do desenvolvimento organizado de raízes e parte aérea (BALARAJU et al., 2008; DINIZ et al., 2006; GARRIGA CARABALLO et al., 2010; MORALES et al., 1999). As auxinas são geralmente utilizadas quando o propósito for o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular, a formação de raízes e a embriogênese dos cultivos em suspensão (PARVEEN; SHAHZAD, 2011; SAUER; ROBERT; KLEINE-VEHN, 2013; WU; CHEN; CHANG, 2004; ZIELIŃSKA et al., 2011).

As citocininas são associadas ao crescimento, participando no controle da divisão celular, formação de órgãos (principalmente os aéreos), desenvolvimento de brotações e aumento da biomassa (ASMAR et al., 2011; FIRMINO JUNIOR et al., 2014; GARLET; FLORES; MESSCHMIDT, 2011; GRAÇA et al., 2001; MURTHY; MURCH; SAXENA, 1998). É bastante comum a utilização de um equilíbrio de auxinas e citocininas no processo de diferenciação, e também para estimular o acúmulo de metabólitos nos tecidos vegetais, bem como aumentar a produção de óleos essenciais em plantas aromáticas (CATTELAN et al., 2007; FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2001; SANGWAN et al., 2001).

A luz é o principal fator que controla o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo das plantas, sendo afetadas pela irradiância em todos os estágios do seu crescimento (COSTA et al., 2012; COSTA; CHAGAS, 2014). Estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de plantas medicinais e aromáticas têm demonstrado diferentes respostas em função da intensidade luminosa e do controle do espectro de luz durante o cultivo (ALVARENGA et al., 2015; CHANG; ALDERSON; WRIGHT, 2008).

A fonte de luz tradicional utilizada na cultura *in vitro* é a luz branca fluorescente. O número de lâmpadas utilizada na sala de cultivo pode variar com o objetivo de achar intensidade de luz mais adequada de acordo com cada espécie estudada. Os diodos emissores de luz (LEDs) como uma nova fonte de energia têm muitas vantagens em comparação com a fonte de luz tradicional, porque os LEDs têm uma vida longa, especificidade de comprimento de onda e largura de banda estreita, o que permite podermos ver diretamente a influência de uma faixa de comprimento de onda mais específica no desenvolvimento da planta (LIN et al., 2011; YEH; CHUNG, 2009).

Um dos desafios enfrentados pela cultura de tecidos é a aclimatização, que muitas vezes não apresentam boas taxas de sobrevivência (HAZARIKA, 2003). No cultivo *in vitro* convencional (heterotrófico), se utilizam um sistema fechado sem trocas gasosas entre o meio *in vitro* e *ex vitro*, devido a isso há baixas taxas de transpiração e fotossíntese, restrição de absorção de água e nutrientes, o que reduz a taxa de crescimento do explante (SALDANHA et al., 2012). A alta umidade relativa no interior do frasco contendo meio de cultura reduz a deposição de ceras epicuticulares, bem como o desenvolvimento de estômatos funcionais, o que pode levar a perdas durante a aclimatização (CHANDRA et al., 2010).

O cultivo *in vitro* convencional pode ser heterotrófico ou fotomixotrófico. Quando fotomixotrófico, as plântulas utilizam a sacarose do meio de cultivo como fonte de energia química (KOZAI; KUBOTA, 2001; NGUYEN; KOZAI, 2001). Com isso, fica reduzida sua taxa de fotossíntese, podendo resultar no aumento da mortalidade de plantas no momento da aclimatização (HAZARIKA, 2003; SCHUELTER et al., 2015).

O uso de uma micropropagação do tipo fotoautotrófica possui muitas vantagens, como a promoção de crescimento e fotossíntese, maiores porcentagens de sobrevivência de plantas na aclimatização, eliminação de desordens fisiológicas e morfológicas, e pouca perda de material devido à contaminação (KOZAI; KUBOTA, 2001; XIAO; NIU; KOZAI, 2011). Kozai et al., (2010) afirmaram que uma simples maneira de permitir a troca gasosa entre o explante e o ambiente, através de uma forma de ventilação natural, é através da utilização de tampas com filtros.

Atualmente, várias membranas estão comercialmente disponíveis, que promovem a troca gasosa em vasos de cultura *in vitro*, entretanto possuem um alto custo para manutenção. Saldanha et al. (2012) desenvolveram membranas construídas artesanalmente combinando fita microporosas e politetrafluoroetileno (PTFE) como alternativa mais econômica as membranas comerciais. Estas membranas manufaturadas tem sucesso na propagação *in vitro* promovendo um aumento das trocas gasosas.

Numerosos estudos, os benefícios do uso de discos de membrana permeáveis a gás no aumento do crescimento e qualidade das plântulas a partir do uso do sistema de ventilação natural, como os estudos iniciais por Kozai et al (1988) em tomates, Kozai e Iwanami (1988) com *Dianthus caryophyllus* L., Ngyun e Kozai (2001) com banana, Xiao et al (2003) com cana-de-açúcar, Lucchesini et al (2006) com mirtilo, Liao et al (2007) com gerbera, Xiao e Kozai (2006) com *Limonium latifolium*, Zhang et al (2009) com *Momordica grosvenori*, entre diversos outros artigos publicados até hoje.

3. REFERÊNCIAS

AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): Levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 1, p. 79–84,

2005.

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

ASMAR, S. A. et al. Citocininas na multiplicação in vitro de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. SPECIAL ISSUE, p. 533–538, 2011.

AUSLOOS, P. et al. The critical evaluation of a comprehensive mass spectral library. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 10, n. 4, p. 287–299, 1999.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BALARAJU, K. et al. Micropropagation of *Vitex agnus-castus*, (Verbenaceae)---a valuable medicinal plant. **In Vitro Cellular {&} Developmental Biology - Plant**, v. 44, n. 5, p. 436, 2008.

BASER, K. H. C.; DEMIRCI, F. Chemistry of essential oils. In: BERGER, R. G. (Ed.). **. Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Hannover: Springer, 2007. p. 43–86.

BASSOLE, I. H. N. et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 209–212, 2003.

BITU, V. et al. Effect of collection time on composition of essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) growing in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 5026, n. August 2016, 2015.

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349–356, 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–

253, 2004.

CANTER, P. H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 180–185, 2005.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and bioactivity of essential oils. In: THORMAR, H. (Ed.). . **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2011. p. 203–238.

CASTELLO, G. Retention index systems: alternatives to the n-alkanes as calibration standards. **Journal of Chromatography A**, v. 842, n. 1, p. 51–64, 1999.

CASTELO, A. V. M.; MENEZZI, C. H. S. DEL; RESCK, I. S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN¹H, ¹³C; IV) da química óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. **Cerne**, v. 16, n. 4, p. 573–584, 2010.

CASTRO, H. G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais metabólitos secundários**. 2. ed. Viçosa: Editora Visconde deo Rio Branco, 2004.

CATTELAN, L. V. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Matricaria recutita* utilizando diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl. 2, p. 201–203, 2007.

CAVALCANTI, S. C. H. et al. **Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch)** **Bioresource Technology**. [s.l: s.n.].

CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199–1205, 2010.

CHANG, X.; ALDERSON, P. G.; WRIGHT, C. J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1, p. 216–223, 2008.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. **Developmental Biology**, v. 95, n. 2, p. 288–293, 1983.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience (USA)**, 1988.

CORREIA JUNIOR, C.; SCHEFFER, M. C.; MING, L. C. **Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Brasília: Ministério de Desenvolvimento Agrário, 2006.

COSTA, A. G. et al. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta cultivada sob malhas. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 534–540, 2012.

COSTA, A. G.; CHAGAS, J. H. Níveis de sombreamento e tipos de malha no crescimento e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 194–199, 2014.

CRISTIANO, E. A.; WULFF, S. M. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, 2005.

DICOSMO, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 425–453, 1995.

DINIZ, J. D. N. et al. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do guaco. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 37, n. 1, p. 59–64, 2006.

DÖRNENBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 8, p. 674–684, 1995.

DUCLERCQ, J. et al. De novo shoot organogenesis: from art to science. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 11, p. 597–606, 2011.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of Plant Volatiles 1. **Plant physiology**, v. 135, p. 1893–1902, 2004.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Morfogênese de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 575–581, jun. 2005.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an

embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 3, p. 201–228, 2003.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213–226, 2008.

FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G. Plantas aromáticas e medicinais Óleos essenciais e voláteis. **Revista da APH**, v. 114, p. 29–33, 2007.

FIRMINO JUNIOR, P. C. P. et al. Efeito de diferentes citocininas e sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de Teca (*Tectona grandis* L.) estabelecida na Amazônia Sul- Ocidental. **Evidência**, v. 14, n. 1, p. 7–20, 2014.

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, n. 1, p. 1–4, 2001.

FUNARI, C. S. et al. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 2086–2094, 2012.

FUNCH, L. S.; HARLEY, R. M.; FUNCH, R. **Plantas úteis: Chapada Diamantina**. São Carlos: Rima, 2004.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151–158, 1968.

GARLET, T. M. B.; FLORES, R.; MESSCHMIDT, A. A. Influência de citocininas na Micropropagação de *Mentha x gracilis* Sole. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 30–34, 2011.

GARRIGA CARABALLO, M. et al. Management of auxin-cytokinin interaction to improve micropropagation protocol of Henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 70, n. 4, p. 545–551, 2010.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. Part 1: the technology**. Westbury, UK: Exegetics Limited, 1993.

GIULIETTI, A. M. Espécies endêmicas da caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B. et al. (Eds.). . **Vegetação e Flora da Caatinga. Associação plantas do nordeste – APNE.** Recife: Centro Nordestino de Informações sobre plantas - CNIP, 2002. p. 103–118.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52–61, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64–77, 2011.

GOMIDE, M. DA S. et al. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 6, p. 895–902, 2013.

GONZALEZ, F. R.; NARDILLO, A. M. Retention index in temperature-programmed gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 842, n. 1, p. 29–49, 1999.

GRAÇA, M. E. C. et al. Efeitos das citocininas benzilmino purina e thidiazuron, na multiplicação “*in vitro*” de brotações de *Eucalyptus dunnii* MAID. **Bol. Pesq. Fl.**, v. 43, p. 107–112, 2001.

GUEYE, B. et al. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 98, n. 1, p. 47–58, 2009.

GUPTA, S. K.; KHANUJA, S. P. S.; KUMAR, S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. **Current Science**, v. 81, n. 2, p. 206–210, 2001.

HANDA, S. S. et al. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants.** Trieste: International Centre for Science and High Technology, 2008.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704–1712, 2003.

HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of**

Ethnopharmacology, v. 116, n. 2, p. 211–222, 2008.

HERRERA-MORENO, A. M.; CARRANZA, C. E.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. Establishment of propagation methods for growing promising aromatic plant species of the *Lippia* (Verbenaceae) and *Tagetes* (Asteraceae) genera in Colombia. **Agronomía Colombiana**, v. 31, n. 1, p. 27–37, 2013.

HÜBSCHMANN, H.-J. **Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications**. 3. ed. Bremen: Wiley-VCH, 2015.

IBRAHIM, M. A. et al. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Food Science in Finland**, v. 10, p. 243–259, 2001.

ISMAN, M. B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 197–204, 2011.

JULIANI, H. R. et al. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, n. 3, p. 175–179, 1999.

JUNAID, A. et al. Growth regulators affect primary and secondary somatic embryogenesis in Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) at morphological and biochemical levels. **Plant Growth Regulation**, v. 51, n. 3, p. 271–281, 2007.

KOZAI, T. Photoautotrophic Micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, n. 4, p. 188–204, 2010.

KOZAI, T.; IWANAMI, Y. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under High Photon Fluxes on plantlet growth of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 57, n. 2, p. 279–288, 1988.

KOZAI, T.; KOYAMA, Y.; WATANABE, I. Multiplication and rooting of potato plantlets *in vitro* with sugar medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Hort* 230:121–127. **Acta Horticulturae**, v. 230, p. 121–123, 1988.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for

- Woody Plants. **Journal of Plant Research**, v. 114, n. 4, p. 525–537, 2001.
- LAKSHMANAN, P.; TAJI, A. Somatic embryogenesis in leguminous plants. **Plant Biology**, v. 2, p. 136–148, 2000.
- LEITÃO, S. G. et al. Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1388–1393, 2008.
- LEMOS, T. L. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, n. 2, p. 82–84, 1990.
- LIMA, R. K. et al. Chemical composition and effect of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 664–671, 2011.
- LIN, Y. et al. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 3, p. 329–335, 2011.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421–427, 1980.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 1998.
- LUCCHESINI, M. et al. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different in vitro culture conditions. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 2, p. 161–168, 2006.
- MAIA, J. G. S. et al. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 676–680, 2005.
- MARRIOTT, P. J.; SHELLIE, R.; CORNWELL, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 936, n. 1, p. 1–22, 2001.

MATKOWSKI, A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants — A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 548–560, 2008.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic Gas Chromatography**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009.

MELLO, M. O.; MELO, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *Bauhinia forficata* link shoot regeneration: histological analysis of organogenesis pathway. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 4, 2000.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391–397, 2010.

MORAIS, T. P. et al. Applications of tissue culture in medicinal plants. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012.

MORAIS, L. A. S. DE. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. S4050–S4063, 2009.

MORALES, C. F. G. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA**, v. 5, n. 3, p. 174–177, 1999.

MOTOIKE, S. Y. et al. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 75–81, 2007.

MÜHLEN, C. VON; MARRIOTT, P. J. Retention indices in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 8, p. 2351–2360, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. **Physiol. Plant**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 34, p. 267–275, 1998.

MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from

cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1–16, 2014.

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T. Growth of *In vitro* banana (*Musa* SPP.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **In Vitro Cellular {&} Developmental Biology - Plant**, v. 37, n. 6, p. 824, 2001.

OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236–240, 2006.

OLIVEIRA, M. J. et al. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 3, p. 275–285, 2005.

PACHECO, F. V. et al. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 251–257, 2016.

PARVEEN, S.; SHAHZAD, A. A micropropagation protocol for *Cassia angustifolia* Vahl. from root explants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 3, p. 789–796, 2011.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201–214, 2001.

PEIXOTO, M. G. et al. Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 31–36, 2015.

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

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

RESENDE, C. F. DE et al. In vitro propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian campos rupestres. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 46, n. 3, p. 582–589, 2015.

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

SALIMENA-PIRES, F. R.; GIULIETTI, A. M. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 17, p. 155–186, 1998.

SALIMENA, F. R. G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 40, n. 1–4, p. 121–125, 2002.

SALIMENA, F. R. G.; SILVA, T. R. S. Flora de Grão-mogol, Minas Gerais: VERBENACEAE. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 27, n. 1, p. 119–120, 2009.

SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the Southeastern United State. **Havard Papers in Botany**, v. 5, n. 2, p. 303–358, 2001.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regul.**, v. 34, n. 1, p. 3–21, 2001.

SANTOS, M. R. A DOS; INNECCO, R.; SOARES, A. A. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. 2, p. 377–383, 2004.

SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 9, p. 2565–77, 1 jun. 2013.

SCHUELTER, A. R. et al. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial in vitro de plântulas de Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 183–190, 2015.

SHELLIE, R. et al. Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography–mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 970, n. 1, p. 225–234, 2002.

SILVA, P. S. et al. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of

Lippia and *Lantana* species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 843–849, 2010.

SIMÕES, E. R. B. et al. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. **Journal of intercultural ethnopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 256–63, 2015.

SONIYA, E. V; DAS, M. R. In vitro micropropagation of Piper longum -- an important medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, n. 3, p. 325–327, 2002.

SORO, L. C. et al. Chemical Composition of Leaf Essential Oils of *Lippia multiflora* Mold. Grown in Savannah and Forest Area in the Ivory Coast. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 1, p. 154–160, 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática – guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira baseado em APG II**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z. E.; KITSON, F. G. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Inc., 2011.

STASHENKO, E. E. et al. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 93–103, 2010.

STEIN, S. E. Chemical substructure identification by mass spectral library searching. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 6, n. 8, p. 644–655, 1995.

STEWART, D. **The chemistry of essential oils made simple: god's love manifest in molecules**. 2. ed. London: Care, 2006.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, n. 1, p. 61–64, 1999.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential Oil Constituents of the Genus *Lippia* (Verbenaceae)-A Literature Review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 5, p. 471–485, 1996.

TOZIN, L. R. S.; MARQUES, M. O. M.; RODRIGUES, T. M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* kunth (Verbenaceae) in the brazilian cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 87, n. 2, p. 943–953, 2015.

TREVISAN, M. T. S. et al. Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: Identification, quantitation and antioxidant capacity. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 4, p. 485–496, 2016.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, n. 3, p. 463–471, 1963.

VIANA, G. S. DE B. et al. Anticonvulsant activity of essential oils and active princeples from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 23, n. 11, p. 1314–1317, 2000.

VICCINI, L. F. et al. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1, p. 171–178, 2006.

VIEIRA, R. F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. **Perspectives on new crops and new uses**, p. 152–159, 1999.

WHITE, P. R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster: Jaques Cattell Press, 1943.

WU, I.-F.; CHEN, J.-T.; CHANG, W.-C. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, n. 1, p. 107–109, 2004.

XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic Growth and Net Photosynthetic Rate of Sweet Potato Plantlets In Vitro as Affected by the Number of Air Exchanges of the Vessel and Type of Supporting Material. **Tsinghua Science & Technology**, v. 11, n. 4, p. 481–489, 2006.

XIAO, Y.; LOK, Y. H.; KOZAI, T. Photoautotrophic growth of sugarcane plantlets in vitro as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges. **In Vitro Cellular {&} Developmental Biology - Plant**, v. 39, n. 2, p. 186–192, 2003.

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

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

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

ZHAO, C.-X. et al. Temperature-programmed retention indices for gas chromatography–mass spectroscopy analysis of plant essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1096, n. 1, p. 76–85, 2005.

ZIELIŃSKA, S. et al. Influence of plant growth regulators on volatiles produced by in vitro grown shoots of *Agastache rugosa* (Fischer & C.A.Meyer) O. Kuntze. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 107, n. 1, p. 161, 2011.

ZOBAYED, S. M. A. et al. Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, n. 5, p. 450–458, 2004.

ZOBAYED, S.; SAXENA, P. K. Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, n. 1, p. 108–114, 2004.

ZOGHBI, M. DAS G. B. et al. Volatile constituents of *Lippia lupulina* Cham. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p. 29–31, jan. 2002.

ZUZARTE, M. R. et al. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 580–587, 2010.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

REGULADORES DE CRESCIMENTO E RELAÇÃO NO₃:NH₄⁺ NA MICROPROPAGAÇÃO E ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE *Lippia rotundifolia* Cham.

GROWTH REGULATORS AND NO₃:NH₄⁺ RELATIONSHIP IN MICROPROPAGATION AND ANALYSIS OF VOLATILE FRACTION OF *Lippia rotundifolia* Cham.

RESUMO

Lippia rotundifolia Cham. é uma Verbenaceae endêmica do Cerrado, aromática, rica em monoterpenos. A micropropagação tem sido muito utilizada na multiplicação de várias espécies com propriedades medicinais com dificuldade na propagação convencional e para obtenção de um material homogêneo. Objetivou-se com este trabalho verificar o efeito na proliferação de brotos de diferentes reguladores de crescimento, em diferentes concentrações e na produção de compostos voláteis. O experimento da combinação de BAP e ANA consistiu em 15 tratamentos com BAP nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,5; 2,5 e 3,5 mg L⁻¹ e ANA nas concentrações de 0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹. No experimento de combinação de TDZ e ANA, as concentrações de TDZ utilizadas foram 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ e de ANA foram 0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹, totalizando 15 tratamentos. No bioensaio de interação entre TDZ e diferentes taxas de NO₃:NH₄⁺ foram utilizadas TDZ nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹ e taxas de NO₃:NH₄⁺ de 2, 7, 9 e 11, totalizando 16 tratamentos. Todos os experimentos após 45 dias foram avaliados os seus parâmetros biométricos. Concentrações de 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ de TDZ obtiveram maior número de brotos, porém com alta porcentagem de hiperhidricidade e calos. A relação entre NO₃:NH₄⁺ foi eficiente minimizando a porcentagem de hiperhidricidade nas plântulas submetidas ao TDZ. O BAP e o ANA reduziram os teores de mircenos em todas as concentrações utilizadas, porém o TDZ mesmo na concentração de 2,0 mg L⁻¹ sem adição de ANA apresentou alto teor de mircenos. Os teores de limoneno aumentaram nas maiores concentrações de BAP com ou sem ANA, porém quando utilizado TDZ e ANA, nas concentrações médias também houve aumento do teor de limoneno. Nas altas concentrações de BAP com ou sem ANA, observou-se um aumento no teor de mircenos, um resultado similar foi encontrado quando utilizado TDZ. Apenas em baixas concentrações de BAP e ANA (0,5 mg L⁻¹) houve aumento do teor de Z-ocimenona. Quando utilizado TDZ e ANA não houve diferença significativa no teor de Z-ocimenona.

Palavras-chave: Reguladores de crescimento, hiperhidricidade, químicos voláteis, planta medicinal, Verbenaceae.

ABSTRAT

Lippia rotundifolia Cham. is an endemic Cerrado Verbenaceae, aromatic, rich in monoterpenes. Micropropagation has been widely used in the multiplication of several species with medicinal properties with difficulty in the conventional propagation and to obtain a homogeneous material. The objective of this work was to verify the effect on the proliferation of shoots of different growth regulators, in different concentrations and in the production of volatile compounds. The experiment of the combination of BAP and NAA consisted of 15 treatments with BAP at concentrations of 0,0; 0,5; 1,5; 2,5 and 3,5 mg L⁻¹ and NAA at concentrations of 0,0; 0,5 and 1,0 mg L⁻¹. In the TDZ and NAA combination experiment, the TDZ concentrations used were 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 and 2,0 mg L⁻¹ and NAA were 0,0; 0,5 and 1,0 mg L⁻¹, totaling 15 treatments. In the interaction bioassay between TDZ and different rates of NO₃:NH₄⁺ + TDZ were used at concentrations of 0,0; 0,5; 1,0 and 1,5 mg L⁻¹ and NO₃:NH₄⁺ rates of 2, 7, 9 and 11, totaling 16 treatments. All experiments after 45 days were evaluated their biometric parameters. Concentrations of 1,5 and 2,0 mg L⁻¹ of TDZ obtained higher number of shoots, but with a high percentage of hyperhydricity and callus. The relationship between NO₃:NH₄⁺ was efficient by minimizing the percentage of hyperhydricity in the seedlings submitted to TDZ. The BAP and NAA reduced the levels of myrcene in all the concentrations used, but the TDZ even in the concentration of 2,0 mg L⁻¹ without NAA addition showed high myrcene content. The levels of limonene increased in the highest concentration of BAP with or without ANA, but when TDZ and NAA were used, the average concentrations also increased limonene content. At high concentrations of BAP with or without NAA, an increase in the myrcene content was observed, a similar result was found when using TDZ. Only at low concentrations of BAP and NAA (0,5 mg L⁻¹) did the Z-ochmenone content increase. When using TDZ and NAA there was no significant difference in the Z-ochmenone content.

Key words: Growth regulators, hyperhydricity, volatile chemicals, medicinal plants, Verbenaceae.

INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Lippia* apresentam importância econômica devido ao vasto uso dos seus óleos essenciais e às suas propriedades medicinais (PASCUAL et al., 2001). *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae), é uma espécie endêmica do Cerrado, encontrada na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais, caracterizada pela presença de tricomas glandulares em suas folhas, ricos em monoterpenos. Dentro dos compostos voláteis encontrados em *L. rotundifolia* estão presentes os compostos majoritários

limoneno, mirceno e mircenal (LEITÃO et al., 2008; RESENDE et al., 2015). Estudos agronômicos da espécie relatam sua baixa taxa de germinação, atingindo máximo de 40% quando submetido a concentrações de GA₃ e quanto a métodos de propagação vegetativa convencional, são baixos os percentuais de enraizamento e sobrevivência de mudas, tudo isso atrelado ao alto risco de extinção devido ao seu extrativismo ressalta a importância de mais estudos sobre essa espécie (PIMENTA et al., 2007; SALIMENA; SILVA, 2009).

Atualmente aplicações da biotecnologia em plantas medicinais têm sido bastante difundidas, com intuito de fornecer melhores materiais vegetais. Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a micropropagação é um método de propagação vegetativa em larga escala de espécies de interesse econômico, entre estas as plantas medicinais com valor farmacológico. Embora esta técnica tenha como desvantagem o custo elevado, a crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com capacidade de síntese de metabólitos secundários, justificam a sua utilização (LIMA et al., 2007; MORAIS et al., 2012).

Um dos principais fatores que interferem na micropropagação é a manipulação de reguladores de crescimento, tais como auxinas e citocininas, isolados ou em combinações, para determinar um rápido crescimento de células, acompanhado do desenvolvimento organizado de raízes e parte aérea (DINIZ et al., 2006). As auxinas são geralmente utilizadas quando o propósito for o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular, a formação de raízes e a embriogênese dos cultivos em suspensão (PARVEEN; SHAHZAD, 2011; SAUER; ROBERT; KLEINE-VEHN, 2013).

As citocininas devido o fenômeno de quebra da dominância apical e assim iniciar a proliferação de brotos ao crescimento, também são associadas à formação de órgãos (principalmente os aéreos) (ASMAR et al., 2011; FIRMINO JUNIOR et al., 2014). De acordo com a estrutura química, as citocininas são classificadas em dois grupos: as derivadas da adenina (como a 6-benzilaminopurina - BAP) e as derivadas das feniluréias (como o Thidiazuron - TDZ) (FLORES et al., 2009). Normalmente, o BAP é a mais eficiente das citocininas derivadas da adenina na fase de propagação *in vitro* (THIYAGARAJAN; VENKATACHALAM, 2012). A utilização do Thidiazuron tem demonstrado efeito tanto de auxina como de citocinina, embora, quimicamente é totalmente diferente das auxinas e citocininas mais utilizadas. (MURTHY; MURCH;

SAXENA, 1998; THOMAS; KATTERMAN, 1986). Inicialmente o TDZ foi usado apenas combinado a outros reguladores de crescimento, mas estudos posteriores confirmaram a eficiência do seu uso isolado como único regulador de crescimento para regeneração em muitas espécies de plantas lenhosas (MALIK et al., 2010).

É bastante comum a utilização de interação de auxinas e citocininas no processo de diferenciação. Foi verificado também que a utilização de reguladores de crescimento na cultura de tecidos em alguns casos pode estimular o acúmulo de metabólitos, bem como aumentar a produção de óleos essenciais em algumas plantas aromáticas (CATTELAN et al., 2007; FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2001; SANGWAN et al., 2001). Alguns trabalhos relacionados à micropropagação *in vitro* em espécies do gênero *Lippia* tem resultados positivos na produção de multibrotos e foi possível observar que os reguladores mais utilizados foram a citocinina BAP (6-benzilaminopurina) e a auxina ANA (ácido naftalenoacético) em meio MS (ASMAR et al., 2012; BLANK et al., 2008; HERRERA-MORENO; CARRANZA; CHACÓN-SÁNCHEZ, 2013; LUZ et al., 2014; MARINHO et al., 2011; RESENDE et al., 2015). Dessa forma, objetivou-se com este trabalho verificar o efeito na proliferação de brotos de diferentes reguladores de crescimento, em diferentes concentrações e na produção de compostos voláteis.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e estabelecimento do explante

Foram inicialmente coletadas mudas de aproximadamente 15 cm de *Lippia rontudifolia* Cham. em São Gonçalo do Rio das Pedras, área de Cerrado em Minas Gerais. Após a coleta, as mudas foram aclimatizadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, MG. Exsicatas foram depositadas no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) sob o registro número 58027.

Gemas axilares foram coletadas das plantas doadoras com aproximadamente 3 meses após aclimatização. Os materiais coletados foram colocadas em água corrente por 30 minutos, depois imersas sob agitação em uma solução de água sanitária (hipoclorito de sódio ativo de 1%) por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar estéril, os explantes foram lavados quatro vezes em água destilada e autoclavada, e inoculados explantes

deaproximadamente 1cm em tubos de ensaio (25x150mm) com tampa plástica contendo 15 mL de meio.

O meio de cultivo utilizado para estabelecimento foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) livre de regulador de crescimento, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar (A7921, Sigma-Aldrich®), e pH 5,7 ± 0,1 ajustado com NaOH e HCl (0,1 e 0,5 N), e autoclavado (125 °C, 15 minutos a 1,2 atm). Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com lâmpadas brancas frias fluorescentes e intensidade luminosa de 32 μmolm⁻²s⁻¹, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C.

Bioensaio de combinações de reguladores de crescimento

Na combinação entre citocininas e auxina, foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 1 cm, oriundos de plântulas pré-estabelecidas *in vitro*. O meio de cultivo utilizado foi o MS semissólido, suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento, isolados ou em combinação. O explante foi inoculado no tubo de ensaio (25 x 150mm) contendo 15 mL de meio MS suplementado ou não com reguladores de crescimento e mantido em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C.

No experimento entre 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido nafatlenoacético (ANA), o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), utilizando BAP (P.M.: 225,25, B3408, Sigma-Aldrich®) nas concentrações 0,0; 0,5; 1,5; 2,5 e 3,5 mgL⁻¹ e ANA (P.M.: 186,21, N0640, Sigma-Aldrich®) com 0,0; 0,5 e 1,0 mgL⁻¹, totalizando 15 tratamentos, com 4 repetições, sendo cada repetição composta por 10 tubos contendo uma plântula cada, num total de 40 plântulas por tratamento.

No experimento entre thidiazuron(TDZ) e ácido naftalenoacético (ANA), o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), utilizando TDZ (P.M.: 220,25, P6186, Sigma-Aldrich®) nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ e ANA com 0,0; 0,5 e 1,0 mgL⁻¹, totalizando 15 tratamentos, com 4 repetições, sendo cada repetição composta por 10 tubos contendo uma plântula cada, num total de 40 plântulas analisadas por tratamento.

Bioensaio da taxa de NO₃:NH₄⁺ em combinação com TDZ

No experimento de interação entre thidiazuron (TDZ) e diferentes taxas de nitrato e amônio, foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 1 cm, oriundos de plântulas pré-estabelecidas *in vitro*. O meio de cultivo utilizado foi o MS

semissólido, suplementado ou não com diferentes concentrações de TDZ e taxas de $\text{NO}_3/\text{NH}_4^+$, isolados ou em combinação. O explante foi inoculado em tubo de ensaio (25x150mm) contendo 15 mL de meio MS suplementado com regulador de crescimento e mantido em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), utilizando TDZ nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L^{-1} e diferentes taxas de nitrato e amônio: 1) taxa de $\text{NO}_3:\text{NH}_4^+$ de 2 com nitrogênio total de 60 mM (meio básico do MS); 2) taxa de $\text{NO}_3:\text{NH}_4^+$ de 7 com nitrogênio total de 40 mM; 3) taxa de $\text{NO}_3:\text{NH}_4^+$ de 9 com nitrogênio total 50 mM; 4) taxa de $\text{NO}_3:\text{NH}_4^+$ de 11/1 com com nitrogênio total 60 mM e todas as combinações, totalizando 16 tratamentos, com 4 repetições, sendo cada repetição composta por 10 tubos contendo uma plântula cada, num total de 40 plântulas analisadas por tratamento.

Avaliações dos dados biométricos dos bioensaios

Os dados biométricos foram coletados aos 45 dias. O número de brotos (NB) e o comprimento de brotos (CB), foram avaliados por contagem a olho nu, individualização das brotações e utilização de régua, foi realizada uma média do comprimento dos brotos. A porcentagem de hiperidricidade (Hip.), porcentagem de calos (Calo), porcentagem de raiz (Raiz), foram avaliados através de presença e ausência em cada plântula e posteriormente com base no total de explantes inoculados foi calculada a porcentagem. Os parâmetros de biomassa seca de caule (BSC.), biomassa seca de folhas (BSF), biomassa seca de raiz (BSR) e biomassa seca total (BST), foram realizados por meio de secagem do material vegetal, em estufa de circulação forçada de ar a 36 ± 2 °C, por aproximadamente 48 horas, até peso constante.

Análise de compostos voláteis por Headspace-CG/EM

Para a análise de compostos voláteis foram utilizados de folhas desidratadas de *L. rotundifolia* de cada tratamento e reunidas em uma amostra composta. Alíquotas individuais de 100 mg de biomassa seca de folhas em triplicata foram adicionadas em vials para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE até as análises.

Para extração da fração volátil de *L. rotundifolia* empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. As condições extrativas foram operadas pelos seguintes parâmetros:

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 automaticamente. A fração volátil foi analisada 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, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z a uma velocidade de 1,0 scan/s.

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 1,0mL/min; as temperaturas do injetor e da linha de transferência para o EM foram mantidas em 230 °C e 240°C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3°C/min até 230 °C, seguida de uma rampa de 10°C/min até 250°C, mantendo-se isotérmico por 1 minuto. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:20. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram expressas pela porcentagem de área normalizada dos picos cromatográficos.

Os constituintes da fração volátil foram identificados por comparação dos seus índices de retenção linear relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C₉-C₁₈, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST e do Adams (2017). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por Van den Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção da literatura Adams (2007).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Sisvar®(FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reguladores de crescimento na proliferação de brotos

No cultivo *in vitro* de explantes de *L. rotundifolia* Cham. quando suplementado com BAP e ANA observou-se maior proliferação de brotos a partir das concentrações mais altas de BAP e que na maioria dos tratamentos houve a formação de plântulas hiperídricas e com calos na base do explante (Fig1). Utilizando-se segmentos nodais

como explantes, foi possível a indução de 11 brotos axilares por explante nas concentrações de 2,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de ANA, e 11,6 brotos nas concentrações de 3,5 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ de ANA (Tabela 1).

Diversos autores utilizaram com eficiência o BAP para estimular brotações em plantas da família Verbenaceae (BALARAJU et al., 2008; BRAGA et al., 2012; PEIXOTO et al., 2006). Asmaret al. (2002) trabalharam com *Lippia alba* verificaram maior número de brotos (4) utilizando 1,5 mg L⁻¹ BAP. Contudo, Capote et al. (1999) observaram em *L. micromera* (Schau.), variedade Helleri, formação de 8 a 10 brotos quando foram utilizados 2,0 mg L⁻¹ de BAP em associação com ANA. Em *Lippia sidoides* Cham., não houve diferença significativa entre a suplementação com BAP e o controle, mesmo em concentrações de até 4 mg L⁻¹, demonstrando que a ação do regulador pode variar de acordo com a espécie (BLANK et al., 2008).

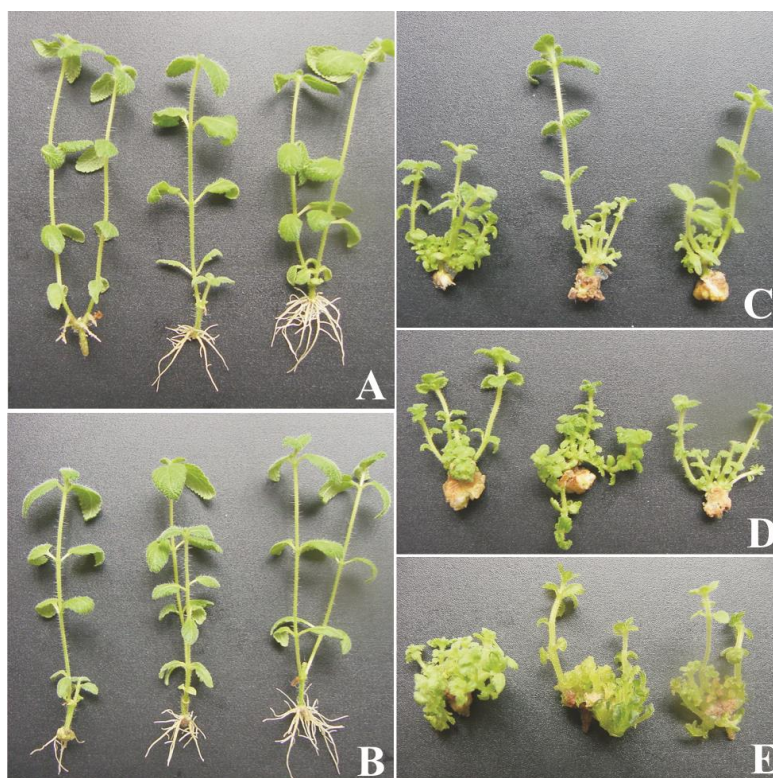


Figura 1. Plântulas de *L. rotundifolia* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA, durante 45 dias. **(A)** Concentração de 0,0 mgL⁻¹ de BAP combinado com concentrações de 0,0; 0,5 e 1,0 mgL⁻¹ de ANA; **(B)** Concentrações de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP combinado com concentrações de 0,0; 0,5 e 1,0 mgL⁻¹ de ANA; **(C)** Concentração de 1,5 mg L⁻¹ de BAP combinado com concentrações de 0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA; **(D)** Concentração de 2,5 mgL⁻¹ de BAP combinado com concentrações de 0,0; 0,5 e 1,0 mgL⁻¹ de ANA; **(E)** Concentração de 3,5 mgL⁻¹ de BAP combinado com concentrações de 0,0; 0,5 e 1,0 mgL⁻¹ de ANA.

No presente trabalho pudemos observar que houve alta porcentagem de hiperidricidade, 44% nas concentrações de 1,5 mg L⁻¹ de BAP e 100% nas concentrações de 3,5 mg L⁻¹ de BAP na presença ou ausência de ANA (Tabela 1). Resende et al. (2015) também observaram na mesma espécie um menor número de brotos (2,6 brotos) e uma grande porcentagem de hiperidricidade e calos em resposta ao BAP, principalmente nas maiores concentrações utilizadas (0,07 mg L⁻¹ de BAP).

Com a concentração acima de 2,5 mg L⁻¹ do regulador de crescimento BAP, houve redução do comprimento das brotações variando entre 1,16 a 1,95 cm (Tabela 1). O efeito inibitório do BAP sobre o comprimento dos brotos também foi reportada na multiplicação *in vitro* de *L. alba* (ASMAR et al., 2012) e também em *L. rotundifolia* Cham (RESENDE et al., 2015).

A presença de calos na base do explante foi observada em concentração acima de 1,5 mg L⁻¹ de BAP, mesmo quando combinados ou não com ANA (Tabela 1). Resende et al. (2015) utilizando concentrações de 0,07 a 0,22 mg L⁻¹ de BAP também observou indução de calogênese. Normalmente, meio de cultivo suplementado com concentrações mais elevadas de BAP inibe a formação do sistema radicular.

Com a utilização do BAP a porcentagem de enraizamento caiu drasticamente nas concentrações acima de 1,5 mg L⁻¹ de BAP com ou sem a adição de ANA, resultado similar ao encontrado por Resende et al. (2015). Com o aumento das concentrações de citocininas há maior investimento em parte aérea e um menor investimento na formação de raízes. Esta resposta é típica para os efeitos das citocininas na formação de raízes adventícias *in vitro*, que pode ocorrer em resposta ao desequilíbrio da razão endógena entre as auxinas e as citocininas naturais (SANTOS; ARRIGONI-BLANK; BLANK, 2012).

A biomassa seca de caule e folha variou com o suplemento ou não do regulador de crescimento no meio de cultivo. No geral, a biomassa seca do caule foi beneficiada por concentrações de 2,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de ANA (15 mg planta⁻¹) e 3,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de ANA (14 mg planta⁻¹), e da folha por concentrações menores de BAP (Tabela 1). O aumento da biomassa seca de folha nas concentrações baixas de BAP e ANA sugere o equilíbrio desses reguladores onde eles desempenham satisfatoriamente seus efeitos fisiológicos.

Tabela 1. Análise de variância dos parâmetros biométricos de plântulas de *L. rotundifolia* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de BAP e ANA, durante 45 dias.

Concentrações (mgL ⁻¹)		NB	CB (cm)	Hip. (%)	Calo (%)	Raiz (%)	BSC (mg.planta ⁻¹)	BSF (mg.planta ⁻¹)	BSR (mg.planta ⁻¹)	BST (mg.planta ⁻¹)
BAP	ANA									
0,0	0,0	2,0 ^c	6,74 ^a	0,0 ^c	0,0 ^c	100 ^a	9,2 ^b	17,4 ^a	1,8 ^d	28,3 ^b
0,0	0,5	2,1 ^c	5,84 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	100 ^a	7,5 ^b	18,1 ^a	2,8 ^c	28,3 ^b
0,0	1,0	2,0 ^c	6,91 ^a	0,0 ^c	0,0 ^c	100 ^a	9,1 ^b	21,2 ^a	4,2 ^a	34,5 ^a
0,5	0,0	2,1 ^c	5,09 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	100 ^a	7,6 ^b	18,5 ^a	1,4 ^c	27,5 ^b
0,5	0,5	2,1 ^c	6,00 ^b	0,0 ^c	13 ^b	94 ^b	9,6 ^b	18,7 ^a	2,6 ^c	30,9 ^a
0,5	1,0	1,9 ^c	6,13 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	100 ^a	7,6 ^b	16,8 ^a	3,4 ^b	27,8 ^b
1,5	0,0	6,6 ^b	2,05 ^c	44 ^b	100 ^a	0,0 ^c	10,0 ^b	13,0 ^b	0,0 ^f	23,0 ^c
1,5	0,5	6,3 ^b	3,27 ^c	63 ^b	100 ^a	0,0 ^c	17,0 ^a	17,8 ^a	0,0 ^f	34,7 ^a
1,5	1,0	6,4 ^b	2,42 ^c	63 ^b	100 ^a	0,0 ^c	11,0 ^b	12,9 ^b	0,0 ^f	23,8 ^c
2,5	0,0	8,1 ^b	1,81 ^d	50 ^b	100 ^a	0,0 ^c	11,0 ^b	14,3 ^b	0,0 ^f	25,7 ^b
2,5	0,5	11,0 ^a	1,71 ^d	75 ^a	100 ^a	0,0 ^c	15,0 ^a	16,3 ^a	0,0 ^f	31,6 ^a
2,5	1,0	6,8 ^b	1,95 ^d	81 ^a	100 ^a	0,0 ^c	9,4 ^b	10,1 ^c	0,0 ^f	19,5 ^c
3,5	0,0	9,3 ^a	1,28 ^d	100 ^a	100 ^a	0,0 ^c	9,9 ^b	9,1 ^c	0,0 ^f	18,9 ^c
3,5	0,5	11,6 ^a	1,31 ^d	88 ^a	100 ^a	0,0 ^c	14,0 ^a	12,0 ^b	0,0 ^f	25,7 ^b
3,5	1,0	10,1 ^a	1,16 ^d	100 ^a	100 ^a	0,0 ^c	9,3 ^b	7,3 ^c	0,0 ^f	16,6 ^c
CV (%)		24,07	17,41	41,77	10,61	8,15	20,61	17,56	37,84	15,96

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), CV (%) coeficiente de variação dado em porcentagem.

NB número de brotos, CB comprimento de broto, Hip. porcentagem de hiperidricidade, BSC biomassa seca de caule, BSF biomassa seca de folha, BSR biomassa seca de raiz, BST biomassa seca total.

Avaliando todos os parâmetros observou-se que o maior número de brotos associado à maior biomassa seca de folhas foi obtido da combinação de BAP e ANA nas concentrações 2,5 e 3,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de ANA, no entanto induziu altas porcentagens de hiperidricidade e calogênese, o que comprometem a sobrevivência das plântulas. Em um experimento complementar (dados não mostrados) foram utilizadas doses do regulador de crescimento BAP (0,00; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,50 mg L⁻¹) sem a interação com uma auxina com o objetivo de obter maior proliferação de brotos e uma redução da hiperidricidade, observando-se que nas concentrações de 0,75 e 1,00 mg L⁻¹ de BAP foi induzido em média 10 brotos por explante, no entanto, ocorreu 28% de plantas hiperídricas e com baixa indução de calos na base do explante (12%).

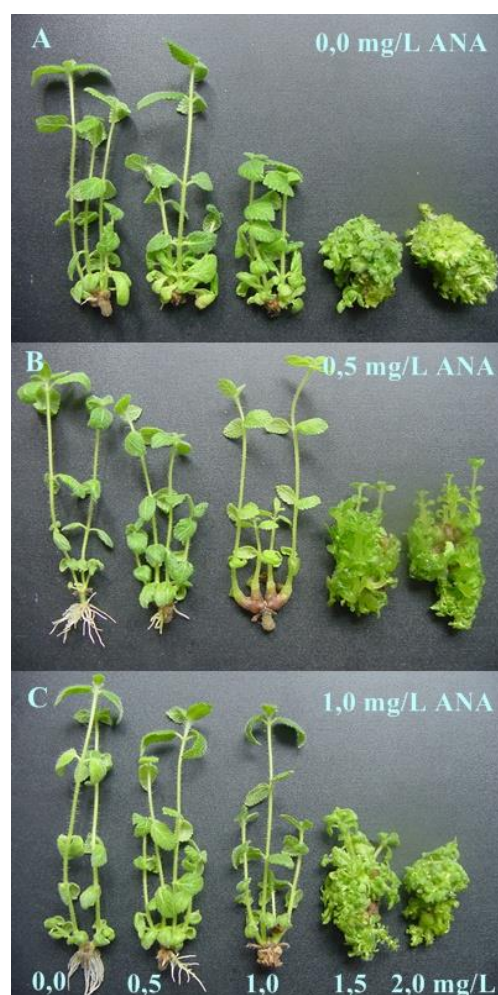


Figura 2. Plântulas de *L. rotundifolia* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ e ANA, durante 45 dias. (A) Concentração de 0,0 mg L⁻¹ de ANA combinado com concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ de TDZ; (B) Concentração de 0,5 mg L⁻¹ de ANA combinado com concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ de TDZ; (C) Concentração de 1,0 mg L⁻¹ de ANA combinado com concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ de TDZ.

Quando foram avaliados os cultivos suplementados com TDZ, observou-se que a combinação de TDZ e ANA gerou maior número de brotações do que as encontradas na interação BAP e ANA, no entanto, a porcentagem de hiperidricidade e calos também foram superiores (Figura 2, Tabela 2). A maior quantidade de brotos por explante foram obtidos na concentração de 1,5 mg L⁻¹ de TDZ + 0,5 mg L⁻¹ de ANA (20 brotos), 2,0 mg L⁻¹ de TDZ sem ANA (22,8 brotos) e 2,0 mg L⁻¹ de TDZ + 0,5 mg L⁻¹ de ANA (18,1 brotos) (Tabela 2). Quanto a porcentagem de hiperidricidade e calos, concentrações a partir de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ possibilitaram altas porcentagem de plântulas hiperídricas, e a porcentagem de raiz foi reduzida com o aumento da suplementação com TDZ com ou sem ANA. Maiores biomassas secas de folhas e total ocorreram partir da concentração de 1,5 mg L⁻¹ de TDZ com ou sem adição de ANA. Já para a biomassa seca de caule as maiores biomassas foram obtidas a partir de 1,0 mg L⁻¹ de TDZ em interação com o ANA, com exceção da concentração de 2,0 mg L⁻¹ de TDZ sem adição de ANA, onde também teve um resultado satisfatório.

