



CECÍLIA RAMOS DE OLIVEIRA

**CULTIVO *in vitro* DE *Campomanesia rufa* [O. BERG] NIED. E
EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL EM FOLHAS:
ABORDAGEM FITOQUÍMICA, FISIOLÓGICA,
ANATÔMICA, BIOQUÍMICA E ANTIBACTERIANA**

LAVRAS – MG

2021

CECÍLIA RAMOS DE OLIVEIRA

**CULTIVO *in vitro* DE *Campomanesia rufa* [O. BERG] NIED. E EXTRAÇÃO DE
ÓLEO ESSENCIAL EM FOLHAS: ABORDAGEM FITOQUÍMICA, FISIOLÓGICA,
ANATÔMICA, BIOQUÍMICA E ANTIBACTERIANA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Moacir Pasqual

Coorientador

Dr. Filipe Almendagna Rodrigues

LAVRAS – MG

2021

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

Oliveira, Cecília Ramos de.

Cultivo *in vitro* de *Campomanesia rufa* [O. Berg]

Nied.extração de óleo essencial em folhas: Abordagem fitoquímica,
fisiológica, anatômica, bioquímica e antibacteriana / Cecília Ramos
de Oliveira. - 2021.

123 p. : il.

Orientador(a): Moacir Pasqual.

Coorientador(a): Filipe Almendagna Rodrigues.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Cultivo in vitro. 2. Óleo Essencial. 3. Campomanesia. I.
Pasqual, Moacir. II. Rodrigues, Filipe Almendagna. III. Título.

CECÍLIA RAMOS DE OLIVEIRA

Cultivo *in vitro* de *Campomanesia rufa* [O.Berg] Nied. e extração de óleo essencial em folhas: abordagem fitoquímica, fisiológica, anatômica, bioquímica e antibacteriana.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Botânica Aplicada, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 09 de abril de 2021.

Dr. Moacir Pasqual	UFLA
Dr. Filipe Almendagna Rodrigues	UFLA
Dra. Joyce Dória Rodrigues	UFLA
Dra. Marinês Ferreira Pires Lira	UFLA
Dr. Erivelton Resende	EPAMIG

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

Dr. Filipe Almendagna Rodrigues
Coorientador

LAVRAS – MG

2021

A Deus e a Maria Santíssima.

Ofereço.

Aos meus pais, meu irmão, minha filha e minha sobrinha.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente pelo dom da vida e pela oportunidade de chegar até aqui e a Virgem Maria por abrir essa porta em minha vida.

Aos meus pais José Timóteo de Oliveira e Luzia da Silva Ramos de Oliveira, pelo amor, carinho incondicional, apoio em todos os aspectos da minha vida. Amo muito vocês, obrigada por serem meu amparo, meu refúgio e minha fortaleza e minhas duas riquezas.

Sarah minha filha, agradeço a você por tornar meus dias felizes e me ensinar tanto todos os dias. Você é o presente mais lindo que Deus me proporcionou.

Ao meu irmão Ricardo Ramos de Oliveira, pela sua amizade, seu amor, seus conselhos e seu apoio em vários momentos dessa caminhada e da minha vida. Meu irmão, sempre serei grata a você por tudo.

Ao pai da minha filha, por tudo que você representa para mim e para nossa filha Sarah. Muito obrigada por tudo.

Ao apoio, carinho e amor de Dolor e Maria Felícia, sem vocês essa caminhada seria praticamente impossível.

Ao professor Moacir Pasqual, pela oportunidade, orientação, paciência e conhecimentos adquiridos.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, pelos conselhos, oportunidade, paciência, amizade e conhecimentos adquiridos.

À professora Maria das Graças Cardoso, pelo carinho, oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho em seu laboratório e conhecer sua equipe maravilhosa e pelos conhecimentos adquiridos.

Ao professor Luís Roberto Batista, pela oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho em seu laboratório e pelas dicas na melhoria do meu trabalho.

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto pela colaboração nas medidas espectrais do meu trabalho.

Aos técnicos de laboratório Vantuil, Claret, Sulamara, Lamartine e Marina muito obrigada pelas ajudas, amizade, enfim por tudo.

Ao Arthur, aluno de IC, pelo companheirismo e valiosas contribuições nas atividades laboratoriais. Meu amigo, muito obrigada de coração por tudo!

Aos meus amigos Dr. Filipe, Dr. Adalvan, Dra. Natasha, Dra. Rafaela, Dr. Flávio e Dr. Vinícius pelas valiosas contribuições ao meu trabalho, pela paciência e ajuda.