Ressalta-se que na literatura não foram encontrados trabalhos que relatam o efeito do TDZ em espécies de *Lippia*, isso deve-se ao uso já consagrado de BAP em espécies de Verbenaceae. No entanto, através dos dados encontrados neste trabalho, percebe-se que o TDZ tem resultados bastante eficientes quanto ao estímulo de brotações, apresentando aproximadamente o dobro da eficiência do BAP em uma menor concentração. Entretanto, também foi encontrado alta porcentagem de hiperidricidade e formação de calos, o mesmo problema também ocorreu quando o meio foi suplementado com BAP. Com base nisso, pode-se inferir que a espécie possui sensibilidade a reguladores de crescimento ocasionando o surgimento da hiperidricidade e calos.

O TDZ tem mostrado ser biologicamente mais ativo que o BAP, e especificamente na micropropagação são exigidas em baixas concentrações (1nM a 10 µM) em cultura de tecido. A eficiência do TDZ na multiplicação celular em relação a outras citocininas pode ocorrer devido ao TDZ ser um forte inibidor da citocininas oxidase e atuar modulando o nível hormonal endógeno. Esse mecanismo ocorre em razão do aumento da atividade da enzima fosfatase ácida que torna citocininas endógenas mais ativas (RIBEIRO; SILVA; CARVALHO, 2010).

Normalmente em concentrações elevadas pode ser responsável pela redução do crescimento do broto, hiperidricidade e folhas anormais bem estreitas (HUETTEMAN; PREECE, 1993; MALIK et al., 2010; MONDAL et al., 1998). A hiperidricidade

mediada por TDZ tem sido relatada em vários estudos (IVANOVA; VAN STADEN, 2011; SUNAGAWA et al., 2007) e também em outras plantas medicinais como *Cineraria marítima* Linn. (BANERJEE et al., 2004), *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston (MALIK et al., 2010) e *Bacopa monniera* (L.) Wettst. (TIWARI; TIWARI; SINGH, 2001).

Tabela 2. Análise de variância de parâmetros biométricos de plântulas de *L. rotundifolia* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de TDZ e ANA, durante 45 dias.

Concentrações (mgL ⁻¹)		NB	CB (cm)	Hip. (%)	Calo (%)	Raiz (%)	BSC (mg.planta ⁻¹)	BSF (mg.planta ⁻¹)	BSR (mg.planta ⁻¹)	BST (mg.planta ⁻¹)
TDZ	ANA									
0,0	0,0	3,5 ^c	4,10 ^c	0,0 ^d	0,0 ^c	100 ^a	13,6 ^b	22,4 ^b	1,12 ^b	36,0 ^b
0,0	0,5	2,4 ^c	5,33 ^b	0,0 ^d	0,0 ^c	100 ^a	10,1 ^b	21,5 ^b	2,11 ^a	33,7 ^b
0,0	1,0	2,8 ^c	6,44 ^a	0,0 ^d	0,0 ^c	94 ^a	15,0 ^b	25,1 ^b	2,23 ^a	42,2 ^b
0,5	0,0	4,7 ^c	3,07 ^d	69 ^b	88 ^a	19 ^c	13,9 ^b	27,8 ^a	0,07 ^d	41,8 ^b
0,5	0,5	4,0 ^c	4,46 ^c	31 ^c	50 ^b	38 ^b	19,7 ^a	24,8 ^b	0,49 ^c	44,8 ^b
0,5	1,0	3,1 ^c	4,40 ^c	0,0 ^d	56 ^b	31 ^b	16,5 ^b	20,6 ^b	0,63 ^c	37,5 ^b
1,0	0,0	4,2 ^c	3,18 ^d	44 ^c	100 ^a	9 ^d	12,9 ^b	18,4 ^b	0,32 ^c	32,2 ^b
1,0	0,5	3,8 ^c	4,88 ^b	19 ^c	75 ^b	0,0 ^d	20,2 ^a	23,0 ^b	0,00 ^d	43,3 ^b
1,0	1,0	3,6 ^c	4,47 ^c	0,0 ^d	81 ^a	19 ^c	17,3 ^a	20,0 ^b	0,15 ^d	37,6 ^b
1,5	0,0	12,8 ^b	0,79 ^e	63 ^b	100 ^a	0,0 ^d	10,8 ^b	29,8 ^a	0,00 ^d	40,6 ^b
1,5	0,5	20,0 ^a	1,15 ^e	94 ^a	100 ^a	0,0 ^d	22,1 ^a	34,1 ^a	0,00 ^d	56,2 ^a
1,5	1,0	15,6 ^b	0,95 ^e	100 ^a	100 ^a	0,0 ^d	19,4 ^a	31,2 ^a	0,00 ^d	50,6 ^a
2,0	0,0	22,8 ^a	0,91 ^e	94 ^a	100 ^a	0,0 ^d	21,6 ^a	29,6 ^a	0,00 ^d	51,2 ^a
2,0	0,5	18,1 ^a	1,04 ^e	100 ^a	100 ^a	0,0 ^d	24,5 ^a	41,6 ^a	0,00 ^d	66,0 ^a
2,0	1,0	14,7 ^b	0,76 ^e	100 ^a	100 ^a	0,0 ^d	19,2 ^a	23,7 ^b	0,00 ^d	42,8 ^b
CV (%)		33,24	15,35	33,23	27,41	24,53	23,84	25,46	48,60	20,72

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), CV (%) coeficiente de variação dado em porcentagem.

NB número de brotos, CB comprimento de broto, Hip. porcentagem de hiperidricidade, BSC biomassa seca de caule, BSF biomassa seca de folha, BSR biomassa seca de raiz, BST biomassa seca total.

Taxa de NO₃:NH₄⁺ em combinação com TDZ



Figura 3. Proliferação de brotos de *L. rotundifolia* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ (0; 0,5; 1,0 e 1,5 mgL⁻¹) e taxa de nitrato e amônio (2; 11; 9; 7) durante 45 dias.

O efeito da interação da taxa de NO₃:NH₄⁺ e concentração de TDZ nos parâmetros de crescimento são representados na tabela 3. Analisando a média de porcentagem de hiperidricidade com o meio de cultivo suplementado com TDZ e NO₃:NH₄⁺ numa taxa de dois, as plântulas obtiveram 81% de hiperidricidade, para a taxa de NO₃:NH₄⁺ de nove observou-se um decréscimo para 60% , e na taxa de NO₃:NH₄⁺ de 11 a média foi de 42%, mesmo assim ainda foi considerada alta (Figura 3 e Tabela 3). Mesmo com a concentração de nitrogênio mais baixa (40 mM) e taxa de NO₃:NH₄⁺ de sete, a média de hiperidricidade ainda foi alta (63%). Isto mostra que o fator que causa a hiperidricidade é o tipo e a concentração de regulador de crescimento suplementado ao meio de cultivo.

Tabela 3. Análise de variância dos parâmetros biométricos de plântulas de *L. rotundifolia* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de TDZ e diferentes concentrações de N, durante 45 dias.

<i>TDZ</i> (mgL^{-1})	<i>NO₃</i> (<i>mM</i>)	<i>NH₄</i> (<i>mM</i>)	<i>Taxa</i> <i>NO₃:NH₄</i>	<i>N total</i> (<i>mM</i>)	NB	CB (cm)	Hip. (%)	Calo (%)	Raiz (%)	BSPA (mg.planta ⁻¹)	BSR (mg.planta ⁻¹)	BST (mg.planta ⁻¹)
0	40	20	2	60	2,5 ^e	7,96 ^a	0,0 ^d	0,0 ^c	100 ^a	37,9 ^c	2,5 ^a	40,3 ^c
0	55	5	11	60	2,2 ^e	5,50 ^c	0,0 ^d	0,0 ^c	0,0 ^c	27,0 ^d	2,3 ^a	29,2 ^d
0	45	5	9	50	2,1 ^e	6,21 ^b	0,0 ^d	0,0 ^c	75 ^b	34,7 ^c	2,5 ^a	37,1 ^c
0	35	5	7	40	2,1 ^e	8,44 ^a	0,0 ^d	0,0 ^c	100 ^a	26,7 ^d	1,8 ^b	28,5 ^d
0,5	40	20	2	60	30,6 ^a	1,35 ^d	65 ^b	33 ^b	0,0 ^c	64,4 ^a	0,0 ^c	64,4 ^a
0,5	55	5	11	60	23,1 ^b	1,52 ^d	25 ^c	53 ^a	0,0 ^c	59,4 ^a	0,0 ^c	59,4 ^a
0,5	45	5	9	50	19,5 ^c	1,18 ^d	73 ^b	33 ^b	0,0 ^c	36,8 ^c	0,0 ^c	36,8 ^c
0,5	35	5	7	40	30,7 ^a	1,23 ^d	80 ^b	50 ^a	0,0 ^c	42,1 ^c	0,0 ^c	42,1 ^c
1,0	40	20	2	60	28,8 ^a	1,38 ^d	78 ^b	48 ^a	0,0 ^c	49,6 ^b	0,0 ^c	49,6 ^b
1,0	55	5	11	60	18,4 ^c	1,57 ^d	33 ^c	55 ^a	0,0 ^c	55,7 ^b	0,0 ^c	55,6 ^b
1,0	45	5	9	50	19,7 ^c	1,38 ^d	28 ^c	30 ^b	0,0 ^c	43,5 ^c	0,0 ^c	43,5 ^c
1,0	35	5	7	40	12,5 ^d	1,14 ^d	35 ^c	50 ^a	0,0 ^c	30,2 ^d	0,0 ^c	30,2 ^d
1,5	40	20	2	60	22,4 ^b	1,21 ^d	100 ^a	0,0 ^c	0,0 ^c	31,1 ^d	0,0 ^c	31,1 ^d
1,5	55	5	11	60	26,9 ^a	1,56 ^d	68 ^b	53 ^a	0,0 ^c	69,1 ^a	0,0 ^c	69,1 ^a
1,5	45	5	9	50	24,2 ^b	1,32 ^d	80 ^b	48 ^a	0,0 ^c	50,4 ^b	0,0 ^c	50,4 ^b
1,5	35	5	7	40	24,9 ^b	0,98 ^d	75 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	35,5 ^c	0,0 ^c	35,5 ^c
CV (%)					11,96	16,73	23,28	32,86	41,99	18,03	46,56	17,83

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), CV (%) coeficiente de variação dado em porcentagem.

NB número de brotos, CB comprimento de broto, Hip. porcentagem de hiperidricidade, BSPA biomassa seca de parte aérea, BSR biomassa seca de raiz, BST biomassa seca total.

Os dados obtidos com *L. rotundifolia* confirmam que quanto menor a concentração de amônio utilizada no meio, menor a porcentagem de hiperhidricidade e se o nitrato for usado como uma única fonte de nitrogênio a hiperhidricidade poderia ser ainda menor (IVANOVA; VAN STADEN, 2009; RAMAGE; WILLIAMS, 2002; WOODWARD; BENNETT; PUSSWONGE, 2006). Segundo Ivanova e Van Staden (2008), em *Aloe polyphylla* (Schönlandex Pillans) para a obtenção de alta taxa de multiplicação e baixa incidência de hiperhidricidade recomendam-se a utilização de baixa concentração do íon NH_4^+ (10,3 mM) no meio combinado com baixa concentração de BA ($5 \mu\text{M}$ ou $1,1 \text{ mg L}^{-1}$) e a utilização das razões $\text{NO}_3:\text{NH}_4^+$ de 40:20, 30:30 e 20:40, em vez de amônio como única fonte de nitrogênio. Neste trabalho, com *L. rotundifolia* foram utilizadas concentrações menores de amônio e regulador de crescimento mesmo assim ocorreu a hiperidricidade, mostrando que a particularidade da espécie é um fator também muito importante. O

uso de citocininas no meio de cultivo pode ser um promotor de hiperidricidade, entretanto pode ser difícil de ser revertida quando o regulador se faz necessário para a micropropagação da espécie (PALMA et al., 2011). Além das citocininas, a razão nitrato/ amônio no meio está relacionada com a taxa de hiperidricidade (IVANOVA; VAN STADEN, 2009). Nos resultados obtidos com o uso do TDZ para multiplicação de *L. rotundifolia*, a alta porcentagem de hiperidricidade compromete a viabilidade desses brotos, desta forma, descobrir novas formas de minimizar essa hiperidricidade aperfeiçoaria ainda mais o seu uso.

Com base nos dados obtidos, observou-se para esta espécie que talvez o método de micropropagação através de segmentos nodais e apicais sem uso de regulador de crescimento seja o mais adequado. Visto que, com o uso deste método, plântulas após 30 a 45 dias de cultivo *in vitro*, uma única gema origina aproximadamente 3 ou 4 segmentos nodais e um apical, totalizando nas duas gemas 8 a 10 explantes. Foi observado que o enraizamento desses segmentos ocorre naturalmente ou uma suplementação com pequenas doses de auxina ($0,5$ a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) para maior ganho de biomassa de raiz, neste período pode-se obter de 8 a 10 plântulas para serem aclimatizadas. O método de indução de múltiplos brotos usando explante nodal pode ser rápido e resultar em uma alta frequência de brotos. Um método propagação *in vitro* em utilização de reguladores de crescimento pode ser o mais adequado para algumas espécies sensíveis ao uso destes, pois minimiza a chance de surgimento de variação somaclonal, surgimento de hiperidricidade e calos.

Análises de compostos voláteis por HS-CG/EM

Observou-se na análise da fração volátil de folhas *L. rotundifolia*, provenientes de plantas cultivadas *in vitro* em meio suplementado com regulador de crescimento, identificou a presença de 14 constituintes químicos que totalizaram em mais de 90% da composição total (Tabelas 4 e 5). Dentre esses compostos o mirceno, limoneno, mircenona, Z-ocimenona representaram da composição química total das folhas micropropagadas em meio de cultivo suplementado com a combinação de BAP e ANA (78,52 a 82,97%) e na combinação TDZ e ANA (80,38 a 84,73%).

Para o mirceno, podemos observar que o uso de BAP e ANA parecem interferir negativamente, visto que o maior teor (19,73%) de mirceno encontrado foi encontrado nas plântulas cultivadas em meio sem regulador de crescimento. Com o aumento da concentração de BAP observamos um decréscimo do teor de mirceno (Tabela 4). Na combinação de TDZ e ANA o mirceno demonstrou um comportamento completamente diferente, no meio sem regulador de crescimento e nos meios suplementados apenas com ANA apresentou dentre os maiores teores (Tabela 5). Ainda dentre os maiores teores de mirceno, o TDZ não demonstra afetar negativamente no teor de mirceno, visto que mesmo nas concentrações de 2,0 mg L⁻¹ sem adição de ANA foi encontrado alto teor de mirceno. O menor valor de mirceno (11,09%) foi observado apenas na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de ANA.

Observamos os maiores teores de limoneno no meio de cultivo sem regulador (15,51 %), no meio suplementado de 1,5 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de ANA (15,52 %) e o teor aumenta nas concentrações partir de 2,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de ANA (Tabela 4). Quando utilizado a combinação de TDZ e ANA, observamos uma menor influencia no teor de limoneno (Tabela 5). Os meios de cultivo suplementados com ANA na concentração de 1,0 mg L⁻¹ parecem reduzir o teor de limoneno, com exceção do tratamento 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de ANA que se encontra dentre os maiores teores (15,96 %). Dentre os maiores teores de limoneno estão o meio sem regulador de crescimento (16,68 %) e a concentração de 0,5 mg L⁻¹ + 1,0 mg L⁻¹ ANA (17,71 %).

Os maiores teores de mircenona encontrados nos tratamentos com BAP e ANA foram 1,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ ANA (36,42 %), 2,5 mg L⁻¹ de BAP sem adição de ANA (34,80 %) e 3,5 mg L⁻¹ de BAP com 0,5 mg L⁻¹ de ANA (33,36 %) e com 1,0

mg L⁻¹ de ANA (34,40 %) (Tabela 4). Dentre os tratamentos com os reguladores TDZ e ANA, o maior teor de mircenona (45,57 %) foi na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de TDZ + 1,0 mg L⁻¹ de ANA (Tabela 5).

Tabela 4. Análise de variância do teor (%) dos compostos voláteis em plântulas de *L. rotundifolia* cultivada *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de BAP e ANA, durante 45 dias.

IR ^a	Composto	Teor (%)														
		Controle	BAP 0,0: ANA 0,5	BAP 0,0: ANA 1,0	BAP 0,5: ANA 0,0	BAP 0,5: ANA 0,5	BAP 0,5: ANA 1,0	BAP 1,5: ANA 0,0	BAP 1,5: ANA 0,5	BAP 1,5: ANA 1,0	BAP 2,5: ANA 0,0	BAP 2,5: ANA 0,5	BAP 2,5: ANA 1,0	BAP 3,5: ANA 0,0	BAP 3,5: ANA 0,5	BAP 3,5: ANA 1,0
991	Mirceno	19,73 ^a	18,04 ^b	17,74 ^b	17,93 ^b	17,02 ^c	17,26 ^b	17,51 ^b	16,30 ^c	15,63 ^c	15,94 ^c	16,86 ^c	16,28 ^c	16,10 ^c	15,42 ^c	15,89 ^c
1027	Limoneno	15,51 ^a	14,02 ^b	14,14 ^b	11,77 ^c	10,71 ^c	11,14 ^c	17,22 ^a	13,28 ^b	15,52 ^a	14,16 ^b	15,84 ^a	17,00 ^a	18,23 ^a	16,79 ^a	17,74 ^a
1100	Linalol	1,01 ^f	1,13 ^e	1,13 ^e	1,08 ^e	1,10 ^e	1,13 ^e	1,47 ^b	1,24 ^d	1,40 ^c	1,63 ^a	1,57 ^a	1,38 ^c	1,45 ^b	1,57 ^a	1,56 ^a
1102	Isomirceno	0,20 ^a	0,21 ^a	0,21 ^a	0,21 ^a	0,22 ^a	0,21 ^a	0,0 ^c	0,21 ^a	0,17 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	0,20 ^a	0,17 ^b	0,0 ^c	0,00 ^c
1149	Mircenona	31,26 ^c	33,74 ^b	33,10 ^b	33,26 ^b	33,52 ^b	32,89 ^b	27,80 ^d	36,42 ^a	33,70 ^b	34,80 ^a	31,48 ^c	30,88 ^c	32,31 ^b	35,36 ^a	34,40 ^a
1153	<i>trans</i> -tagetona	1,15 ^b	1,06 ^b	1,04 ^c	1,12 ^b	1,14 ^b	1,14 ^b	1,17 ^b	1,17 ^b	1,13 ^b	1,23 ^a	1,33 ^a	1,12 ^b	1,04 ^c	0,99 ^c	1,02 ^c
1189	α -Terpineol	0,48 ^b	0,55 ^a	0,54 ^a	0,59 ^a	0,64 ^a	0,59 ^a	0,42 ^b	0,46 ^b	0,46 ^b	0,41 ^b	0,41 ^b	0,47 ^b	0,34 ^b	0,43 ^b	0,40 ^b
1231	Z-ocimenona	16,47 ^b	16,27 ^b	16,70 ^b	17,50 ^a	18,14 ^a	18,10 ^a	15,99 ^c	15,28 ^c	15,62 ^c	16,43 ^b	16,83 ^b	15,60 ^c	14,56 ^d	14,43 ^d	14,52 ^d
1240	E-ocimenona	1,06 ^c	1,01 ^c	1,02 ^c	1,19 ^b	1,36 ^a	1,50 ^a	1,30 ^b	0,75 ^e	1,10 ^c	1,04 ^c	1,23 ^b	0,96 ^c	1,02 ^c	0,91 ^d	0,92 ^d
1300	Tridecano	1,91 ^a	2,12 ^a	2,30 ^a	2,35 ^a	2,41 ^a	2,59 ^a	2,88 ^a	2,16 ^a	2,55 ^a	2,37 ^a	2,44 ^a	2,63 ^a	2,58 ^a	2,33 ^a	2,36 ^a
1365	Óxido de Piperitenona	0,38 ^c	0,40 ^c	0,38 ^c	0,37 ^c	0,38 ^c	0,39 ^c	0,61 ^a	0,49 ^b	0,59 ^a	0,55 ^a	0,55 ^a	0,68 ^a	0,47 ^b	0,61 ^a	0,48 ^b
1417	β -Cariofileno	1,51 ^b	1,44 ^c	1,68 ^b	1,79 ^a	1,92 ^a	1,68 ^b	1,99 ^a	1,27 ^c	1,51 ^b	1,09 ^d	1,11 ^d	1,66 ^b	1,53 ^b	1,17 ^d	1,32 ^c
1450	α -humuleno	0,20 ^c	0,18 ^c	0,22 ^b	0,23 ^b	0,26 ^a	0,21 ^b	0,27 ^a	0,16 ^d	0,19 ^c	0,15 ^d	0,16 ^d	0,23 ^b	0,19 ^c	0,15 ^d	0,17 ^d
1500	Pentadecano	3,42 ^b	3,74 ^b	4,23 ^a	4,84 ^a	5,09 ^a	5,08 ^a	3,78 ^b	2,99 ^b	3,12 ^b	2,65 ^b	2,83 ^b	3,33 ^b	2,70 ^b	2,66 ^b	2,95 ^b
Total identificado (%)		93,28	93,91	94,43	94,23	93,91	93,91	92,41	92,18	92,69	92,45	92,64	92,42	92,69	93,73	94,88

IR^a Índice de retenção linear na série de alcanos (C₉-C₁₈), coluna HP-5MS na ordem de eluição.

Médias com mesma letra dentro da mesma linha pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Tabela 5. Análise de variância do teor (%) dos compostos voláteis em plântulas de *L. rotundifolia* cultivada *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de TDZ e ANA, durante 45 dias.

IR ^a	Composto	Teor (%)														
		Controle	TDZ 0,0: ANA 0,5	TDZ 0,0: ANA 1,0	TDZ 0,5: ANA 0,0	TDZ 0,5: ANA 0,5	TDZ 0,5: ANA 1,0	TDZ 1,0: ANA 0,0	TDZ 1,0: ANA 0,5	TDZ 1,0: ANA 1,0	TDZ 1,5: ANA 0,0	TDZ 1,5: ANA 0,5	TDZ 1,5: ANA 1,0	TDZ 2,0: ANA 0,0	TDZ 2,0: ANA 0,5	TDZ 2,0: ANA 1,0
991	Mirceno	19,73 ^a	18,04 ^a	17,74 ^a	14,13 ^b	13,69 ^b	18,99 ^a	20,40 ^a	19,79 ^a	13,77 ^b	13,38 ^b	19,42 ^a	18,67 ^a	19,14 ^a	13,09 ^b	11,09 ^c
1027	Limoneno	15,51 ^a	14,02 ^b	14,14 ^b	17,71 ^a	15,28 ^a	12,78 ^b	15,99 ^a	15,13 ^a	15,96 ^a	15,76 ^a	12,75 ^b	13,45 ^b	16,25 ^a	14,03 ^b	13,88 ^b
1100	Linalol	1,01 ^b	1,13 ^a	1,12 ^a	1,25 ^a	1,19 ^a	1,09 ^a	1,00 ^b	0,98 ^b	1,24 ^a	1,00 ^b	1,04 ^b	1,00 ^b	0,97 ^b	0,88 ^b	0,73 ^c
1102	Isomirceno	0,21 ^b	0,21 ^b	0,21 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	0,21 ^b	0,29 ^a	0,29 ^a	0,0 ^c	0,0 ^c	0,22 ^b	0,28 ^a	0,26 ^a	0,0 ^c	0,0 ^c
1149	Mircenona	31,26 ^c	33,74 ^d	33,11 ^d	37,91 ^c	39,07 ^c	36,13 ^d	32,11 ^e	29,46 ^e	38,80 ^c	41,75 ^b	34,70 ^d	33,35 ^d	30,24 ^e	41,72 ^b	45,57 ^a
1153	<i>trans</i> -tagetona	1,15 ^a	1,06 ^a	1,04 ^a	0,89 ^a	0,60 ^b	1,08 ^a	0,95 ^a	1,21 ^a	0,76 ^b	0,68 ^b	1,17 ^a	1,08 ^a	0,98 ^a	0,72 ^b	0,48 ^b
1189	α -Terpineol	0,47 ^b	0,55 ^a	0,54 ^a	0,43 ^b	0,46 ^b	0,56 ^a	0,63 ^a	0,60 ^a	0,50 ^b	0,49 ^b	0,61 ^a	0,67 ^a	0,63 ^a	0,44 ^b	0,42 ^b
1231	Z-ocimenona	13,92 ^a	16,28 ^a	16,70 ^a	14,98 ^a	13,16 ^a	16,39 ^a	15,06 ^a	16,00 ^a	13,76 ^a	12,69 ^a	16,31 ^a	16,05 ^a	14,90 ^a	13,59 ^a	11,83 ^a
1240	E-ocimenona	1,06 ^a	1,01 ^a	1,02 ^a	0,94 ^a	0,78 ^b	0,97 ^a	0,85 ^a	0,96 ^a	0,65 ^b	0,67 ^b	1,02 ^a	0,97 ^a	1,10 ^a	0,70 ^b	0,53 ^b
1300	Tridecano	1,91 ^a	2,12 ^a	2,30 ^a	1,91 ^a	1,93 ^a	1,79 ^a	1,77 ^a	2,15 ^a	2,05 ^a	1,92 ^a	1,89 ^a	1,81 ^a	2,21 ^a	1,77 ^a	1,92 ^a
1365	Óxido de Piperitenona	0,38 ^a	0,40 ^a	0,38 ^a	0,31 ^b	0,34 ^b	0,35 ^b	0,33 ^b	0,35 ^b	0,31 ^b	0,36 ^b	0,18 ^c	0,22 ^c	0,23 ^c	0,41 ^a	0,0 ^d
1417	β -Cariofileno	1,52 ^c	1,45 ^c	1,69 ^b	1,12 ^d	1,02 ^d	1,19 ^d	1,72 ^b	2,16 ^a	1,64 ^b	1,64 ^b	1,41 ^c	1,82 ^a	2,06 ^a	1,38 ^c	1,96 ^a
1450	α -humuleno	0,20 ^c	0,18 ^c	0,22 ^b	0,0 ^d	0,0 ^d	0,15 ^c	0,22 ^b	0,29 ^a	0,22 ^b	0,0 ^d	0,18 ^c	0,25 ^a	0,28 ^a	0,0 ^d	0,0 ^d
1500	Pentadecano	3,42 ^a	3,74 ^a	4,23 ^a	3,03 ^a	2,87 ^a	3,10 ^a	2,92 ^a	3,72 ^a	3,58 ^a	3,57 ^a	3,33 ^a	3,28 ^a	3,97 ^a	2,96 ^a	3,60 ^a
Total identificado (%)		91,75	93,93	94,44	94,91	90,39	94,78	94,24	93,09	93,24	93,91	94,23	92,90	93,22	91,69	92,01

IR^a Índice de retenção linear na série de alcanos (C₉-C₁₈), coluna HP-5MS na ordem de eluição.

Médias com mesma letra dentro da mesma linha pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

O linalol, isomirceno, *trans*-tagetona, α -terpineol, *E*-ocimenona, óxido de piperitenona, β -cariofileno, α -humuleno apresentaram baixa representatividade no total de compostos químicos encontrados, apresentando cada composto valores inferiores a 2% do teor total, tanto nos meios suplementados com BAP e ANA, como TDZ e ANA. O composto tridecano apresentou valores que variaram entre 1,91 e 2,88%, no entanto não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos de BAP e ANA (Tabela 4). As plântulas cultivadas em meio de cultivo suplementado com TDZ e ANA também não apresentaram diferença significativa do teor de tridecano entre os diferentes tratamentos, os valores variaram entre 1,77 e 2,30 % (Tabela 5).

Os maiores teores de pentadecano em plântulas submetidas a meio de cultivo suplementado com BAP e ANA foram na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP com adição de 0,5 mg L⁻¹ de ANA (5,09 %) ou com adição de 1,0 mg L⁻¹ de ANA (5,08 %). Nas plântulas em meio de cultivo apenas com 1,0 mg L⁻¹ de ANA (4,23 %) e em meio de cultivo com apenas 0,5 mg L⁻¹ de BAP (4,84 %) também ficaram dentre os maiores teores de pentadecano (Tabela 4). Os teores de pentadecano das plântulas submetidas a reguladores TDZ e ANA, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 6. Teor (%) médio dos compostos majoritários nas plântulas de *L. rotundifolia* cultivadas no meio de cultivo MS sem suplementação de regulador e suplementado com BAP, BAP + ANA, TDZ, TDZ + ANA e apenas ANA.

Compostos Majoritários	Controle	BAP	BAP+ANA	TDZ	TDZ+ANA	ANA
Mirceno	19,73 ± 0,75	16,87 ± 1,00	16,89 ± 0,91	17,89 ± 0,17	16,76 ± 3,52	16,06 ± 3,48
Limoneno	15,51 ± 1,32	15,35 ± 2,95	14,75 ± 2,71	14,08 ± 0,07	16,43 ± 0,88	14,16 ± 1,19
Mircenona	31,26 ± 1,50	32,04 ± 3,01	33,58 ± 1,86	33,42 ± 0,37	35,50 ± 5,29	37,35 ± 5,05
Ocimenona	16,47 ± 0,74	16,12 ± 1,22	16,07 ± 1,47	16,49 ± 0,25	14,41 ± 1,15	14,64 ± 1,76

Analisando a média do teor dos constituintes majoritários, comparando ao controle os tratamentos suplementados com reguladores de crescimento apresentaram médias equivalentes ou menores, com exceção da mircenona (Tabela 6). O limoneno foi o constituinte volátil que teve a maior inibição de sua biossíntese *in vitro* na presença de reguladores de crescimento, principalmente o TDZ (14,06 %) e o ANA (14,16 %). Por

outro lado, a biossíntese *in vitro* de mircenona foi incrementada na presença de ANA (37,35 %). Através das figuras 4 e 5 podemos visualizar como as diferentes concentrações de BAP, TDZ e ANA afetaram no acúmulo ou diminuição dos principais compostos químicos encontrados em *Lippia rotundifolia* cultivadas *in vitro* em meio suplementado com reguladores.

Diversos fatores como ontogenia, fotoperíodo, temperatura, nutrição, regulador de crescimento e a cultivo *in vitro* podem mudar a concentração e a qualidade dos compostos voláteis (FIGUEIREDO et al., 2008; PRINS; VIEIRA; FREITAS, 2010; SANGWAN et al., 2001). Os reguladores de crescimento vegetais podem influenciar o metabolismo devido ativação ou inibição de várias enzimas da rota metabólica na síntese do óleo essencial e de metabólitos secundários (COSTE et al., 2011; GONÇALVES; ROMANO, 2013; SHARAFSADEH; ZARE, 2011; VICTORIA et al., 2012).

Com a influência dos reguladores de crescimento podem ocorrer mudanças na produção de óleo essencial e na composição química *in vitro*. Santos-Gomes e Fernandes-Ferreira (2003) observaram aumento no óleo essencial de *Salvia officinalis* no meio com cinetina. Affonso et al (2009) reportaram que plantas de *Thymus vulgaris* em meio suplementado com AIA aumentou os compostos voláteis.

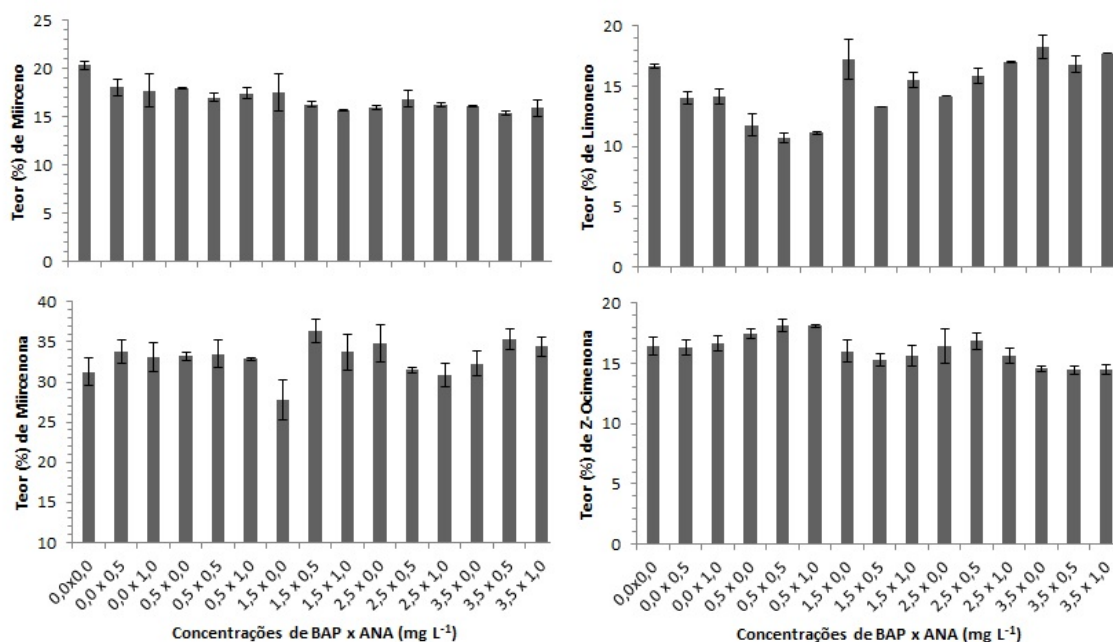


Figura 4. Teor (%) dos compostos majoritários de plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de BAP x ANA, durante 45 dias.

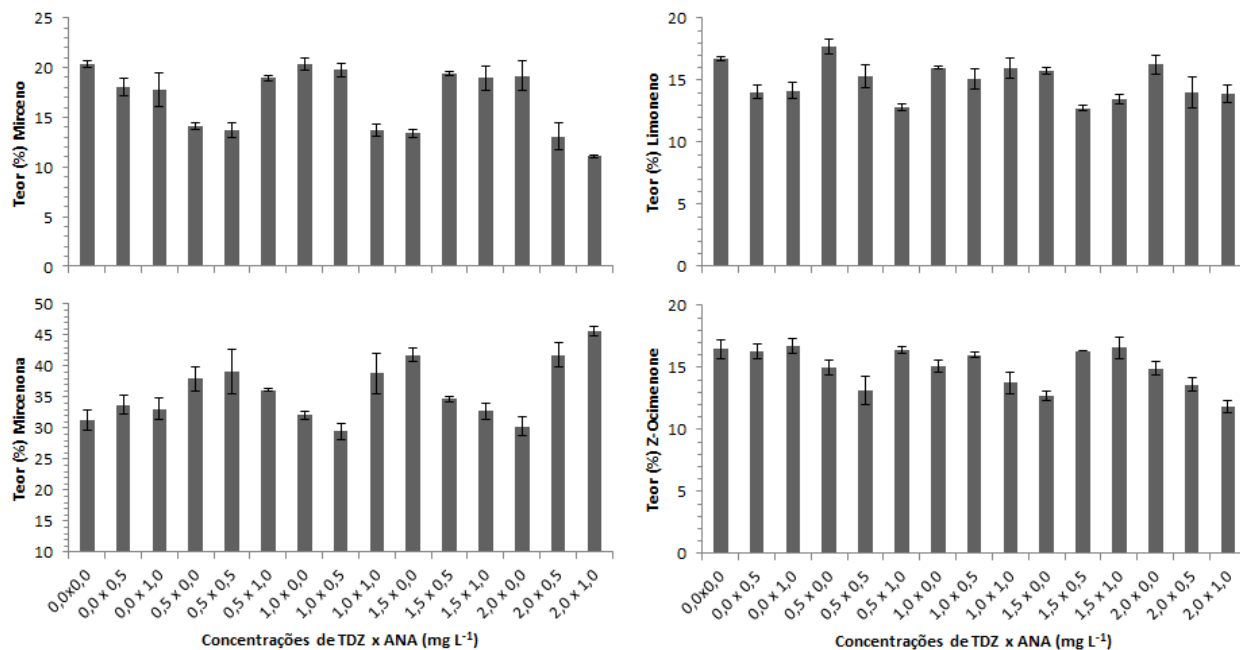


Figura 5. Teor (%) dos compostos majoritários de plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de TDZ x ANA, durante 45 dias

CONCLUSÕES

Com base nos resultados dos bioensaios realizados com *L. rotundifolia* Cham., observou-se que o TDZ nas concentrações de 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ com ou sem ANA gerou um maior número de brotações em relação à todas as combinações de BAP e ANA, entretanto, foi encontrada alta porcentagem de hiperidricidade e calos.

Através do balanço de NO₃:NH₄⁺ houve uma redução na porcentagem de hiperidricidade quando utilizado TDZ como regulador, e a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ + taxa de NO₃:NH₄⁺ de 11 foi o tratamento mais eficiente, pois proporcionou um grande número de brotos (23) e 25% de hiperidricidade, no entanto a porcentagem de hiperidricidade ainda é considerada alta e se faz necessário mais estudos.

Através dos bioensaios utilizando reguladores de crescimento, pode-se afirmar que com o uso de reguladores obtêm-se um grande número de brotações. No entanto, a planta possui alta sensibilidade aos reguladores de crescimento, na qual foi observado altas porcentagens de hiperidricidade e formação de calos o que compromete a viabilidade das plântulas obtidas. Com base nisto, a micropropagação sem reguladores

de crescimento através de segmentos nodais poderia ser considerado o método mais seguro para obtenção de plântulas viáveis (8 a 10 plântulas) livres de calos e hiperidricidade.

O BAP e o ANA reduziram os teores de mirceno em todas as concentrações utilizadas, porém o TDZ mesmo na concentração de 2,0 mg L⁻¹ sem adição de ANA apresentou alto teor de mirceno. Os teores de limoneno aumentaram nas maiores concentrações de BAP com ou sem ANA, porém quando utilizado TDZ e ANA, nas concentrações médias também houve aumento do teor de limoneno. Nas altas concentrações de BAP com ou sem ANA, observou-se um aumento no teor de mirceno, um resultado similar foi encontrado quando utilizado TDZ. Apenas em baixas concentrações de BAP e ANA (0,5 mg L⁻¹) houve aumento do teor de Z-ocimenona. Quando utilizado TDZ e ANA não houve diferença significativa no teor de Z-ocimenona.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo e produtividade.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.

AFFONSO, V. R. et al. Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of *in vitro* plantlets of *Thymus vulgaris* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6392–6395, 2009.

ASMAR, S. A. et al. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. SPECIAL ISSUE, p. 533–538, 2011.

ASMAR, S. A. et al. BAP concentrations on *in vitro* proliferation of *Lippia alba* [(Mill.) N.E.Brown] shoots. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. spe, p. 149–153, 2012.

BALARAJU, K. et al. Micropropagation of *Vitex agnus-castus*, (Verbenaceae)---a valuable medicinal plant. **In Vitro Cellular {&} Developmental Biology - Plant**, v. 44,

n. 5, p. 436, 2008.

BANERJEE, S. et al. Thidiazuron-induced high-frequency shoot proliferation in *Cineraria maritima* Linn. **Current Science**, v. 87, n. 9, p. 1287–1290, 2004.

BLANK, A. F. et al. *In vitro* establishment of pepper-rosmarin nodal segments. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 255–258, jun. 2008.

BRAGA, V. F. et al. Micropropagation, antinociceptive and antioxidant activities of extracts of *Verbena litoralis* Kunth (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 1, p. 139–148, mar. 2012.

CAPOTE, A. et al. Micropropagación y regeneración de plantas *in vitro* de oreganillo *Lippia micromera* Schau. in DC. var. *helleri* (Britt.) Mold. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, v. 20, p. 139–142, 1999.

CATTELAN, L. V. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Matricaria recutita* utilizando diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl. 2, p. 201–203, 2007.

COSTE, A. et al. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 106, n. 2, p. 279–288, 2011.

DINIZ, J. D. N. et al. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do guaco. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 37, n. 1, p. 59–64, 2006.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistemas de Análises de Variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos** LavrasUFLA, 2011.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213–226, 2008.

FIRMINO JUNIOR, P. C. P. et al. Efeito de diferentes citocininas e sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de Teca (*Tectona grandis* L.) estabelecida na Amazônia Sul- Ocidental. **Evidência**, v. 14, n. 1, p. 7–20, 2014.

FLORES, R. et al. Benzylaminopurine (BAP) and thidiazuron (TDZ) on *in vitro* propagation of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 292–299, 2009.

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, n. 1, p. 1–4, 2001.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 166–174, 2013.

HERRERA-MORENO, A. M.; CARRANZA, C. E.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. Establishment of propagation methods for growing promising aromatic plant species of

the *Lippia* (Verbenaceae) and *Tagetes* (Asteraceae) genera in Colombia. **Agronomía Colombiana**, v. 31, n. 1, p. 27–37, 2013.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, n. 2, p. 105–119, 1993.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of in vitro regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, n. 2, p. 227–231, 2008.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Nitrogen source, concentration, and NH₄⁺:NO₃⁻ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, n. 2, p. 167–174, 2009.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 104, n. 1, p. 13–21, 2011.

LEITÃO, S. G. et al. Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1388–1393, 2008.

LIMA, C. S. M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl. 2, p. 669–671, 2007.

LUZ, J. M. Q. et al. Estabelecimento in vitro e aclimatização de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2 Supl. I, p. 444–449, 2014.

MALIK, S. et al. Direct shoot regeneration from intact leaves of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston using thidiazuron. **Cell biology international**, v. 34, n. 5, p. 537–42, 2010.

MARINHO, M. J. . et al. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 246–252, 2011.

MONDAL, T. K. et al. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) using Thidiazuron. **Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 1, p. 57–61, 1998.

MORAIS, T. P. et al. Applications of tissue culture in medicinal plants. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. **Physiol. Plant**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 34, p. 267–275, 1998.

NIST: National Institute of Standards and Technology— Chemistry Web Book. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

PALMA, D. et al. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na morphophysiological aspects and hyperhydricity control in plant tissue. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 2–4, p. 174–184, 2011.

PARVEEN, S.; SHAHZAD, A. A micropropagation protocol for *Cassia angustifolia* Vahl. from root explants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 3, p. 789–796, 2011.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201–214, 2001.

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

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

PRINS, C. L.; VIEIRA, I. J. C.; FREITAS, S. P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 91–102, 2010.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 373, p. 1437–43, 2002.

RESENDE, C. F. DE et al. *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian campos rupestres. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 46, n. 3, p. 582–589, 2015.

RIBEIRO, C. S. N.; SILVA, H.; CARVALHO, J. M. F. C. Efeito do tiadiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 81, p. 366–371, 2010.

SALIMENA, F. R. G.; SILVA, T. R. S. Flora de Grão-mogol, Minas Gerais: VERBENACEAE. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 27, n. 1, p. 119–120, 2009.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regul.**, v. 34, n. 1, p. 3–21, 2001.

SANTOS-GOMES, P. C.; FERNANDES-FERREIRA, M. Essential oils produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 2260, 2003.

SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. DE F.; BLANK, A. F. Propagação e conservação *in vitro* de vetiver. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 507–513, set. 2012.

SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 9, p. 2565–77, 1 jun. 2013.

SHARAFSADEH, S.; ZARE, M. Influence of growth regulators on growth and secondary metabolites of some medicinal plants from Lamiaceae family. **Advances in Environmental Biology**, p. 2296–2302, 2011.

SUNAGAWA, H. et al. Effect of urea-type cytokinins on the adventitious shoots

regeneration from cotyledonary node explant in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Production Science**, v. 10, n. 1, p. 47–56, 2007.

THIYAGARAJAN, M.; VENKATACHALAM, P. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 111–117, 2012.

THOMAS, J. C.; KATTERMAN, F. R. Cytokinin Activity Induced by Thidiazuron. **Plant Physiology**, v. 81, n. 2, p. 681–683, 1986.

TIWARI, V.; TIWARI, K. N.; SINGH, B. D. Comparative studies of cytokinins on *in vitro* propagation of *Bacopa monniera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, n. 1, p. 9–16, 2001.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, n. 3, p. 463–471, 1963.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.

WOODWARD, A. J.; BENNETT, I. J.; PUSSWONGE, S. The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on *in vitro* shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 2, p. 208–213, 2006.

ARTIGO 2

INTENSIDADE E QUALIDADE DE LUZ NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Lippia rotundifolia* Cham. E NA ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL

INTENSITY AND QUALITY OF LIGHT IN *IN VITRO* GROWTH OF *Lippia rotundifolia* Cham. AND ON THE ANALYSIS OF VOLATILE FRACTION

RESUMO

Lippia rotundifolia Cham. é uma Verbenaceae endêmica do Cerrado, aromática, caracterizada pela presença de tricomas glandulares em suas folhas, ricos em monoterpenos. Estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de plantas medicinais e aromáticas têm demonstrado diferentes respostas em função da intensidade luminosa e do controle do espectro de luz durante o cultivo *in vitro*. Objetivou-se avaliar o crescimento, a produção dos pigmentos fotossintéticos e a composição química principal da fração volátil de *Lippia rotundifolia* Cham. cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades de luz e espectros luminosos usando LEDs. O bioensaio de intensidade luminosa consistiu em cinco tratamentos, utilizando lâmpadas fluorescentes branca fria com 20, 54, 78, 88 e 110 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. O bioensaio de qualidade de luz consistiu em seis tratamentos utilizando lâmpadas do tipo LEDs em diferentes espectros de luz, branco, vermelho, azul e interações: 1 vermelho: 1 azul, 2,5 vermelho: 1 azul, 1 vermelho: 2,5 azul. Após 45 dias foram avaliados parâmetros biométricos, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e análise da fração volátil em ambos bioensaios. As menores intensidade luminosas, 20 e 54 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, proporcionaram maior crescimento, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e acúmulo de biomassa. O mirceno e a z-ocimenona não foram afetados pelas diferentes intensidades luminosas. O maior teor de limoneno foi na intensidade de 54 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e o de mircenona foram nas intensidade inferiores a 78 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. O pentadecano teve um comportamento contrario onde o maior teor foi na intensidade de 110 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Quanto a qualidade de luz, o espectro do vermelho e azul combinados estimularam mais o crescimento das plantulas, a combinação 2,5 vermelho: 1 azul obteve melhores dados biométricos e no conteúdo de clorofila total. Os teores do composto químico z-ocimenona não foi influenciado pelos diferentes espectros de luz. O espectro monocromático azul e vermelho aumentaram o teor de mirceno. O espectro monocromático azul estimulou o teor de limoneno, porém teve efeito inverso no teor de mircenona. Os maiores teores de pentadecano foram no espectro branco e nas combinações de vermelho e azul.