A todos os profissionais do setor de eletricidade da UFLA, por todos esses anos serem tão bons e pacientes comigo, e por me permitirem fazer a coleta do material próximo ao setor.

Aos meus amigos João e Priscila por tudo, pela amizade e boas conversas.

Ao pessoal do Laboratório de Química Orgânica e Óleos Essenciais, pela colaboração, ajuda e amizade.

Ao pessoal do laboratório de Micotoxina e Micologia de Alimentos, pela colaboração, ajuda e amizade.

Ao Ítalo e toda equipe do Laboratório de Anatomia do Setor de Botânica, muito obrigada por sempre serem tão prestativos, amigos e por me ajudarem inúmeras vezes.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e a todos que fazem parte dessa equipe maravilhosa.

Aos meus queridos amigos do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, pelas conversas, por tirarem minhas dúvidas, por tudo, muito obrigada.

As minhas amigas em especial Márcia, Elisângela e Jéssica e aos meus familiares que de alguma forma contribuíram para que tudo desse certo seja com palavras amigas, com apoio e carinho. E a todos os meus amigos de caminhada da UFLA e de Lavras, pelo apoio, amizade e carinho.

À disponibilidade da banca examinadora e pelas contribuições na melhoria deste trabalho.

Enfim, agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos.

MUITO OBRIGADA!

“Tempo para tudo...

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu...

Há tempo de nascer, e tempo de morrer;

tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

tempo de matar, e tempo de curar;

tempo de derrubar, e tempo de edificar;

tempo de chorar, e tempo de rir;

tempo de prantear, e tempo de saltar de alegria;

tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras;

tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

tempo de buscar, e tempo de perder;

tempo de guardar, e tempo de deixar fora;

tempo de rasgar, e tempo de coser;

tempo de estar calado, e tempo de falar;

tempo de amar, e tempo de aborrecer;

tempo de guerra, e tempo de paz.”

(Eclesiastes 3, 1-8)

*“Meus pés podem me levar a uma infinidade de caminhos,
mas só percorro os que não me afastem de Deus.”*

Mirna Rosa

RESUMO

Campomanesia rufa [O.Berg.] Nied. é uma espécie lenhosa e frutífera conhecida popularmente como gabioba. Estudos sobre a fitoquímica e o cultivo *in vitro* sobre a espécie são incipientes. O objetivo deste trabalho, num primeiro momento, foi caracterizar o óleo essencial (OEs) das folhas e averiguar seu potencial antibacteriano, além de analisar a presença de cavidades secretoras (CS) com compostos voláteis. Posteriormente, objetivou-se analisar os aspectos biométricos, bioquímicos e anatômicos da espécie no cultivo *in vitro* sob distintos espectros de luz e reguladores de crescimento de plantas. A extração do OEs das folhas de *Campomanesia rufa* (*C.rufa*) foi realizada pela técnica de hidrodestilação, através do uso do aparelho de Clevenger modificado. Os testes histoquímicos e anatômicos foram realizados nas folhas para análises estruturais das células da epiderme, tecidos parenquimáticos, feixe vascular e cavidades secretoras, além da fitoquímica para análise de lipídeos e terpenos. Para os testes de atividade antibacteriana, foi realizada a técnica da concentração mínima inibitória do OEs sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No cultivo *in vitro*, as plantas foram submetidas a sete espectros luminosos, sendo eles fornecidos por diodos emissores de luz e lâmpada fluorescente. Posteriormente, realizou-se a anatomia das folhas e análise dos pigmentos fotossintéticos. Em outra etapa, uma dose fixa de benzilaminopurina (BAP) foi aplicada ao meio de cultura e após a inoculação dos explantes, estes foram mantidos na ausência de luz e na presença do LED roxo ou lâmpada fluorescente. Outro experimento realizado foi com poliamina, em que foram aplicadas diferentes concentrações da espermina ao meio de cultura. Realizou-se também multiplicação *in vitro* dos explantes através da combinação de dois tipos de citocininas, além da indução de raízes com uso de diferentes concentrações de AIB. Os compostos majoritários encontrados no OEs foram (2E, 6E)-farnesal (41,64%), (2E, 6Z)-farnesal (27,74%), (2E, 6Z)-farnesol (3,54%). Encontraram-se compostos voláteis nas CS. O crescimento bacteriano foi inibido na diluição de $7,10 \mu\text{L mL}^{-1}$ de O.E. A qualidade de luz influenciou nas análises biométricas, bioquímicas e anatômicas. Na presença do BAP e no LED roxo houve maiores valores biométricos. A combinação de duas citocininas, 2 mg L^{-1} de 2-ip e 1 mg L^{-1} de BAP proporcionou um elevado número de brotos aos 40 dias (5,80). No enraizamento, 37,5% das plantas enraizaram na concentração de 4 mg L^{-1} de AIB. Logo, conclui-se que as folhas de *C. rufa* possuem óleo essencial com atividade antibacteriana. O LED roxo é eficiente na indução de brotos de *C. rufa in vitro*, assim como o BAP combinado ao 2-ip. A espermina promove o desenvolvimento das plantas *in vitro*. O AIB induz a rizogênese.