Palavras-chave: cultura de tecido, lâmpada fluorescente, LEDs, compostos voláteis, planta aromática.

ABSTRACT

Lippia rotundifolia Cham. is an endemic Verbenaceae of the Cerrado, aromatic, characterized by the presence of glandular trichomes in its leaves, rich in monoterpenes. Studies related to the in vitro cultivation of medicinal and aromatic plants have demonstrated different responses as a function of light intensity and control of the light spectrum during in vitro culture. The objective was to evaluate the growth, the production of the photosynthetic pigments and the main chemical composition of the volatile fraction of *Lippia rotundifolia* Cham. Cultured in vitro under different light intensities and luminous spectra using LEDs. The light intensity bioassay consisted of five treatments, using cold white fluorescent lamps with 20, 54, 78, 88 and 110 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. The light quality bioassay consisted of six treatments using LEDs in different spectra of light, white, red, blue and interactions: 1 red: 1 blue, 2,5 red: 1 blue, 1 red: 2,5 blue. After 45 days, biometric parameters, photosynthetic pigment content and volatile fraction analysis were evaluated in both bioassays. The lower light intensities, 20 and 54 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, provided higher growth, photosynthetic pigment content and biomass accumulation. Myrcene and z-ocimene were not affected by the different light intensities. The highest content of limonene was in the intensity of 54 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and that of mircenone were in the intensity lower than 78 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. The pentadecane had an opposite behavior where the highest content was in the intensity of 110 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As for light quality, combined red and blue spectrum further stimulated seedling growth, the combination of 2.5 red: 1 blue obtained better biometric data and total chlorophyll content. The contents of the z-ocimene chemical compound were not influenced by the different light spectra. The blue and red monochromatic spectrum increased the myrcene content. The blue monochromatic spectrum stimulated the limonene content, but had an inverse effect on myrcene content. The highest pentadecane contents were in the white spectrum and in the red and blue combinations.

Key words: tissue culture, fluorescent lamp, LEDs, volatile compounds, aromatic plant.

INTRODUÇÃO

No Brasil estima-se que o mercado de plantas medicinais envolva valores entre 700 a 800 milhões de dólares, despertando assim o interesse de um número cada vez maior de produtores rurais para o cultivo de plantas medicinais e aromáticas (CORREIA JUNIOR; SCHEFFER; MING, 2006; VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). No Brasil é notória escassez de informações sobre espécies medicinais e aromáticas do Cerrado, um bioma brasileiro extremamente heterogêneo e bastante diverso (AZEVEDO et al., 2002; BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; GIULIETTI et al., 2005).

O gênero *Lippia* reúne aproximadamente 160 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, muitas das quais são ricas em óleos essenciais associada à presença de tricomas (SILVA et al., 2010; TOZIN; MARQUES; RODRIGUES, 2015). As propriedades medicinais mais características são antimicrobianas, antifúngica, repelente ou larvicida (BASSOLE et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; PASCUAL et al., 2001; SANTOS; INNECCO; SOARES, 2004). *Lippia rotundifolia* Cham., é uma espécie endêmica do Cerrado, encontrada na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e está em risco de extinção, pouco estudos foram feitos sobre esta espécie (LEITÃO et al., 2008; RESENDE et al., 2015). Grande parte no material vegetal obtido para indústrias químicas são provenientes do extrativismo o que ocasiona muitas vezes na extinção de muitas espécies que não foram domesticadas, bem como também o fornecimento de um produto final sem regularidade na qualidade e quantidade de óleo essencial. Com isso, percebemos a importância de mais estudos e no desenvolvimento de novas técnicas de cultivos desta espécie.

O cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui assim uma alternativa para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal. Técnicas como micropropagação, culturas de calos, raízes e suspensão celular de plantas medicinais, aromáticas e condimentares podem ser aplicadas, visando não só a propagação em larga escala de genótipos superiores como a produção de metabólitos secundários (JULIANI et al., 1999; MORAIS et al., 2012). A capacidade morfogenética está intimamente ligada a diversas variáveis externas, no entanto uma das que está tendo mais atenção na atualidade é a influência da luz (LIN et al., 2011).

A luz é o principal fator que controla o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo das plantas, sendo afetadas pela irradiância em todos os estágios do seu crescimento (COSTA et al., 2012; COSTA; CHAGAS, 2014). Estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de plantas medicinais e aromáticas têm demonstrado diferentes respostas em função da intensidade luminosa e do controle do espectro de luz durante o cultivo (ALVARENGA et al., 2015; CHANG; ALDERSON; WRIGHT, 2008).

A fonte de luz tradicional utilizada na cultura *in vitro* é a luz branca fluorescente, onde se trabalha geralmente com o objetivo de estudar intensidades de luz mais adequada de acordo com cada espécie estudada. Os diodos emissores de luz (LEDs) como uma nova fonte de energia têm muitas vantagens em comparação com a fonte de luz tradicional, porque os LEDs têm uma vida longa, especificidade de comprimento de onda e largura de banda estreita, o que permite pode-se ver diretamente a influência de

uma faixa de comprimento de onda mais específica no desenvolvimento da planta(LIN et al., 2011; YEH; CHUNG, 2009).A utilização de diferentes espectros de luz evocam diferentes respostas morfogenéticas e fotossintéticas que podem variar entre diferentes espécies de plantas. Tais fotorespostas são de importância prática nas tecnologias recentes de cultivo de plantas, uma vez que a viabilidade de adaptar espectros de iluminação permite controlar o crescimento, desenvolvimento e qualidade nutricional das plantas(LIN et al., 2013).

Objetivou-se avaliar o crescimento, a produção dos pigmentos fotossintéticos e a composição química principal da fração volátil de *Lippia rotundifolia* Cham. cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades de luz e espectros luminosos usando LEDs.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e condições experimentais

Foram inicialmente coletadas mudas de aproximadamente 15 cm de *Lippia rotundifolia* Cham. em São Gonçalo do Rio das Pedras, área de Cerrado em Minas Gerais. Após a coleta, as mudas foram aclimatizadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, MG. Exsicatas foram depositadas no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) sob o registro número 58027.

Gemas axilares foram coletadas das plantas doadoras com aproximadamente 3 meses após aclimatização. Os materiais coletados foram colocadas em água corrente por 30 minutos, depois imersas sob agitação em uma solução de água sanitária (hipoclorito de sódio ativo de 1%) por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar estéril, os explantes foram lavados quatro vezes em água destilada e autoclavada, e inoculados explantes de aproximadamente 1 cm em tubos de ensaio (25x150mm) com tampa plástica contendo 15 mL de meio. O meio de cultivo utilizado para estabelecimento foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) livre de regulador de crescimento, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar (A7921, Sigma-Aldrich®), e pH 5,7 ± 0,1 ajustado com NaOH e HCl (0,1 e 0,5 N), e autoclavado (125 °C, 15 minutos a 1,2 atm). Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com lâmpadas brancas frias fluorescentes e intensidade luminosa de 32 µmolm⁻²s⁻¹, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C.

Bioensaio de Intensidade de Luz

Foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de plântulas previamente pré-estabelecidas *in vitro*. O meio de cultivo utilizado foi o MS semissólido, livre de reguladores de crescimento. O explante foi inoculado ao tubo de ensaio contendo 15 mL de meio MS, acondicionado em diferentes tratamentos de intensidade de luz e mantido em sala de crescimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 5 tratamentos, utilizando lâmpadas fluorescentes branca fria (Osram©, Brasil) com 20, 54, 78, 88 e 110 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, aferidas por meio do medidor PRO CHECK + PAR PHOTON FLUX SENSOR, MODELO QSO-S (DECAGON DEVICES – Pullman-Washington-USA). Foram utilizadas 4 repetições, sendo cada repetição composta por 10 tubos contendo uma plântula cada, totalizando 40 plântulas analisadas por tratamento.

Os dados biométricos foram coletados após 45 dias, sendo avaliado comprimento de parte aérea (CPA), número de folhas (NF), biomassa seca de caule (BSC), folhas (BSF), raiz (BSR) e total (BST). Os parâmetros de biomassa seca foram realizados por meio de secagem do material vegetal, em estufa e circulação forçada de ar a 36 ± 2 °C, por aproximadamente 48 horas, até peso constante.

Bioensaio de Qualidade de Luz

Foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de plântulas previamente pré-estabelecidas *in vitro*. O meio de cultivo utilizado foi o MS semissólido, livre de reguladores de crescimento. O delineamento experimental utilizado foi o DIC, com 6 tratamentos utilizando lâmpadas do tipo LEDs (TECNAL© Piracicaba, Brasil) em diferentes espectros monocromáticos de luz, branco, vermelho, azul e interações: 1vermelho: 1 azul, 2,5 vermelho: 1 azul, 1vermelho: 2,5 azul. Os espectros de luz foram aferidos com o espectrômetro portátil SPECTRA PEN Z850, (Qubit Systems-Kingston, Ontario-USA), sendo os perfis espectrais registrados para cada tratamento na Figura 1.

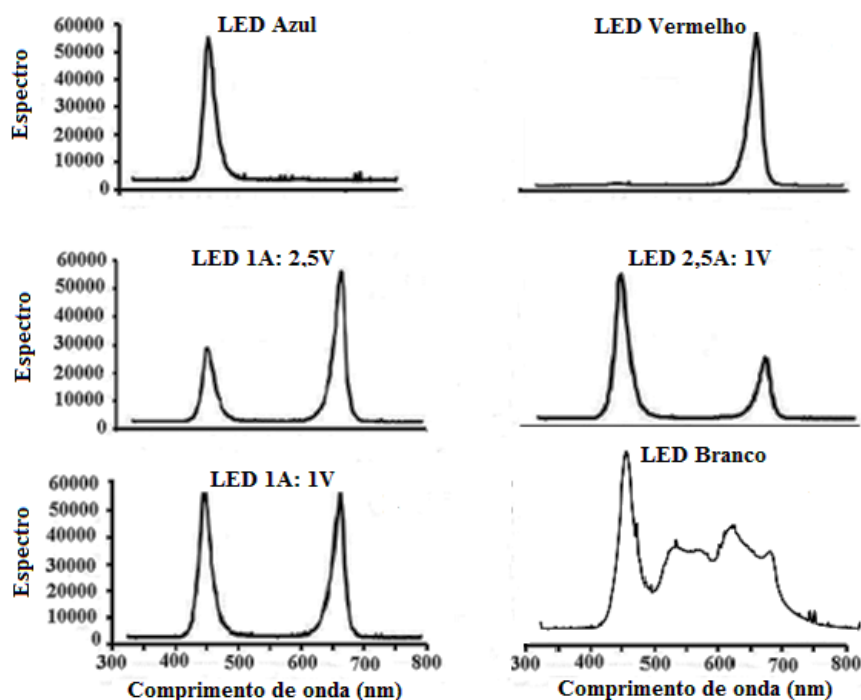


Figura 1. Perfis espectrais das lâmpadas de LEDs: azul, vermelha, 1 azul: 2,5 vermelho (1A: 2,5V), 2,5 azul: 1 vermelho (2,5A: 1V), 1 azul: 1 vermelho (1A: 1V) e branco.

Após 45 dias, foram avaliados os parâmetros biométricos, para isso foram utilizados 4 repetições com 10 tubos contendo 1 plântula cada, totalizando 40 plântulas analisadas por tratamento. Os parâmetros avaliados foram comprimento de parte aérea (CPA), número de folhas (NF), biomassa seca de caule (BSC), folhas (BSF), raiz (BSR) e total (BST).

Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Para determinação de pigmentos fotossintéticos, foram utilizadas folhas frescas, completamente expandidas, localizadas a partir do terceiro nó, 45 dias após a inoculação. A extração foi realizada conforme a metodologia descrita por Arnon (1949), utilizando 0,20 g de matéria fresca homogeneizada em 20 mL de acetona 80%, seguida da leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 470, 646,8 e 663,2nm, para clorofila a, b e carotenoides, respectivamente. A quantificação desses pigmentos fotossintéticos, a razão clorofila a:b, clorofila total e carotenoides, foram realizadas segundo metodologia de Lichthenthaler e Buschmann (2001).

Análise de compostos voláteis por HS-CG/EM

Para a análise de compostos voláteis foram utilizados de folhas desidratadas de *L. rotundifolia* de cada tratamento e reunidas em uma amostra composta. Alíquotas individuais de 100 mg de biomassa seca de folhas em triplicata foram adicionadas em vials para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE até as análises.

Na extração da fração volátil de *L. rotundifolia* empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático Combi PAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. As condições extrativas foram operadas pelos seguintes parâmetros: 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 automaticamente. A fração volátil foi analisada 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, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z* a uma velocidade de 1,0 scan/s. 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 da linha de transferência para o EM foram mantidas em 230 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3°C/min até 230 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 250°C, mantendo-se isotérmico por 1 minuto. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:20. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram expressas pela porcentagem de área normalizada dos picos cromatográficos.

Os constituintes da fração volátil foram identificados por comparação dos seus índices de retenção linear relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C₉-C₁₈, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST e do Adams (2017). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por Van den Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção da literatura Adams (2007).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Toda a análise foi realizada utilizando-se o software Sisvar®(FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Intensidade de Luz

Ao avaliar a influência da intensidade de luz no cultivo *in vitro* de *L. rotundifolia* Cham. observou-se que na maioria dos caracteres a planta se desenvolveu melhor em intensidades inferiores a $88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto, no parâmetro de comprimento de parte aérea, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 2). Também foi observada pouca influência da intensidade luminosa quanto ao número de folhas, em média 13 a 14 folhas na intensidade entre 20 e $88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e o menor número de folhas (11 folhas) na intensidade de $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 1).

A biomassa seca de caule teve valores máximos nas menores intensidade luminosas (20, 54 e $78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) apresentando valores de 5,0, 4,72 e 4,62 mg respectivamente (Tabela 1). Pode ser observado que conforme se aumentou a intensidade de luz houve declínio da biomassa do caule. Avaliando a biomassa de folhas os melhores tratamentos foram de 20 e $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com biomassa de 16,80 e 16 mg, enquanto que no tratamento de $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obteve a menor biomassa de folha (7,15 mg por planta). Podemos afirmar que com o aumento da intensidade luminosa há um decréscimo na biomassa de folha, sendo indicada para essa espécie intensidades de até $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os tratamentos de 20, 54 e $78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tiveram maior biomassa de raiz (2,86, 3,20 e 2,95 mg, respectivamente) e o tratamento de $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentou menor biomassa (1,08 mg por planta). Analisando a biomassa total, os tratamentos de 20 e $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram as maiores biomassas (25,29 e 23,92 mg) e a menor biomassa foi encontrada no tratamento de $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (11,43 mg).



Figura 2. Plântulas de *L. rotundifolia* cultivada *in vitro* em meio MS, sob diferentes intensidades de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante 45 dias.

Tabela 1. Análise de variância de dados biométricos de plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* em meio MS, sob diferentes intensidades de luz ($\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante 45 dias.

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	NF (n)	BSC (mgplanta ⁻¹)	BSF (mgplanta ⁻¹)	BSR (mgplanta ⁻¹)	BST (mgplanta ⁻¹)
20	13,90 ^a	5,00 ^a	16,80 ^a	2,86 ^a	25,29 ^a
54	14,05 ^a	4,72 ^a	16,00 ^a	3,20 ^a	23,92 ^a
78	13,55 ^a	4,62 ^a	14,20 ^b	2,95 ^a	21,20 ^b
88	13,33 ^a	3,40 ^b	10,52 ^c	2,00 ^b	15,49 ^c
110	11,15 ^b	3,21 ^b	7,15 ^d	1,08 ^c	11,43 ^d
CV (%)	8,62	14,82	5,98	15,27	8,06

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

CV coeficiente de variação dado em porcentagem.

NF número de folhas, BSC biomassa seca de caule, BSF biomassa seca de folhas, BSR biomassa seca de raiz, BST biomassa seca total.

Alguns autores também verificaram decréscimo na produção de biomassa seca total em plantas cultivadas em altas intensidades luminosas (CARVALHO et al., 2006; NAKAZONO et al., 2001). Quando uma energia luminosa excessiva é absorvida pelo

aparelho fotossintético e não é dissipada rapidamente, pode ser reduzida a eficiência fotossintética, resultado em uma fotoinibição e até mesmo danos ao centro de reação (FAN et al., 2013). A exposição prolongada a altas irradiâncias também pode prejudicar o desenvolvimento inicial de plântulas, por absorverem mais fótons de luz do que podem utilizar, podendo ter como consequência da fotoinibição (KITAO et al., 2000).

Através da análise quantitativa de conteúdo de pigmentos fotossintéticos da tabela 2, o conteúdo de clorofila a foi superior nos tratamentos de 20 e 54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no conteúdo de clorofila b o tratamento mais eficiente foi o de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e no conteúdo de clorofila total o tratamento de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obteve valor superior aos outros tratamentos.

Resultados similares foram encontrados por Viña et al (2001) e Fogaça et al (2007) em que constataram que a concentração de clorofila teve redução na presença de intensidades superiores a 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estes resultados provavelmente estão relacionados à velocidade de decomposição da clorofila, pois a clorofila é constantemente sintetizada e destruída em presença de luz, no entanto, quando submetida em intensidades luminosas elevadas a velocidade de decomposição pode ser maior.

Quanto ao conteúdo de carotenóides, observa-se um padrão diferente, onde na intensidade de 20, 88 e 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtiveram-se os maiores valores, não havendo diferença significativa entre eles. Isso pode ser explicado, pois estes pigmentos durante a fotossíntese podem desempenhar duas funções distintas: absorção de luz nos complexos de captação de luz atuando como pigmentos acessórios em baixas intensidades de luz, ou atuando como fotoprotetores do aparato fotoquímico evitando danos fotooxidativos às moléculas de clorofila em altas intensidades luminosas (LIMA; ZANELLA; CASTRO, 2010).

Tabela 2. Análise de variânciado conteúdo de pigmentos fotossintéticos por massa fresca de plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* em meio MS, sob diferentes intensidades de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante 45 dias.

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Chl a (gkg^{-1}MF)	Chl b (gkg^{-1}MF)	Chl Total (gkg^{-1}MF)	Carot (gkg^{-1}MF)
20	1,414 ^a	1,073 ^a	2,479 ^a	0,270 ^a
54	1,335 ^a	0,633 ^b	1,822 ^b	0,183 ^b
78	0,932 ^b	0,552 ^b	1,434 ^b	0,167 ^b
88	0,992 ^b	0,647 ^b	1,639 ^b	0,234 ^a
110	1,035 ^b	0,602 ^b	1,581 ^b	0,347 ^a
CV (%)	23,24	26,03	21,45	32,42

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). CV coeficiente de variação dado em porcentagem.

Chl a Clorofila a, Chl b Clorofila b, Chl Total Clorofila total, Carot Carotenóides.

Na análise da fração volátil de folhas de *L. rotundifolia* cultivada *in vitro* submetida à diferentes intensidade luminosas, identificaram em média mais de 90% da composição química total (dados não mostrados). Dependendo do tratamento cerca de 77 a 85% da composição química total corresponderam aos constituintes químicos mirceno (4,13 a 5,20 %), limoneno (1,97 a 3,57 %), mircenona (33,77 a 49,33 %), z-ocimenona (15,63 a 17,90 %) e pentadecano (11,03 a 21,17 %). Nas intensidades de 54 e 78 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ observaram-se um discreto aumento na composição química total dos constituintes principais, 85,53 e 83,71 %, respectivamente, em relação ao tratamento com 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (82,87 %). Enquanto que menores teores totais foram observados nas intensidade de 88 e 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 77,30 e 79,21 % respectivamente (Tabela 3).

Ao avaliar a variação no teor de mirceno não houve diferença significativa entre os tratamentos. Quanto ao teor de limoneno, o maior valor foi de 3,57% na intensidade de 54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foi observado uma redução no teor de mircenona nos tratamentos de maior intensidade luminosa (88 e 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) onde a porcentagem foi de 34,83 e 33,77% respectivamente, enquanto que na baixas intensidades de luz a porcentagem média foi de acima de 43%. O teor de z-ocimenona também não apresentou diferença significativa entre as diferentes intensidades luminosas. Quanto ao teor de pentadecano a maior porcentagem foi 21,17% na intensidade de 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabela 3. Análise de variância do teor de compostos voláteis majoritários de plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* e submetida a diferentes intensidades de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 45 dias.

IR ^a	Composto	Teor (%)				
		20	54	78	88	110
990	Mirceno	4,37 ^a	4,80 ^a	4,13 ^a	4,77 ^a	5,20 ^a
1026	Limoneno	2,87 ^b	3,57 ^a	2,50 ^b	1,97 ^c	2,70 ^b
1148	Mircenona	43,80 ^a	49,33 ^a	47,47 ^a	34,83 ^b	33,77 ^b
1230	Z-ocimenona	17,90 ^a	16,80 ^a	15,63 ^a	17,03 ^a	16,37 ^a
1500	Pentadecano	13,93 ^c	11,03 ^d	13,93 ^c	18,70 ^b	21,17 ^a
Total identificado (%)		82,87	85,53	83,66	77,30	79,21

IR^a Índice de retenção linear na série de alcanos (C₉-C₁₈), coluna HP-5MS na ordem de eluição. Médias com mesma letra dentro da mesma linha pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Na literatura, há relatos do aumento do teor de óleo essencial em plantas aromáticas com o aumento da taxa de luminosidade (CHANG; ALDERSON; WRIGHT, 2008; COSTA et al., 2010). Entretanto neste estudo foi observado que as intensidades luminosas mais altas (88 e 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) parecem estimular o acúmulo de pentadecano e diminuir o conteúdo de mircenona da fração volátil. O mirceno e o z-ocimenone aparentemente não sofreram influencia da intensidade de luz.

Em *Achillea millefolium*, a quantidade ea composição dos compostos voláteis variaram com a intensidade e qualidade da luz (ALVARENGA et al., 2015). Yu et al. (2005) relataram que o acúmulo de ginsenósideo foi maior nas culturas cultivadas sob luz fluorescente, enfatizando como as respostas da produção de metabólitos secundários à fonte de luz são dependentes de espécies. Entretanto, em estudo com *Lippia alba*, o genótipo pareceu ser um fator mais importante do que a qualidade da luz para explicar os efeitos de diferentes tratamentos no perfil de óleo essencial (BATISTA et al., 2016).

Qualidade de Luz

Ao avaliar a influência da qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *L. rotundifolia*, observamos que os diferentes espectros de luz afetam no crescimento das plântulas (Figura 3, Tabela 4). O espectro monocromático vermelho estimula o alongamento da parte aérea (7,80 cm), enquanto que os espectro monocromático azul e

1V:2,5A parecem inibir o crescimento da brotação (2,90 e 2,30 cm). O espectro de 2,5V: 1A apresentou o maior número de folhas (24,7). De modo geral, já foi observado em alguns estudos com qualidade espectral, que a radiação vermelha promove alongamento da parte aérea (ANTONOPOULOU et al., 2004; APPELGREN, 1991; BRAGA et al., 2009; CHANG et al., 2003).

Na análise de parâmetros de biomassa seca, os tratamentos no espectro vermelho, branco e 2,5V: 1A teve maiores biomassas de caule (11,8, 10,4 e 10,9 mg) enquanto que os menores valores foram encontrados no espectro do azul e 1V: 2,5A (5,4 e 5,0 mg). Quanto a biomassa seca de folhas, o tratamento mais eficiente foi de 1V: 1A (26,7 mg), no entanto os espectros do branco, 2,5V: 1A e 1V: 2,5A, não tiveram valores tão distantes em relação ao melhor tratamento (24,3, 23,5 e 21,3 mg). A biomassa seca de raiz foi maior no espectro do vermelho, branco, 1V: 1A e 2,5V: 1A, como os melhores tratamentos, em média acima de 3 mg. Foi observado na biomassa seca total, os tratamentos mais eficientes foram vermelho, branco, 1V: 1A e 2,5V: 1A obtendo em média uma massa entre 33 e 39 mg por planta. Observa-se que a maioria dos parâmetros de biomassa seca obtiveram maior acúmulo onde havia participação do espectro vermelho. Mesmo a luz LED branca possui espectro na faixa do vermelho (600-700 nm) (Figura 1). Quando foi utilizado o espectro monocromático azul ou maior proporção de azul (1V:2,5A) não houve acúmulo de biomassa seca na maioria dos parâmetros avaliados (Tabela 4).



Figura 3. Plântulas de *L. rotundifolia* cultivada *in vitro* em meio MS, sob diferentes espectros de luz, durante 45 dias. B branco, V vermelho, A azul.

Tabela 4. Análise de variação dos dados biométricos de plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivada *in vitro* em meio MS, sob diferentes espectros de luz, durante 45 dias.

Espectro de luz	CPA (cm)	NF (n)	BSC	BSF	BSR	BST
			(mgplanta ⁻¹)	(mgplanta ⁻¹)	(mgplanta ⁻¹)	(mgplanta ⁻¹)
Azul	2,90 ^c	22,5 ^b	5,4 ^c	17,0 ^c	1,0 ^b	23,4 ^b
Vermelho	7,80 ^a	19,7 ^c	11,8 ^a	17,3 ^c	4,3 ^a	33,4 ^a
Branco	6,08 ^b	22,2 ^b	10,4 ^a	24,3 ^b	3,1 ^a	35,9 ^a
1V: 1A	5,45 ^b	20,5 ^c	9,1 ^b	26,7 ^a	3,2 ^a	39,0 ^a
2,5V: 1A	5,88 ^b	24,7 ^a	10,9 ^a	23,5 ^b	2,9 ^a	36,4 ^a
1V: 2,5A	2,30 ^c	20,6 ^c	5,0 ^c	21,3 ^b	1,6 ^b	27,9 ^b
CV (%)	13,26	7,06	12,77	8,35	48,25	11,56

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

CV coeficiente de variação dado em porcentagem.

V vermelho, A azul, CPA comprimento de parte aérea, NF número de folhas, BSC biomassa seca de caule, BSF biomassa seca de folha, BSR biomassa seca de raiz, BST biomassa seca total.

Silva et al. (2017) observaram que no espectro vermelho monocromático e na maior proporção de vermelho para azul ocorreu maior crescimento em plântulas de *Plectranthus amboinicus*. No entanto, Alvarenga et al (2015) obtiveram maior crescimento de plântulas de *Achillea millefolium* com o uso do espectro azul.

A luz é um fator fundamental para as plantas pela ação direta ou indireta no controle do crescimento, do desenvolvimento e do metabolismo das plantas (ALMEIDA; MUNDSTOCK, 2001; CHANG; ALDERSON; WRIGHT, 2008; COSTA et al., 2010). As respostas da planta não dependem apenas de ausência ou presença de luz, mas também em qualidade luminosa (LEE et al., 2007; MACEDO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2009). O efeito da qualidade da luz é complexo e diferem de acordo com as espécies de plantas ou cultivares, estágio de desenvolvimento das plantas e outras características ambientais (GUPTA; JATOTHU, 2013; LI; TANG; XU, 2013; LI; XU; TANG, 2010; SILVA et al., 2014). Diferentes combinações de cores podem provocar variações no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, pois diferentes espectros de luz são necessários na síntese destes pigmentos (BRANT et al., 2011).

Para a fotossíntese, as plantas usam principalmente a luz dos comprimentos de onda de 400-500nm (azul) e 600-700nm (vermelho) nm, correspondendo ao fotossistema PS II e PS I (GOINS et al., 1997; ILIEVA et al., 2010). Em todos os estudos, a premissa básica é que a luz azul é vital para o crescimento e desenvolvimentos de plantas superiores, uma vez que os fotorreceptores de luz azul estão envolvidos na maioria dos eventos fotomorfológicos (CHRISTIE; BRIGGS, 2001). Entretanto é relatado que quando espectro azul é complementado com o espectro vermelho, a condutância estomática e as taxas fotossintéticas tendem a aumentar, e consequentemente haver um maior acúmulo de biomassa das plantas (HEUNG et al., 2006; SHIN et al., 2008; TANAKA; NORIKANE; WATANABE, 2009; YORIO et al., 2001). O acúmulo de biomassa onde há presença do espectro vermelho pode estar associado com a suscetibilidade do fitocromo a tal espectro. Runkle e Heins (2001) reportam que os picos de absorção do fitocromo são encontrados sob o espectro do vermelho e do vermelho distante.

Observa-se que o conteúdo de clorofila a foi maior nos tratamentos azul, vermelho, 2,5V: 1A e 1V: 2,5A, enquanto que o conteúdo de clorofila b o melhor tratamento foi o espectro branco (Tabela 5). O conteúdo de clorofila total os melhores tratamentos foram azul, branco, 2,5V: 1A e 1V: 2,5A. A razão clorofila a:b, obteve maior média (2,04) no espectro vermelho, onde apesar de maior em relação aos outros tratamentos, ainda é considerada baixa. Lichtenthaler et al (2001) reportam que as razões entre 2,5 a 3,5 em plantas C3 são consideradas normais, independente do estágio de desenvolvimento e em baixa e alta condições luminosas.

Os espectros monocromáticos azul e vermelho apresentaram maior conteúdo de carotenoides (0,216 e 0,233g.kg⁻¹MF), valores muito superiores à média dos outros tratamentos (Tabela 5). Resultados similares foram encontrados em Maluta et al (2013) em plantas de cana-de-açúcar e resultados contrários por Silva et al (2014) também em plantas de cana, isso comprova o efeito complexo da qualidade da luz, onde estágio de desenvolvimento, espécie ou mesmo cultivar pode resultar um resultado diferente. Os maiores conteúdos de pigmentos fotossintéticos em plantas cultivadas sob LEDs azul/vermelho dão suporte ao fato de que há um maior uso da luz nessas regiões do espectro visível. A luz vermelha atua no desenvolvimento da estrutura fotossintética das plantas, e a luz azul é necessária para o funcionamento fotossintético e atua no crescimento e aclimação das plantas às condições ambientais (COSTA et al., 2012; HOGEWONING et al., 2012).

Tabela 5. Análise de médias do conteúdo de pigmentos fotossintéticos por massa fresca de plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* em meio MS, sob diferentes espectros de luz, durante 45 dias.

Espectros de luz	Chl a (gkg ⁻¹ MF)	Chl b (gkg ⁻¹ MF)	Chl Total (gkg ⁻¹ MF)	Chl a: Chl b	Carot (gkg ⁻¹ MF)
Azul	1,20 ^a	0,77 ^b	1,99 ^a	1,61 ^b	0,248 ^a
Vermelho	1,16 ^a	0,55 ^c	1,63 ^b	2,04 ^a	0,233 ^a
Branco	1,00 ^b	1,02 ^a	1,76 ^a	1,17 ^c	0,058 ^c
1V: 1A	0,83 ^c	0,59 ^c	1,42 ^b	1,39 ^b	0,060 ^c
2,5V: 1A	1,21 ^a	0,87 ^b	1,98 ^a	1,43 ^b	0,099 ^b
1V: 2,5A	1,16 ^a	0,75 ^b	1,93 ^a	1,49 ^b	0,062 ^c
CV (%)	13,03	18,76	12,72	14,97	25,81

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). CV coeficiente de variação dado em porcentagem, V vermelho, A azul, Chl a Clorofila a, Chl b Clorofila b, Chl Total Clorofila total, Carot Carotenóides.

Avaliando os parâmetros biométricos e de conteúdo de pigmentos fotossintéticos, observa-se que os tratamentos com combinação de LEDs vermelho e azul são os que apresentaram melhores resultados. O tratamento de 2,5V: 1A apresentou maiores valores de clorofila A e clorofila Total, e também apresentou um dos maiores valores de biomassa total, indicando que o maior conteúdo de clorofila influenciou positivamente no acúmulo de biomassa. Uma mistura de fontes de luz vermelha mais azul pode combinar as vantagens do espectromonocrômico vermelho e espectro monocrômico azul, e tal mistura pode superar as desvantagens individuais destas luzes. Portanto, a mistura de luz vermelha e azul promoveu crescimento de plântulas, mas a melhor proporção pode ser específica para cada espécie de planta (LI; TANG; XU, 2013).

Na análise da fração volátil de *L. rotundifolia* cultivada *in vitro* submetida à diferentes espectros de luz, mais de 87 % da composição química total foi representada por cinco constituintes químicos voláteis, sendo a mircenona o constituinte majoritário com teores entre 33,25 e 47,09 %. Os demais constituintes foram o mirceno (16,99 a 23,51 %), limoneno (8,19 a 12,96 %), z-ocimenona (12,02 a 15,49 %) e pentadecano (3,20 a 6,11 %) (Tabela 6).

Observou-se que o teor de mirceno foi maior no espectro monocromático azul e vermelho com porcentagens de 23,51 e 21,63 %, respectivamente. O maior teor de limoneno (12,96 %) foi encontrado quando utilizado o espectro azul. O tratamento que utilizou o espectro azul aparentemente diminuiu o conteúdo de mircenona (33,25 %), tendo em vista que a média dos outros tratamentos foi superior a 40%. Observou-se que o conteúdo de z-ocimenona não variou com os diferentes tratamentos de luz. O teores de pentadecano foram menores no espectro monocromático azul e vermelho (4,50 e 3,20 %) enquanto que os outros tratamentos obtiveram teores médios de cerca de 6%.

Tabela 6. Análise de variância do teor (%) dos compostos voláteis de plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* e submetida a diferentes espectros de luz, durante 45 dias.

IR ^a	Composto	Teor (%)					
		Azul	Vermelho	Branco	1V: 1A	2,5V: 1A	1V: 2,5A
990	Mirceno	23,51 ^a	21,63 ^a	17,64 ^b	16,99 ^b	17,59 ^b	18,56 ^b
1026	Limoneno	12,96 ^a	8,19 ^b	8,68 ^b	9,37 ^b	8,52 ^b	10,42 ^b
1148	Mircenona	33,25 ^b	47,09 ^a	43,06 ^a	42,28 ^a	42,95 ^a	40,07 ^a
1230	Z-ocimenona	15,44 ^a	12,02 ^a	14,36 ^a	15,49 ^a	13,56 ^a	14,60 ^a
1500	Pentadecano	4,50 ^b	3,20 ^c	6,15 ^a	5,98 ^a	6,11 ^a	5,95 ^a
Total identificado(%)		89,66	92,13	89,89	90,11	88,73	89,60

IR^a Índice de retenção linear na série de alcanos (C₉-C₁₈), coluna HP-5MS na ordem de eluição. V vermelho, A azul. Médias com mesma letra dentro da mesma linha pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Verificou-se que as condições de luz alteram o perfil de constituintes voláteis, agindo diferentemente em cada composto isolado e conseqüentemente no teor total dos constituintes químicos. O composto químico z-ocimenona, com base nos experimentos realizados, parece não ter seu teor afetado pela intensidade luminosa ou pelos diferentes espectros luminosos, enquanto que o teor de mirceno não é afetado pela intensidade luminosa. A variação nos constituintes voláteis é uma contribuição importante para o estudo de plantas medicinais *in vitro*, já que existem poucos estudos relatando como a luz atua na biossíntese de terpenos.

CONCLUSÕES

A manipulação da intensidade e qualidade luminosa no cultivo *in vitro* de *Lippia rotundifolia* Cham. influenciou no crescimento das plântulas, na produção de pigmentos fotossintéticos e nos constituintes voláteis. As menores intensidades luminosas, 20 e 54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proporcionaram maior crescimento, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e acúmulo de biomassa. O mirceno e a z-ocimenona não foram afetados pelas diferentes intensidades luminosas. O maior teor de limoneno foi na intensidade de 54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e o de mircenona foram nas intensidades inferiores a 78 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O pentadecano teve um comportamento contrário onde o maior teor foi na intensidade de 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Quanto a qualidade de luz, o espectro do vermelho e azul combinados estimularam mais o crescimento das plântulas, a combinação 2,5V:1A obteve melhores dados biométricos e no conteúdo de clorofila total. Os teores do composto químico z-ocimenona não foi influenciado pelos diferentes espectros de luz. O espectro monocromático azul e vermelho aumentaram o teor de mirceno. O espectro monocromático azul estimulou o teor de limoneno, porém teve efeito inverso no teor de mircenona. Os maiores teores de pentadecano foram no espectro branco e nas combinações de vermelho e azul.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo e produtividade.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ALMEIDA, M. L. DE; MUNDSTOCK, C. M. O afilhamento da aveia afetado pela qualidade da luz em plantas sob competição. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 393–400, 2001.
- 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 (PCTOC)**, v. 122, n. 2, p. 299–308, 2015.

ANTONOPOULOU, C. et al. The Influence of Radiation Quality on the in vitro Rooting and Nutrient Concentrations of Peach Rootstock. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 4, p. 549–553, 2004.

APPELGREN, M. **Effects of light quality on stem elongation of *Pelargonium in vitro*** *Scientia Horticulturae*. [s.l.: s.n.].

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in beta vulgaris. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1949.

AZEVEDO, N. . et al. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 3, p. 205–216, 2002.

BASSOLE, I. H. N. et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 209–212, 2003.

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

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

BRAGA, F. T. et al. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: Características morfofisiológicas. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 502–508, 2009.

BRANT, R. S. et al. Adaptações fisiológicas e anatômicas de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) cultivadas sob malhas termorrefletoras em diferentes intensidades luminosas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 467–474, 2011.

CARVALHO, N. O. S. et al. Crescimento inicial de plantas de licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.) em diferentes níveis de luminosidade. **Revista Árvore**, v. 30, n. 3, p. 351–357, 2006.

CHANG, H. S. et al. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via in vitro shoot tip proliferation. **In Vitro Cellular {&} Developmental Biology - Plant**, v. 39, n. 2, p. 129–134, 2003.

CHANG, X.; ALDERSON, P. G.; WRIGHT, C. J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1, p. 216–223, 2008.

CHRISTIE, J. M.; BRIGGS, W. R. Blue Light Sensing in Higher Plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 15, p. 11457–11460, 2001.

CORREIA JUNIOR, C.; SCHEFFER, M. C.; MING, L. C. **Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Brasília: Ministério de Desenvolvimento Agrário, 2006.

- COSTA, A. G. et al. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta cultivada sob malhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 534–540, 2012.
- COSTA, A. G.; CHAGAS, J. H. Níveis de sombreamento e tipos de malha no crescimento e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 194–199, 2014.
- COSTA, L. C. B. et al. Yield and composition of the essential oil of *Ocimum selloi* Benth. cultivated under colored netting. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 1, p. 34–39, 2010.
- FAN, X.-X. et al. Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. **Scientia Horticulturae**, v. 153, p. 50–55, 2013.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistemas de Análises de Variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos** LavrasUFLA, , 2011.
- FOGAÇA, L. A. et al. Características morfofisiológicas de brotos micropropagados de Agapantho sob diferentes intensidade luminosas e concentrações de sacarose. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 4, p. 371–378, 2007.
- GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52–61, 2005.
- GOINS, G. D. et al. Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. **Journal of experimental botany**, v. 48, n. 312, p. 1407–1413, 1997.
- GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 211–220, 2013.
- HEUNG, K. M. et al. Growth of Tsuru-rindo (*Tripterospermum japonicum*) cultured in vitro under various sources of light-emitting diode (LED) irradiation. **Journal of Plant Biology**, v. 49, n. 2, p. 174–179, 2006.
- HOGEWONING, S. W. et al. Photosynthetic Quantum Yield Dynamics: From Photosystems to Leaves. **The Plant Cell**, v. 24, n. 5, p. 1921–1935, 2012.
- ILIEVA, I. et al. Plant experiments with light-emitting diode module in Svet space greenhouse. **Advances in Space Research**, v. 46, n. 7, p. 840–845, 2010.
- JULIANI, H. R. et al. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, n. 3, p. 175–179, 1999.
- KITAO, M. et al. Susceptibility to photoinhibition of three deciduous broadleaf tree species with different successional traits raised under various light regimes. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 1, p. 81–89, 2000.
- LEE, S.-H. et al. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* (L.)

- Dunal. plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 2, p. 141–151, 2007.
- LEITÃO, S. G. et al. Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1388–1393, 2008.
- LI, H.; TANG, C.; XU, Z. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 117–124, 2013.
- LI, H.; XU, Z.; TANG, C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 103, n. 2, p. 155–163, 2010.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement And Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. F4.3.1-F4.3.8, 2001.
- LIMA, A. L. DA S.; ZANELLA, F.; CASTRO, L. D. M. DE. Crescimento de *Hymenaea courbaril* L. var. stilbocarpa (Hayne) Lee et Lang. e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Leguminosae) sob diferentes níveis de sombreamento. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 43–48, 2010.
- LIN, K.-H. et al. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 86–91, 2013.
- LIN, Y. et al. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 3, p. 329–335, 2011.
- MACEDO, A. F. et al. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, n. 1, p. 43–50, 2011.
- MALUTA, F. A. et al. Cultivo in vitro de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1303–1307, 2013.
- MORAIS, T. P. et al. Applications of tissue culture in medicinal plants. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. **Physiol. Plant**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- NAKAZONO, E. M. et al. Crescimento inicial de *Euterpe edulis* Mart. em diferentes regimes de luz. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 173–179, jun. 2001.
- NIST: National Institute of Standards and Technology— Chemistry Web Book.** Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 10 nov. 2016.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 103–108, 2006.

- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201–214, 2001.
- RESENDE, C. F. DE et al. In vitro propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian campos rupestres. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 46, n. 3, p. 582–589, 2015.
- RIBEIRO, M. D. N. O. et al. Multiplicação in vitro de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2388–2393, 2009.
- RUNKLE, E. S.; HEINS, R. D. Specific functions of Red, Far Red, and Blue light in flowering and stem extension of long-day plants. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 126, n. 3, p. 275–282, 2001.
- SANTOS, M. R. A DOS; INNECCO, R.; SOARES, A. A. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 35, n. 2, p. 377–383, 2004.
- SHIN, K. S. et al. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 3, p. 339–343, 2008.
- SILVA, M. M. A. et al. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets in vitro. **Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE**, v. 8947, p. 89471X, 2014.
- SILVA, P. S. et al. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 843–849, 2010.
- SOUZA, G. S. DE et al. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de plantas de alecrim cultivadas sob telas coloridas. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3 SUPPL. 1, p. 232–239, 2014.
- TANAKA, M.; NORIKANE, A.; WATANABE, T. Cold cathode fluorescent lamps (CCFL): Revolutionary light source for plant micropropagation. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 23, n. 4, p. 1497–1503, 2009.
- TOZIN, L. R. S.; MARQUES, M. O. M.; RODRIGUES, T. M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* kunth (Verbenaceae) in the Brazilian cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 943–953, 2015.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, n. 3, p. 463–471, 1963.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.
- VIÑA, G. DE LA; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, n. 3, p. 229, 2001.

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, 2009.

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

YU, K.-W. et al. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 53–56, 2005.

ARTIGO 3

SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL, CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Lippia rotundifolia* Cham.

NATURAL VENTILATION SYSTEM, SACAROSE CONCENTRATIONS AND ANALYSIS OF VOLATILE FRACTION *IN VITRO* CULTIVATION OF *Lippia rotundifolia* Cham.

RESUMO

A micropropagação é um método amplamente difundido, entretanto apresenta algumas limitações como perda de plântulas por contaminação, pouco enraizamento, baixas taxas de transpiração, fotossíntese e baixa porcentagem de sobrevivência na fase de aclimatização. Parte destes problemas é causada pelo tipo de vedação utilizado nos frascos de cultivo e que impedem as trocas gasosas entre o ambiente *in vitro* e *ex vitro*. Espécies do gênero *Lippia* apresentam importância econômica devido ao vasto uso dos seus óleos essenciais e às suas propriedades medicinais. Objetivou-se avaliar o sistema de ventilação natural utilizando membranas porosas e diferentes concentrações de sacarose em meio MS no crescimento e conteúdo da fração volátil de plântulas de *Lippia rotundifolia* Cham. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 12 tratamentos, consistindo em um sistema fatorial de 4 sistemas de ventilação e 3 concentrações de sacarose. Os tratamentos foram: sistema sem membrana porosa (SC) e três sistemas de ventilação natural (SVN) contendo 1, 2 e 4 membranas porosas. As concentrações de sacarose utilizadas foram 0, 15 e 30 g L⁻¹. Os sistemas de ventilação natural foram superiores ao sistema sem membranas porosas. O sistema de ventilação natural com 2 e 4 membranas porosas e 15 g L⁻¹ de sacarose no meio MS proporcionaram maiores índices de crescimento *in vitro* em *L. rotundifolia*. O uso do sistema de ventilação natural utilizando membranas porosas manufaturadas mostrou-se um método de cultivo *in vitro* mais eficiente em relação ao sistema sem membranas porosas. O sistema de ventilação com duas e quatro membranas porosas (SV2 e SV4) e com a concentração de sacarose de 15 g L⁻¹ se mostraram os mais eficiente, visto que neste sistema de ventilação, percebemos um aumento na taxa fotossintética e menor perda de água por evaporação. De modo geral, os sistemas de ventilação natural indicaram apresentar um papel menos importante que a concentração de sacarose para o acúmulo do compostos voláteis de *L. rotundifolia* Cham. *in vitro*.

Palavras-chave: Membranas porosas, açúcar, clorofila, área foliar, compostos voláteis.

ABSTRACT

Micropropagation is a widely used method, however it has some limitations such as loss of seedlings due to contamination, low rooting, low rates of transpiration and photosynthesis, and low percentage of survival in the acclimatization phase. Part of these problems is caused by the type of fence used in culture flasks and which prevents gas exchanges between the *in vitro* and *ex vitro* environment. Species of the genus *Lippia* are economically important because of the vast use of their essential oils and their medicinal properties. The objective of this study was to evaluate the natural ventilation system using porous membranes and different concentrations of sucrose in MS medium in the growth and volatile fraction content of *Lippia rotundifolia* Cham. The experimental design was completely randomized (DIC), with 12 treatments, consisting of a factorial system of 4 ventilation systems and 3 sucrose concentrations. The treatments were: system without porous membranes (SC) and three natural ventilation systems (SVN) containing 1, 2 and 4 porous membranes. The concentrations of sucrose used were 0, 15 and 30 g L⁻¹. The natural ventilation systems were superior to the system without porous membranes. The natural ventilation system with 2 and 4 porous membranes and 15 g L⁻¹ of sucrose in the MS medium provided higher *in vitro* growth rates in *L. rotundifolia*. The use of the natural ventilation system using manufactured porous membranes proved to be a more efficient *in vitro* culture method compared to the system without porous membranes. The ventilation system with two and four porous membranes (SV2 and SV4) and the sucrose concentration of 15 g L⁻¹ were the most efficient, since in this ventilation system, we noticed an increase in the photosynthetic rate and lower loss of water by evaporation. In general, natural ventilation systems have indicated to play a less important role than the concentration of sucrose for the accumulation of volatile compounds of *L. rotundifolia* Cham. *in vitro*.