Palavras-chave: Compostos voláteis. *Escherichia coli*. Gabioba. Micropropagação. Microrganismos. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Campomanesia rufa [O.Berg.] Nied (*C. rufa*). is a woody and fruitful species popularly known as gabiroba. Studies on phytochemistry and *in vitro* culture on these species are incipient. The aim of this work at first was to characterize the essential oils (EsO) of the leaves and to verify its antibacterial potential, besides analyzing the presence of secretory cavities (SC) with volatile compounds. Subsequently, the objective was to analyze the biometric, biochemical, and anatomical aspects of the species *in vitro* cultivation under different light spectra and plant growth regulators. The extraction of EsO from the leaves of *C.rufa* was performed using the hydrodistillation technique, using a modified Clevenger apparatus. Histochemical and anatomical tests were performed on the leaves for structural analysis of the epidermis cells, parenchymal tissues, vascular bundle, and secretory cavities, in addition to phytochemistry for the analysis of lipids and terpenes. For the tests of antibacterial activity, the technique of minimum inhibitory concentration of EsO on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was performed. In *in vitro* cultivation, the plants were subjected to seven light spectra, which were provided by light emitting diodes and fluorescent lamps. Subsequently, the anatomy of the leaves and analysis of photosynthetic pigments were performed. In another step, a fixed dose of benzylaminopurine (BAP) was applied to the culture medium and after inoculation of the explants, they were kept in the absence of light and in the presence of purple LED or fluorescent lamp. Another experiment carried out was with polyamine, in which different concentrations of spermine were applied to the culture medium. *In vitro* multiplication of explants was also carried out through the combination of two types of cytokinins, in addition to the induction of roots using different concentrations of IBA. The major compounds found in the EsO were (2E, 6E)-farnesal (41.64%), (2E,6Z)-farnesal (27.74%), (2E, 6Z)-farnesol (3.54%). Volatile compounds were found in SC. Bacterial growth was inhibited by diluting 7.10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of EsO. Light quality influenced biometric, biochemical, and anatomical analyses. In the presence of BAP and purple LED observed higher biometric values. The combination of two cytokinins, 2 mg L⁻¹ of 2-ip and 1 mg L⁻¹ of BAP provided a high number of shoots at 40 days (5.80). At rooting, 37.5% of the plants rooted at a concentration of 4 mg L⁻¹ of IBA. Therefore, it is concluded that the leaves of *C. rufa* have essential oil with antibacterial activity. Purple LED is efficient in inducing *C. rufa* sprouts *in vitro*, as well as BAP combined with 2-ip. Spermine promotes the development of plants *in vitro*. AIB induces rhizogenesis.

Keywords: Volatile compounds. *Escherichia coli*. Gabiroba. Micropropagation. Microorganisms. *Staphylococcus aureus*.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	2
1 INTRODUÇÃO	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Família Myrtaceae e o gênero <i>Campomanesia</i>	3
2.2 Anatomia e histoquímica vegetal	4
2.3 Óleos essenciais	5
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	5
2.5 Cultivo <i>in vitro</i>	6
2.6 Luz e regulador de crescimento no cultivo <i>in vitro</i>	6
REFERÊNCIAS	9
SEGUNDA PARTE	15
ARTIGO 1 – MORFOANATOMIA FOLIAR, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Campomanesia rufa</i> (O. BERG) NIED	17
ARTIGO 2 – EFEITO DA QUALIDADE DE LUZ SOBRE MICROESTACAS DE <i>Campomanesia rufa</i> (O.BERG) NIED. CULTIVADAS <i>in vitro</i>, ANÁLISE BIOMÉTRICA, ANATÔMICA, BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA	52
ARTIGO 3 – MULTIPLICAÇÃO E RIZOGÊNESE <i>in vitro</i> DE <i>Campomanesia rufa</i> (O. BERG) NIED	94

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira é mundialmente reconhecida por abrigar um patrimônio genético biodiverso (AMORIM, SILVA & BARBEDO, 2020). Espécies endêmicas frutíferas compõem a fitofisionomia de vários domínios fitogeográficos brasileiros, e a família Myrtaceae Juss. é responsável por abrigar algumas delas em seu táxon, sendo representada por 1.026 spp. distribuídas em 23 gêneros (TRINDADE; ROSARIO; SANTOS, 2018).