Keywords: Porous membranes, sugar, chlorophyll, leaf area, volatile compounds.

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Lippia* possuem importância econômica devido ao vasto uso dos seus óleos essenciais e às suas propriedades medicinais (PASCUAL *et al.*, 2001). As propriedades medicinais mais característica nas espécies desse gênero são principalmente antimicrobianas, antifúngica, repelente ou larvicida (BASSOLE *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006; PASCUAL *et al.*, 2001; SANTOS; INNECCO; SOARES, 2004).

A *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae), é uma espécie endêmica do Cerrado, encontrada na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais, caracterizada pela presença de tricomas glandulares em suas folhas, ricos em monoterpenos. Dentro dos compostos voláteis encontrados em *L. rotundifolia* estão presentes os compostos

majoritários limoneno, mirceno e mircenal (LEITÃO *et al.*, 2008; RESENDE *et al.*, 2015). Estudos agrônômicos da espécie relatam sua baixa taxa de germinação de sementes, atingindo um máximo de 40 por cento quando submetido a concentrações de GA₃ e quanto a métodos de propagação vegetativa convencional, são baixos os percentuais de enraizamento e sobrevivência de mudas. Com base nestes dados agrônômicos e a um alto risco de extinção devido ao seu extrativismo ressalta a importância de mais estudos sobre essa espécie (PIMENTA *et al.*, 2007; SALIMENA; SILVA, 2009).

A micropropagação de plantas medicinais tem se difundido devido à possibilidade de produzir um grande número de plantas homogêneas e com elevada qualidade sanitária, a possibilidade de conservar o germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade, além de auxiliar no melhoramento genético (MORAIS *et al.*, 2012; ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000). No entanto, o uso generalizado da micropropagação é ainda limitado principalmente a uma perda significativa de plântulas *in vitro* devido à contaminação microbiana, perturbações fisiológicas e morfológicas, pouco enraizamento e baixa porcentagem de sobrevivência na fase de aclimatização *ex vitro* (HAZARIKA, 2006; MAJADA *et al.*, 2002; MAKUNGA; JÄGER; VAN STADEN, 2006).

As plantas desenvolvidas em cultivo *in vitro* normalmente requerem uma vedação para o recipiente de cultura que evita a contaminação e a desidratação dos explantes e dos meios. Entretanto, o tipo de vedação ou tampa pode limitar a troca de gases entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro*, levando a distúrbios morfofisiológicos que causam alta mortalidade de plantas durante a aclimatização (ALVAREZ *et al.*, 2012; NGUYEN; KOZAI, 2001).

Nestes sistemas, há baixas taxas de transpiração e fotossíntese, restrição de absorção de água e nutrientes, o que reduz a taxa de crescimento do explante (SALDANHA *et al.*, 2012). Além disso, a alta umidade relativa no interior do vaso de cultura reduz a deposição de ceras epicuticulares, bem como o desenvolvimento de estômatos funcionais, o que pode levar a perdas durante a aclimatização (CHANDRA *et al.*, 2010). Para melhorar a ventilação dos frascos de cultura *in vitro*, podem ser utilizadas tampas diferenciadas com membranas que permitem modificações no microambiente do frasco, provocando maiores trocas gasosas, redução da umidade relativa, redução da concentração do etileno, aumenta a transpiração das plantas, a

absorção de água e nutrientes (KOZAI, 2010; KOZAI; KUBOTA, 2001; XIAO; NIU; KOZAI, 2011).

Atualmente, várias membranas estão comercialmente disponíveis, que promovem a troca gasosa em tubos de ensaio *in vitro*, entretanto possuem um alto custo para manutenção. Saldanha et al. (2012) desenvolveu membranas construídas artesanalmente combinando fita microporosas e politetrafluoroetileno (PTFE) como membranas alternativas baratas, que podem ser usadas para promover a troca gasosa e apresentar sucesso na propagação *in vitro*.

Assim, objetivou-se avaliar o sistema de ventilação natural utilizando membranas porosas e diferentes concentrações de sacarose em meio MS no crescimento *in vitro* e no conteúdo da fração volátil de plântulas de *Lippia rotundifolia* Cham.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições experimentais

Foram inicialmente coletadas mudas de aproximadamente 15 cm de *Lippia rotundifolia* Cham. em São Gonçalo do Rio das Pedras, área de Cerrado em Minas Gerais. Após a coleta, as mudas foram aclimatizadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, MG. Exsiccatas foram depositadas no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) sob o registro número 58027.

Gemas axilares foram coletadas das plantas doadoras com aproximadamente 3 meses após aclimatização. Os materiais coletados foram colocadas em água corrente por 30 minutos, depois imersas sob agitação em uma solução de água sanitária (hipoclorito de sódio ativo de 1%) por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar estéril, os explantes foram lavados quatro vezes em água destilada e autoclavada, e inoculados explantes de aproximadamente 1 cm em tubos de ensaio (25x150mm) com tampa plástica contendo 15 mL de meio.

O meio de cultivo utilizado para estabelecimento foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) livre de regulador de crescimento, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar (A7921, Sigma-Aldrich®), e pH 5,7 ± 0,1 ajustado com NaOH e HCl (0,1 e 0,5 N), e autoclavado (125 °C, 15 minutos a 1,2 atm). Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com lâmpadas brancas frias fluorescentes e intensidade luminosa de 32 μmolm⁻²s⁻¹, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2 °C.

Cultivo in vitro

No experimento foram utilizados como explante segmentos nodais de aproximadamente 1 cm e com um par de folhas expandidas, oriundos de plântulas previamente pré-estabelecidas *in vitro*. O meio de cultivo utilizado foi o MS semissólido sem adição de reguladores de crescimento. Os explantes foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL contendo 50 mL de meio MS, mantido em sala de crescimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 12 tratamentos, consistindo em um sistema fatorial de 4 sistemas de ventilação e 3 concentrações de sacarose ao meio MS. Os tratamentos foram: sistema sem membrana porosa (SC) e três sistemas de ventilação natural (SVN) contendo 1, 2 e 4 membranas porosas. As concentrações de sacarose utilizadas foram 0, 15 e 30 g L⁻¹. Foram utilizadas 5 repetições, sendo cada repetição composta por 4 plântulas cada, totalizando 20 plântulas analisadas por tratamento.

As membranas foram manufaturadas artesanalmente conforme Saldanha et al. (2012). Utilizou-se fita microporosa bege e PTFE (politetrafluoroetileno) (Figura 1A). As membranas porosas consistiam de 4 camadas, sendo a primeira camada de fita microporosa bege, a segunda de PTFE e a terceira também de fita microporosa bege. Após estas etapas, as três camadas foram cortadas em quadrados de 1,0 cm² (Figuras 1B, 1C, 1D e 1F, respectivamente). As camadas em quadrados de 1,0 cm² foram distribuídas separadamente sobre a face colável da fita microporosa bege, totalizando as quatro camadas. Por fim, as camadas em quadrados foram cortadas homoganeamente e coladas sobre os furos de 1,0 cm de diâmetro presentes nas tampas dos recipientes de cultivo (Figura 1G, 1H e 1I, respectivamente).

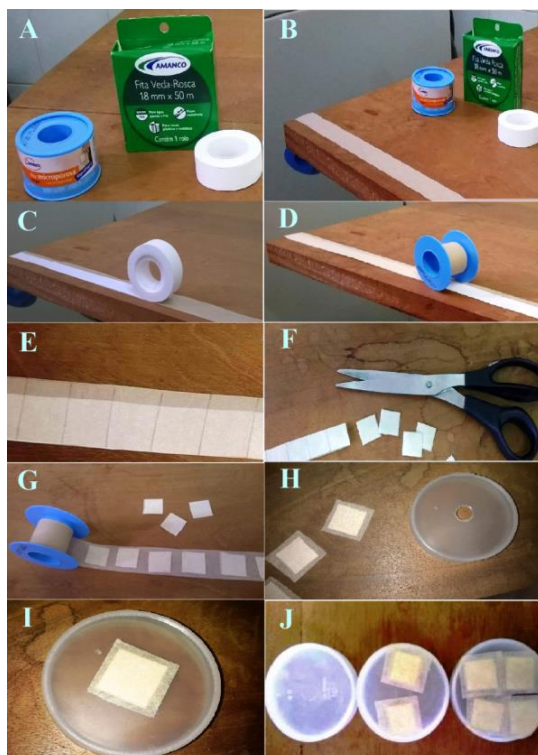


Figura 1. Esquema de montagem das membranas porosas manufaturadas para o sistema de ventilação natural (SVN) (sequência A-J). Lavras, 2016. Fotos Giulia Duarte.

Análise de parâmetros de crescimento in vitro

Os dados biométricos foram coletados após 45 dias, sendo avaliado comprimento de parte aérea (CPA), biomassa seca de caule (BSC), folhas (BSF), raiz (BSR) e total (BST). Os parâmetros de biomassa seca foram realizados por meio de secagem do material vegetal, em estufa e circulação forçada de ar a 36 ± 2 °C, por aproximadamente 48 horas, até peso constante.

Para determinação de área foliar, foram escolhidas aleatoriamente 9 plantas representativas de cada tratamento e foram mensuradas pelo *software* WinFOLIA™ (Regent instruments Inc.). Em cada uma das plântulas, todas as folhas foram retiradas e distribuídas no scanner EPSON PERFECTION V700 PHOTO. As variáveis analisadas foram calculadas conforme Benincasa (2004), e avaliou-se área foliar total da plântula (AFT), razão de área foliar ($RAF = AFT/BST$), área foliar específica ($AFE = AFT/BSF$), massa foliar específica ($MFE = BSF/AFT$) e razão de peso das folhas ($RPF = BSF/BST$).

Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Para determinação de pigmentos fotossintéticos, foram utilizadas folhas frescas, completamente expandidas, localizadas no terceiro nó, 45 dias após a inoculação. A extração foi realizada conforme a metodologia descrita por Arnon (1949), utilizando 0,05 g de matéria fresca homogeneizada em 10 mL de acetona 80%, seguida da leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 470, 646,8 e 663,2 nm, para clorofila a, b e carotenoides, respectivamente. A quantificação desses pigmentos fotossintéticos, carotenoides e a razão clorofila a:b, foram realizadas segundo metodologia descrita em Lichthenthaler e Buschmann (2001).

Análise de compostos voláteis por HS-CG/EM

Para a análise de compostos voláteis foram utilizados de folhas desidratadas de *L. rotundifolia* de cada tratamento e reunidas em uma amostra composta. Alíquotas individuais de 100 mg de biomassa seca de folhas em triplicata foram adicionadas em vials para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE até as análises.

Para extração da fração volátil de *L. rotundifolia* empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático Combi PAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. As condições extrativas foram operadas pelos seguintes parâmetros: 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 automaticamente. A fração volátil foi analisada 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, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z* a uma velocidade de 1,0 scan/s.

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 da linha de transferência para o EM foram mantidas em 230 °C e 240°C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3°C/min até 230° C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 250°C, mantendo-se isotérmico por 1 minuto. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão

de injeção de 1:20. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram expressas pela porcentagem de área normalizada dos picos cromatográficos.

Os constituintes da fração volátil foram identificados por comparação dos seus índices de retenção linear relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C₉-C₁₈, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST e do Adams (2017). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por Van den Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção da literatura Adams (2007).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com dois fatores quando houver interação significativa e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Toda a análise foi realizada utilizando-se o software Sisvar® (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de membranas porosas e as concentrações de sacarose utilizadas afetaram significativamente o cultivo *in vitro* de *Lippia rotundifolia* Cham (Tabela 1). Através de uma análise visual nas plântulas percebe-se que os tratamentos sem sacarose (0 g L⁻¹) com o uso de 2 e 4 membranas porosas cresceram mais. Observa-se menor desenvolvimento de parte aérea e sistema radicular com o uso do sistema sem membrana e com apenas 1 membrana porosa (Figuras 2 e 3).

Nota-se que após 45 dias de cultivo o volume de meio dos frascos reduz consideravelmente quanto utilizado 2 e 4 membranas porosas (Figura 2). A utilização das membranas porosas permite uma maior evapotranspiração ocorrendo assim uma perda de água no meio de cultivo. O sistema de ventilação natural reduz a umidade relativa e o etileno dentro do frasco, com isso promove maior transpiração e absorção mineral das plantas *in vitro*, acarretando maior crescimento (ERIG; SCHUCH, 2005; KOZAI; KUBOTA, 2001).

Através dos resultados obtidos, onde houve desenvolvimento vegetativo em sistema sem membranas porosas e sem sacarose, notamos à hipótese errada de que todos os tipos de explantes *in vitro*, incluindo explantes folhosos, não possuem ou têm uma capacidade fotossintética muito baixa, de modo que as adições de açúcar e

reguladores de crescimento em meio são indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento de explantes (KOZAI, 2010).

Dentro do sistema sem membrana porosa, observa-se que nos tratamentos de 0 e 15 g L⁻¹ de sacarose houve pouco desenvolvimento radicular. Entretanto quando utilizado 30 g L⁻¹ no sistema sem membrana porosa, houve desenvolvimento da parte aérea e raiz. (Figura 3). A indução de raízes e o desenvolvimento radicular de plantas micropropagadas em condições fotoautotróficas são melhores do que em plantas cultivadas em condições fotomixotróficas, visto que, um aumento do nível de CO₂ desempenha um papel fundamental como suporte energético para o início da raiz (HAZARIKA, 2006; MOSALEEYANON; CHA-UM; KIRDMANEE, 2004).



Figura 2. Plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose (0, 1,5 e 3,0 %) e o uso de sistemas sem membrana porosa, com 1, 2 e 4 membranas, mostrando o crescimento da parte aérea e o volume do meio de cultivo, após 45 dias



Figura 3. Plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose (0, 1,5 e 3,0 %) e o uso de sistemas sem membrana porosa, com 1, 2 e 4 membranas, mostrando o crescimento da parte aérea e do sistema radicular, após 45 dias

Os parâmetros de comprimento de parte aérea (CPA), biomassa seca de caule (BSC), folha (BSF), raiz (BSR) e total (BST) não apresentaram interação entre o sistema o uso de membranas e a concentração de sacarose. A utilização de diferentes números de membranas porosas ou não, influenciou os parâmetros de BSC, BSF, BSR e BST (Tabela 1). O cultivo do explante com a utilização de 4 membranas porosas proporcionou o maior acúmulo de biomassa em todos parâmetros avaliados. Em relação a BSC, o uso de 2 membranas não diferiu em relação ao uso de 4 membranas.

O cultivo do explante em frasco com a utilização de 4 membranas porosas obteve um acúmulo de 65% em BSC, 107% em BSF em comparação com o sistema sem membrana. O uso de 1 ou 2 membranas porosas também beneficiou o acúmulo de biomassa seca (Tabela 1). Observa-se que o maior ganho é obtido no sistema radicular da plântula.

Segundo Saldanha et al (2012) plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas em frascos com membranas porosas apresentaram maior acúmulo de matéria seca de parte aérea e raízes, indicando a importância das trocas gasosas na morfogênese *in vitro*. Resultados semelhantes foram também encontrados em plântulas de *Acacia mangium* cultivadas sob condições de crescimento enriquecido com CO₂, o que mostrou um desempenho quatro vezes maior de plântulas micropropagadas sob condições convencionais (KOZAI; KUBOTA, 2001).

Tabela 1. Parâmetros de acúmulo de biomassa seca em plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* em sistema sem membrana porosa (SC), sistema de ventilação natural com 1 membrana porosa (SV1), 2 membranas (SV2) e 4 membranas (SV4), após 45 dias.

Tipos de sistemas de cultivo	BSC	BSF	BSR	BST
	(mg planta ⁻¹)	(mg planta ⁻¹)	(mg planta ⁻¹)	(mg planta ⁻¹)
SC	7,49 ^b	18,54 ^d	3,77 ^c	29,80 ^c
SV1	9,26 ^b	26,74 ^c	7,07 ^b	43,07 ^b
SV2	11,89 ^a	32,08 ^b	8,23 ^b	52,20 ^b
SV4	12,41 ^a	38,44 ^a	10,24 ^a	61,09 ^a
CV (%)	28,95	21,34	47,00	25,68

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), CV (%) coeficiente de variação dado em porcentagem. BSC biomassa seca de caule, BSF biomassa seca de folha, BSR biomassa seca de raiz, BST biomassa seca total.

Quando foi analisado a influência da sacarose no cultivo *in vitro* de *L. rotundifolia* Cham, os tratamentos de 15 e 30 g L⁻¹ obtiveram maiores valores nos tratamentos nos parâmetros de CPA, BSC, BSF, BSR e BST (Tabela 2). A BSC nos tratamentos de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose (11,63 e 12,21 mg planta⁻¹) apresentou valores que foram quase o dobro dos obtidos em 0 g L⁻¹ (6,82 mg planta⁻¹). Na BSR, o tratamento de 15 g L⁻¹ de sacarose foi de 7,73 mg planta⁻¹ que foi mais que o dobro do tratamento de 0 g L⁻¹ (3,34 mg planta⁻¹) e o tratamento de 30 g L⁻¹ foi mais que o triplo (10,73 mg planta⁻¹). Quanto a BST, os tratamentos de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose (51,92 e 55,80 mg planta⁻¹) foram quase o dobro em relação ao tratamento com 0 g L⁻¹ (30,66 mg planta⁻¹).

Tabela 2. Parâmetros biométricos plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30g L⁻¹) após 45dias.

Concentrações de sacarose (g.L ⁻¹)	CPA (cm)	BSC (mg planta ⁻¹)	BSF (mgplanta ⁻¹)	BSR (mg planta ⁻¹)	BST (mg planta ⁻¹)
0	5,19 ^b	6,82 ^b	21,09 ^b	3,34 ^c	30,66 ^b
15	6,83 ^a	11,63 ^a	31,44 ^a	7,73 ^b	51,92 ^a
30	5,44 ^a	12,21 ^a	34,03 ^a	10,73 ^a	55,80 ^a
CV (%)	13,75	25,54	27,21	38,51	26,71

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), CV (%) coeficiente de variação dado em porcentagem. CPA comprimento de parte aérea, NF número de folhas, BSC biomassa seca de caule, BSF biomassa seca de folha, BSR biomassa seca de raiz, BST biomassa seca total.

A utilização de sacarose no meio de cultivo como uma fonte de carbono é geralmente bem suportada (em condições fotomixotrópicas e heterotróficas) para a micropropagação das plantas, especialmente nos estádios de iniciação e proliferação da cultura primária (CHA-UM *et al.*, 2011; CUI *et al.*, 2010; PAWLICKI; WELANDER, 1995). Segundo Pruski *et al.* (2002) a sacarose pode otimizar características de crescimento vegetativo. Um maior desenvolvimento do sistema radicular em meio suplementado com sacarose (20-45 g L⁻¹) também foi encontrado em *Simmondsiachinensis* (Link) Schneider (MILLS; YANQING; BENZONI, 2009) e porta-enxertos de maçã (YASEEN *et al.*, 2009).

Nicoloso *et al.* (2003), comparando fontes de carbono, observou que a sacarose na concentração de 30 g L⁻¹ foi a melhor fonte de carboidratos para a altura de parte aérea, número de brotações, número total de segmentos nodais por planta em *Pfaffia glomerata*. Em *Mellissa officinalis* L. as variáveis de comprimento de parte aérea também obtiveram maiores médias quando crescidas em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Neste estudo foi realizado a análise de crescimento para avaliar o efeito das modificações ambientais de cultivo com a utilização de ventilação natural nas tampas.

Através da análise de parâmetros de crescimento pode-se inferir a contribuição de diferentes processos fisiológicos do comportamento da planta (BENINCASA, 2004). Nos parâmetros de área foliar (AFT) e massa foliar específica (MFE), foi encontrada interação entre o uso de membranas porosa e as concentrações de sacarose no meio (Tabela 3).

Para área foliar total (AFT), os tratamentos com 4 membranas porosas sem suplementação de sacarose e com 15 g L⁻¹ obtiveram maiores áreas foliares totais (AFT) (Tabela 3). Este aumento no AFT pode ter sido causado pela maior entrada de CO₂ e conseqüentemente maior capacidade fotossintética. Observa-se que o meio suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 4 membranas porosas inibiram a AFT. Quando se utilizou 1 e 2 membranas porosas, a concentração de sacarose de 30 g L⁻¹ não afetaram AFT. Segundo Souza et al (2014) quanto maior a área foliar maior a taxa fotossintética das plantas.

Observa-se que o sistema de membrana e concentrações de sacarose no meio afetaram a MFE (Tabela 3). De um modo geral a utilização de 2 e 4 membranas porosas beneficiou o aumento MFE. Tendo em vista que MFE é um parâmetro para estimar espessura foliar, o alto valor de MFE pode indicar menor exportação de biomassa para outras partes da planta (SILVA *et al.*, 2007). Com base nisso pode-se dizer que o espessamento da folha é um mecanismo de minimizar a perda de água pelos tecidos e melhora na aclimatização das plântulas.

Tabela 3. Análise de variância da interação entre o sistema de ventilação natural com membranas porosas (SC – sem membrana porosa, SV1, 2 e 4 – sistema de ventilação com 1, 2 e 4 membranas porosas) e a concentração de sacarose nos parâmetros de área foliar total (AFT) e massa foliar total (MFE) de plântulas de *L rotundifolia* cultivadas *in vitro* após 45 dias.

Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	Sistema de ventilação Natural			
	SC	SV1	SV2	SV4
0	8,59 ^{Dc}	14,45 ^{Ca}	17,37 ^{Ba}	22,50 ^{Aa}
15	16,13 ^{Ba}	15,79 ^{Ba}	15,37 ^{Ba}	20,37 ^{Aa}
30	13,28 ^{Bb}	15,64 ^{Aa}	17,20 ^{Aa}	13,34 ^{Bb}

CV (%) = 16,38

	<i>MFE (mg cm⁻²)</i>			
	SC	SV1	SV2	SV4
0	1,24 ^{Ab}	1,25 ^{Ab}	1,45 ^{Ab}	1,44 ^{Ac}
15	1,31 ^{Bb}	1,75 ^{Ba}	2,29 ^{Aa}	2,21 ^{Ab}
30	1,92 ^{Ba}	2,07 ^{Ba}	2,24 ^{Ba}	3,12 ^{Aa}

CV (%) = 30,26

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

CV (%) coeficiente de variação dado em percentagem.

Nos parâmetros de crescimento de razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e razão de peso foliar (RPF) não houve interação entre o sistema de ventilação natural e as concentrações de sacarose no meio. O número de membranas influenciaram isoladamente apenas na razão de área foliar (RAF) e a área foliar específica (AFE) (Tabela 4), enquanto que as concentrações de sacarose influenciaram a razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e a razão de peso foliar (RPF) (Tabela 5).

A RAF expressa a área útil da planta para a fotossíntese. É a razão da área foliar responsável pela captação da energia luminosa e CO₂ e a biomassa seca total da planta (BENINCASA, 2004). Neste trabalho, a energia luminosa foi igual entre todos tratamentos, variando o número de membranas porosas para assim variar a concentração de CO₂ do frasco. Verifica-se que no sistema sem membranas e 1 membrana porosa, ou seja, baixa concentração de CO₂, a RAF foi superior a dos tratamentos com 2 e 4 membranas porosas (Tabela 4). Isto ocorre pois a biomassa seca total encontrada nestes tratamentos com menos concentração de CO₂ foi menor do que a biomassa seca total nos tratamentos com maior concentração de CO₂. Quanto maior a concentração de CO₂ disponível, maior seria a taxa fotossintética e maior a produção de biomassa.

A área foliar específica (AFE) expressa a razão entre a área foliar e a biomassa seca da folha. Segundo Benincasa et al (2004) é considerada um importante fator do ponto de vista fisiológico por descrever a alocação da biomassa da folha por unidade de área. O sistema sem membranas porosas que apresentou maior AFE (0,718 cm⁻² mg⁻¹) (Tabela 4). Com base nos parâmetros de AFE e MFE, podemos inferir que as plantas do sistema com 2 e 4 membranas, utilizam do mecanismo de diminuir a área foliar e

umentar a espessura de folha a fim de evitar a perda de água, em ambiente com alta taxa evapotranspiratória.

Tabela 4. Plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* sob o sistema de cultivo convencional sem membrana porosa (SC), e o sistema de ventilação com 1, 2 e 4 membranas porosas (SV1, SV2 e SV4), após 45 dias.

Sistemas de ventilação natural	RAF (cm² mg⁻¹)	AFE (cm² mg⁻¹)
SC	0,450 ^a	0,718 ^a
SV1	0,400 ^a	0,622 ^b
SV2	0,342 ^b	0,538 ^c
SV4	0,327 ^b	0,497 ^c
<i>CV (%)</i>	<i>31,82</i>	<i>27,64</i>

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), CV (%) coeficiente de variação dado em porcentagem. RAF razão área foliar, AFE área foliar específica.

Apenas as concentrações de sacarose influenciaram RPF, a concentração de 0 g L⁻¹ de sacarose apresentou maiores valores de RPF (Tabela 5). O aumento da RPF no tratamento que não se utilizou sacarose indica que quanto aumento da concentração de sacarose no meio, menos material foi transloucado das folhas para outras partes da planta.

A RPF é um importante parâmetro quando se quer estudar o desempenho de uma planta, é um parâmetro fisiológico que expressa à fração de massa seca não exportada das folhas para o resto da planta (BENINCASA, 2004). Em uma planta jovem que é constituída na maior parte de folhas, os valores da RPF são elevados e decrescem com o tempo, pois a planta se desenvolverá, novos órgãos surgirão e crescerão a partir do material translocado das folhas. É um índice de análise de crescimento importante para plantas cujo interesse econômico está nas folhas (COSTA; CHAGAS, 2014; PEIXOTO; CRUZ; PEIXOTO, 2011)

Tabela 5. Plântulas de *L. rotundifolia* Cham. cultivadas *in vitro* após 45 dias sob diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30g L⁻¹).

Concentração de sacarose (gL⁻¹)	RAF (cm² mg⁻¹)	AFE (cm² mg⁻¹)	RPF
0	0,280 ^c	0,762 ^a	0,672 ^a
15	0,345 ^b	0,561 ^b	0,614 ^b
30	0,511 ^a	0,454 ^c	0,617 ^b
<i>CV (%)</i>	<i>22,29</i>	<i>22,23</i>	<i>5,88</i>

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), CV (%) coeficiente de variação dado em porcentagem. RAF razão área foliar, AFE área foliar específica, RPF razão de peso foliar.

O teor de clorofila das plantas desempenha um papel importante na absorção de luz durante a fotossíntese (ZHANG, M. *et al.*, 2009). Quando avalia-se o conteúdo de pigmentos fotossintéticos das plântulas, apenas o conteúdo de clorofila a (Chl a) não teve interação entre o sistema de cultivo e as concentrações de sacarose (Tabela 6). Os parâmetros de conteúdo de clorofila b (Chl b), total (Chl total), carotenoides e razão clorofila a:b (Chl a:b) apresentaram interação entre seus tratamentos (Tabela 7).

O conteúdo de clorofila a obteve maiores valores (1,228 g kg⁻¹MF) nos sistemas de ventilação com 2 e 4 membranas porosas (Tabela 6), enquanto que as concentrações de sacarose foram a 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose no meio foram mais eficientes (1,21 g kg⁻¹MF). Pode-se inferir que quanto maior a concentração de CO₂ disponível no frasco e suplementação de sacarose gera um aumento nas trocas gasosas. Um aumento das trocas gasosas pode causar incremento na biossíntese de pigmentos nas folhas das plantas cultivadas *in vitro* (IVANOVA; VAN STADEN, 2010; MOHAMED; ALSADON, 2010; SALDANHA *et al.*, 2012)

Tabela 6. Conteúdo de clorofila a (Chl A) de plântulas de *deL rotundifolia* cultivadas *in vitro* sob diferentes sistemas de ventilação natural com membranas porosas (SC, SV1, SV2 e SV4) e diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30g L⁻¹), após 45 dias.

<i>Chl A</i> (g kg ⁻¹ MF)	
Sistemas de Ventilação Natural	
SC	0,087 ^b
SV1	0,834 ^b
SV2	1,228 ^a
SV4	1,228 ^a
<i>CV (%) = 30,85</i>	
Concentrações de sacarose (g L⁻¹)	
0	0,654 ^b
15	1,21 ^a
30	1,21 ^a
<i>CV (%) = 25,99</i>	

Médias com mesma letra dentro da mesma coluna não diferenciaram entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), CV (%) coeficiente de variação dado em porcentagem. SC sistema sem membranas porosas, SV1, SV2 e SV4 sistema de ventilação natural com 1, 2 e 4 membranas porosas.

Para o conteúdo de clorofila b observa-se que houve interação no sistema de ventilação natural e as concentrações de sacarose. Os maiores valores de clorofila b foram obtidos no sistema SV2 com sacarose de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose, e o sistema SV4 com sacarose de 15 g L⁻¹ de sacarose no meio (Tabela 7). Resultados similares foram também encontrados em tomate onde frascos com ventilação natural com concentrações de sacarose de 10 e 20 g L⁻¹ apresentaram maior conteúdo de clorofila b. (MOHAMED; ALSADON, 2010)

O conteúdo de clorofila total apresentou perfil similar a clorofila b (Tabela 7). O sistema de 2 membranas porosas suplementada com 15 e 30 g L⁻¹, e o sistema de 4

membrana suplementado com 15 g L⁻¹ exibiram maiores valores. Pode-se observar que a suplementação de 15 g L⁻¹ é a mais eficiente no que diz respeito ao maior acúmulo de clorofila total. Quanto ao uso de membranas porosas, o mais indicado seria o sistema de 2 membranas porosas a fim de se estimular as trocas gasosas sem aumentar muito a taxa de evapotranspiração.

Avaliando o parâmetro de razão clorofila a:b, todos os valores foram muito próximos de 3,0, isso segundo Lichtenthaler et al (2001), é considerado um valor normal para plantas C3. Os maiores conteúdos de carotenoides foram no sistema de 4 membranas porosas e concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose (0,321 gkg⁻¹MF). Este alto valor no conteúdo de carotenoides é um mecanismo de evitar o estresse plântulas, que pode ter sido causado pela evaporação.

De um modo geral quando avaliou-se os pigmentos fotossintéticos, a ventilação natural com 2 e 4 membranas porosas obtiveram maiores valores. Estes valores corroboram com a maior biomassa seca de folhas das plântulas, demonstrando que o sistema de ventilação natural aumentou eficientemente as trocas gasosas das plântulas de *L. rotundifolia* cultivadas *in vitro*.

Tabela 7. Análise de variância da interação entre o sistema de ventilação natural com membranas porosas nos parâmetros de conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *L. rotundifolia* cultivadas *in vitro* após 45 dias.

Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)	Sistemas de Ventilação Natural			
	SC	SV1	SV2	SV4
0	0,209 ^A	0,153 ^{Ab}	0,248 ^{Ab}	0,248 ^{Ab}
15	0,306 ^{Ba}	0,313 ^{Ba}	0,522 ^{Aa}	0,513 ^{Aa}
30	0,290 ^{Ba}	0,352 ^{Ba}	0,489 ^{Aa}	0,358 ^{Bb}
<i>CV (%) = 34,13</i>				

<u><i>Chl Total (g kg⁻¹MF)</i></u>				
	SC	SV1	SV2	SV4
0	0,797 ^A	0,682 ^{Ab}	0,986 ^{Ab}	1,012 ^{Ab}
15	1,127 ^{Ba}	1,261 ^{Ba}	1,991 ^{Aa}	2,076 ^{Aa}
30	1,200 ^A	1,441 ^{Aa}	1,689 ^{Aa}	1,328 ^{Ab}
<i>CV (%) = 31,32</i>				
<u><i>Chl a:b</i></u>				
	SC	SV1	SV2	SV4
0	2,97 ^{Ac}	2,95 ^{Ab}	2,99 ^{Ab}	3,01 ^{Aa}
15	3,10 ^{Ab}	3,08 ^{Aa}	3,08 ^{Aa}	3,06 ^{Aa}
30	3,21 ^{Aa}	3,09 ^{Aa}	3,11 ^{Aa}	2,97 ^{Aa}
<i>CV (%) = 25,36</i>				
<u><i>Carotenóides(g kg⁻¹MF)</i></u>				
	SC	SV1	SV2	SV4
0	0,153 ^b	0,123 ^{Ab}	0,172 ^{Ab}	0,144 ^{Ac}
15	0,220 ^{Ba}	0,231 ^{Ba}	0,228 ^{Ba}	0,321 ^{Aa}
30	0,202 ^A	0,232 ^{Aa}	0,270 ^{Aa}	0,235 ^{Ab}
<i>CV (%) = 3,25</i>				

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. SC: Sistema sem membrana porosa. SVN: Sistema de ventilação natural com 1, 2 e 4 membranas porosas. Chl b conteúdo de clorofila b, Chl Total conteúdo de clorofila a+b, Chl a:b razão clorofila a/b.CV (%)coeficiente de variação dado em percentagem

Em relação à análise química de *headspace* CG/EM de *Lippia rotundifolia* Cham, cultivada *in vitro* submetida a diferentes sistemas de ventilação natural com membranas porosas (SC, SV1, SV2 e SV4) e diferentes concentrações de sacarose no meio (0, 15 e 30 g L⁻¹), foram identificados mais de 98% da composição química total (dados não mostrados). Os principais compostos voláteis foram o mirceno, o limoneno, a mircenona, o Z-ocimenone e opentadecano (Tabela 8).

A combinação entre os sistemas de ventilação natural e as diferentes concentrações de sacarose modificam os teores dos principais constituintes químicos da

fração volátil de *L. rotundifolia*. No sistema sem membranas, o maior teor de mircenona foi quando utilizado 30 g L⁻¹ de sacarose (17,23 %), demonstrando a necessidade de suplementação de sacarose no sistema com menos CO₂ disponível. O sistema de quatro membranas porosas foi eficiente independente do uso de sacarose apresentando alto teor de mircenona (0 g L⁻¹ 16,08%; 15 g L⁻¹ 16,69%; 30 g L⁻¹ 18,43%) (Figura 4). Quanto ao acúmulo de limoneno, o sistema sem membranas porosas apresentou teores crescentes com o aumento da sacarose no meio (Figura 4). No entanto, nos sistemas SV1 e SV4, houve queda nos teores de limoneno com o aumento da concentração da sacarose no meio.

Foi observada uma grande variação nos teores de mircenona, com uma diferença de 13,96 % entre o valor mínimo no sistema de uma membrana porosa sem sacarose (42,84 %) e o maior valor registrado no sistema sem membrana e sem sacarose (56,48 %). Dentre os maiores teores de mircenona o sistema com uma membrana e 30 g L⁻¹ de sacarose também foi um dos mais eficiente (56,23%). O sistema com quatro membranas independente da concentração de sacarose esteve dentre os mais baixos teores de mircenona (0 g L⁻¹ 45,21%; 15 g L⁻¹ 49,29%; 30 g L⁻¹ 47,14%).

As maiores porcentagens de Z-ocimenone foram no sistema com quatro membranas porosas na concentração de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose no meio (Figura 4).

Quanto ao teor de pentadecano, observou-se que em todos os tipos de sistemas de ventilação com o aumento da concentração de sacarose no meio houve uma diminuição do teor de pentadecano. Quando avaliou-se os tratamentos com 30 g L⁻¹ de sacarose no meio, os sistemas de ventilação com membranas porosas não interferiram no teor de pentadecano, sendo encontrados nestes os menores teores (Figura 4).

Com base em todos os resultados obtidos neste trabalho percebe-se que através da utilização de membranas porosas há um aumento das trocas gasosas, principalmente visualizado devido ao aumento nos dados biométricos, análise de crescimento e conteúdo de pigmentos. De modo geral, os sistemas de ventilação natural indicaram apresentar um papel menos importante que a concentração de sacarose para o acúmulo dos compostos voláteis de *L. rotundifolia* Cham. *in vitro*.

A sacarose é uma importante fonte de carbono e energia, e sua concentração inicial pode afetar parâmetros como o crescimento e o rendimento de metabólitos secundários (CUI *et al.*, 2010). Foi relatado em estudos, o uso de concentrações de sacarose acima de 20-30 g L⁻¹ no meio de cultivo para estimular a produção de

saponina e polissacáridos de ginseng em culturas em suspensão de *Panax notoginseng* (ZHANG, Y.; ZHONG; YU, 1996).

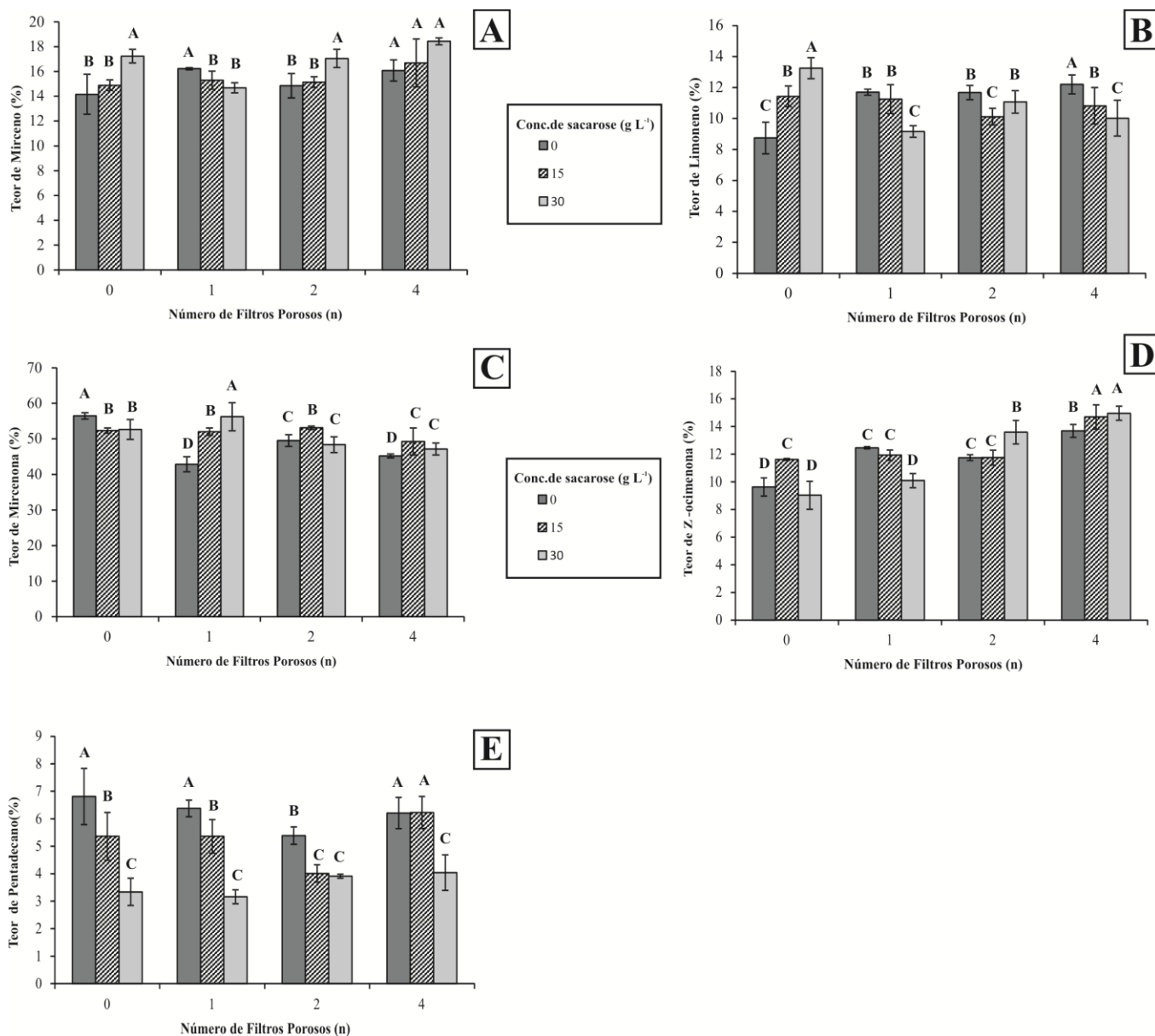


Figura 4. Análise de teores dos compostos voláteis majoritários Mirceno (A), Limoneno (B), Mircenona (C), Z-ocimeno (D) e Pentadecano (E) de plântulas de *L. rotundifolia* cultivada *in vitro* sob diferentes sistemas de ventilação natural com ou sem uso de membranas porosas (SC, SV1, SV2 e SV4) e diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹), após 45 dias. IR^a Índice de retenção linear na série de alcanos (C₉-C₁₈), coluna HP-5MS na ordem de eluição. Médias com mesma letra dentro da mesma linha pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). SC: Sistema convencional. SVN: Sistema de ventilação natural com 1, 2 e 4 membranas porosas. OS 0g.L⁻¹ sacarose, 15S 15g.L⁻¹ sacarose, 30S 30g.L⁻¹ sacarose.

CONCLUSÕES

O uso do sistema de ventilação natural utilizando membranas porosas manufaturadas mostrou-se um método de cultivo *in vitro* mais eficiente em relação ao sistema sem membranas porosas. O sistema de ventilação com duas e quatro membranas porosas (SV2 e SV4) e com a concentração de sacarose de 15 g L⁻¹ se mostraram os mais eficiente, visto que neste sistema de ventilação, percebemos um aumento na taxa fotossintética e menor perda de água por evaporação. De modo geral, os sistemas de ventilação natural indicaram apresentar um papel menos importante que a concentração de sacarose para o acúmulo do compostos voláteis de *L. rotundifolia* Cham. *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo e produtividade.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALVAREZ, C. *et al.* Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, n. 1, p. 93–101, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-012-0133-x>>.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in beta vulgaris. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1949.

BASSOLE, I. H. N. *et al.* Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 209–212, 2003.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2004.

CHA-UM, S. *et al.* Promoting root induction and growth of *in vitro* macadamia

(*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 106, n. 3, p. 435, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-011-9940-8>>.

CHANDRA, S. *et al.* Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199–1205, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>>.

COSTA, A. G.; CHAGAS, J. H. Níveis de sombreamento e tipos de malha no crescimento e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 194–199, 2014.

CUI, X.-H. *et al.* Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 103, n. 1, p. 7–14, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9747-z>>.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961–965, 2005. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012033527#.WBzdDEb-GHg.mendeley>>. Acesso em: 4 nov. 2016.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistemas de Análises de Variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos.** . Lavras: UFLA. , 2011

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

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, v. 60, n. 2, p. 143–150, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10725-009-9430-8>>.

KOZAI, T. Photoautotrophic Micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, n. 4, p. 188–204, 2010.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants. **Journal of Plant Research**, v. 114, n. 4, p. 525–537, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/PL00014020>>.

LEITÃO, S. G. *et al.* Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1388–1393, 2008.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement And Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. F4.3.1-F4.3.8, 2001.

MAJADA, J. P. *et al.* Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured *in vitro*. **In Vitro Cellular {&} Developmental Biology - Plant**, v. 38, n. 3, p. 272–278, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1079/IVP2001271>>.

MAKUNGA, N. P.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. Improved *in vitro* rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 1, p. 77–86, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-006-9100-8>>.

MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZIONI, A. Effect of substrate, medium composition, irradiance and ventilation on jojoba plantlets at the rooting stage of micropropagation. **Scientia Horticulturae**, v. 121, n. 1, p. 113–118, 2009.

MOHAMED, M. A.-H.; ALSADON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n. 3, p. 295–300, 2010.

MORAIS, T. P. *et al.* Applications of tissue culture in medicinal plants. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000100016&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets in vitro under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, v. 103, n. 1, p. 51–63, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. **Physiol. Plant**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T. Growth of *In vitro* banana (*Musa* SPP.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **In Vitro Cellular {&} Developmental Biology - Plant**, v. 37, n. 6, p. 824, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11627-001-0137-4>>.

NIST: National Institute of Standards and Technology— Chemistry Web Book. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

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

PASCUAL, M. E. *et al.* *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201–214, 2001.

PAWLICKI, N.; WELANDER, M. Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. **Plant Science**, v. 106, n. 2, p. 167–176, 1995.

PEIXOTO, C. P.; CRUZ, T. V. DA; PEIXOTO, M. DE F. DA S. P. Análise quantitativa do crescimento de plantas: Conceitos e Prática. **Enciclopedia Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 51–76, 2011.

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

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci%7B_%7Darttext%7B%7Dpid=S0100-84042007000200006%7B%7Dlang=pt>.

- PRUSKI, K. *et al.* Photoautotrophic micropropagation of Russet Burbank Potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, n. 2, p. 197–200, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1015293725983>>.
- RESENDE, C. F. DE *et al.* In vitro propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian campos rupestres. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 46, n. 3, p. 582–589, 2015.
- RIBEIRO, M. V. *et al.* Concentrações de Sacarose e Tipos de Vedação no Cultivo in vitro de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl. 2, p. 843–845, 2007.
- ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 2, p. 91–120, 2000.
- SALDANHA, C. W. *et al.* A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, n. 3, p. 413–422, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-012-0162-5>>.
- SALIMENA, F. R. G.; SILVA, T. R. S. Flora de Grão-mogol, Minas Gerais: VERBENACEAE. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 27, n. 1, p. 119–120, 2009.
- SANTOS, M. R. A DOS; INNECCO, R.; SOARES, A. A. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. 2, p. 377–383, 2004.
- SILVA, B. M. D. S. *et al.* Efeito da luz no crescimento de mudas de *Hymenaea parvifolia* Huber. **Revista Árvore**, v. 31, n. 6, p. 1019–1026, 2007.
- SOUZA, G. S. DE *et al.* Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de plantas de alecrim cultivadas sob telas coloridas. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3 SUPPL. 1, p. 232–239, 2014.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, n. 3, p. 463–471, 1963.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 105, n. 2, p. 149–158, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9>>.
- YASEEN, M. *et al.* *In vitro* shoot proliferation competence of apple rootstocks M. 9 and M. 26 on different carbon sources. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 4, p. 1781–1795, 2009.
- ZHANG, M. *et al.* Growth and photosynthetic capability of momordica grosvenori plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **HortScience**, v. 44, n. 3, p. 757–763, 2009.
- ZHANG, Y.; ZHONG, J.; YU, J. Enhancement of ginseng saponin production in

suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. **Journal of Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 49–56, 1996.