A família Myrtaceae é formada por espécies relevantes para a produção de madeira, reflorestamento, polpas de frutas, além de outras utilidades que a torna economicamente importante. As espécies do gênero *Eucalyptus* L' Hér., por exemplo, são responsáveis pela produção de madeira (GARCIA et al., 2014), enquanto muitas espécies brasileiras são encarregadas de produzir frutos com polpas avantajadas e com sabor adocicado, tornando o Brasil o 3º país no mundo com maior produção de frutas (SVIECH; UBBINK; PRATA, 2021). A produção de óleos essenciais de várias espécies da família também tem sido atrativa para indústrias cosméticas e farmacêuticas devido a sua eficácia medicinal, e o Brasil é o 3º exportador de óleos essenciais no mundo (MENDES et al., 2016).

O gênero *Campomanesia* Ruiz et Pav., pertencente à família Myrtaceae, é composto por árvores ou arbustos que produzem frutos com diversos sabores e ricos em vitamina C, além disso, muitas espécies estão sumindo por atividades antrópicas e por extrativismo não consciente e descontrolado (ABREU et al., 2020; REFLORA, 2020). Neste gênero, encontra-se a *Campomanesia rufa* (O. Berg.) Nied. (*C. rufa*), uma espécie presente no estado de Minas Gerais, que pouco se conhece sobre suas características fitoquímicas, produção de óleos essenciais e anatomia. Porém, sabe-se que é uma espécie que produz seus frutos anualmente, sendo palatáveis e consumidos *in natura* ou para produção de iguarias (ABREU et al., 2020; SANT'ANA et al., 2018).

O cultivo *in vitro* contribui para a manutenção do genoma de espécies como a *C. rufa*, através da micropropagação, pois as mudas de plantas provenientes deste sistema de cultivo podem posteriormente serem inseridas na natureza ou até em banco de germoplasma. Além disso, torna possível a exploração de produtos naturais de maneira sustentável (MATSUMOTO, CARDOSO & SANTOS, 2010).

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram analisar a morfologia e anatomia das folhas de *C. rufa* tanto nas condições *ex vitro* quanto *in vitro*, sendo que nesta última sob

distintos espectros de qualidade de luz e reguladores de crescimento, além de extrair, caracterizar e aplicar o óleo essencial de suas folhas em dois tipos de microrganismos. Buscou-se também induzir a multiplicação e a rizogênese de explantes de *C. rufa*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Myrtaceae e o gênero *Campomanesia*

Myrtaceae é uma família dominante na flora brasileira (Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2018), e abrange, entre outros, os gêneros *Eucalyptus*, *Myrcia*, *Eugenia* e *Campomanesia*. São vegetais que armazenam seus compostos secundários em pontuações translúcidas, cavidades secretoras, glândulas de sal, nectários, células de mucilagem, gomas e tricomas secretores (FAHN, 1988; GOGOSZ *et al.*, 2010). Essas estruturas secretoras, presentes tanto em órgãos reprodutivos quanto vegetativos, são consideradas características marcantes na família (DONATTO & MORRETES, 2007), tornando-a interessante economicamente. Além disso, muitas dessas espécies são frutíferas de sabor palatável, possuindo minerais, vitaminas e outras moléculas importantes para a nutrição humana (ABREU *et al.*, 2020).

O gênero *Campomanesia* abrange as plantas conhecidas, popularmente, como guabiroba, gabirola, guavira, casaqueira dentre outros nomes populares (SANT'ANA *et al.*, 2018). Estas plantas podem ter hábitos botânicos desde arbustivos a arbóreos (MORAIS & LOMBARDI, 2006). Seus frutos são globosos do tipo baga, carnudos e suculentos, podendo ser consumidos *in natura* ou processados nas indústrias alimentícias. De acordo com Duarte *et al.* (2020), os fins farmacológicos deste gênero podem ser obtidos a partir de qualquer órgão da planta, tanto vegetativos quanto reprodutivos, entretanto, ressaltam que as folhas são ricas em óleos essenciais e que podem apresentar compostos como geraniol, α -pineno, limoneno, linalol, espatulenol, cariofileno e myrtenal.

As folhas das espécies deste gênero são simples e com filotaxia oposta e as flores são brancas (BÜNGER *et al.*, 2012; KRUPEK & LIMA, 2012). As épocas de frutificação das espécies variam de setembro a novembro, e em algumas espécies o período pode ser em abril, a floração pode iniciar em agosto e se prolongar até novembro (YAMANA; COSTA; ALBUQUERQUE, 2007).

A *Campomanesia rufa* (*C. rufa*) é uma espécie arbórea perene que pode medir até 5 m de comprimento, a densidade da madeira é 0,93 g/cm³ de acordo com *Encyclopedia of Life* (2018). As cascas dos frutos apresentam coloração verde para verde amarelado, além disso,

esse órgão é densamente cinéreo-velutinos até mesmo na maturação. As flores são brancas e possuem odor adocicado (ABREU *et al.*, 2020).

Na base de dados da *International Union for Conservation of Nature* – IUCN (2021), *C. rufa* é classificada como deficiente de dados. Os estudos sobre a espécie são incipientes e não há menção sobre a fitoquímica de suas folhas, seja na produção de óleo essencial ou extratos. Por outro lado, Abreu *et al.* (2020) realizaram, dentre outras análises, a triagem de conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos frutos.

2.2 Anatomia e histoquímica vegetal

A anatomia de órgãos vegetativos (principalmente das folhas) e reprodutivos são ferramentas que podem contribuir para maior entendimento da taxonomia (Câmara, Vilarinho e Araújo, 2020), além da sistemática e filogenia. Como exemplo as medidas do comprimento estomático e tamanho do feixe vascular possuem alto valor taxônico em níveis interespecíficos em táxons de *Tripleurospermum* (INCEER & OZCAN, 2021).

Segundo Figueiredo *et al.* (2007), a histoquímica, parte da anatomia vegetal, possibilita localizar *in situ* os grupos químicos que ocorrem nos tecidos vegetais. De acordo com esses autores, o método histoquímico é composto por duas etapas, pré-tratamento e visualização dos compostos que se pretende detectar nos tecidos. O pré-tratamento consistiu-se na etapa de fixar o material e a etapa de visualizar as substâncias que se pretendem detectar consiste na aplicação de corantes biológicos que podem ser substâncias incolores (cromogênicas) ou coradas, além de inorgânicas ou orgânicas.

Informações botânicas, histoquímicas e fitoquímicas contribuem também na conservação através da conscientização da população, quer seja pela relevância ambiental ou pelo potencial agroeconômico. Além disso, contribui para bases de dados com mais informações sobre a espécie contribuindo na identificação e, ainda, torna possível o desenvolvimento de novos produtos farmacognóstico de qualidade para as indústrias, de forma sustentável (SIMÕES *et al.*, 2007).

2.3 Óleos essenciais

Assim como a histoquímica, a fitoquímica das plantas silvestres e endêmicas do cerrado, denominadas medicinais ou aromáticas, como a *C. rufa*, vem sendo abordada de forma significativa nos últimos anos, seja pela produção de extratos vegetais ou óleos essenciais (SALES, 2015).

Os óleos essenciais (OEs), também conhecidos como óleos voláteis, são misturas complexas de compostos que geralmente encontram-se no estado líquido na temperatura ambiente. A tonalidade dos óleos pode variar de incolor a amarelado e de odor aromático, com fácil absorção na pele. Possuem baixa densidade, com exceção de alguns óleos essenciais, como os de canela e alho, que apresentam elevado índice de refração e são solúveis em solventes orgânicos (PREEDY, 2015; SALES, 2015). Além disso, os OEs podem ser extraídos de qualquer parte das plantas por distintos métodos físico-químicos, como destilação, prensagem de frutos e pericarpos, e, na maioria das vezes, via arraste a vapor (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

As propriedades biológicas, tais como ações antitumoral, larvicida, fungicida e bactericida, além da atividade antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e analgésica, configuram em alguns dos potenciais dos OEs (MACHADO & JUNIOR FERNANDES, 2011).

Desta forma, as indústrias cosméticas, farmacêuticas e de alimentos visando complementar ou desenvolver produtos à base da fitoquímica de plantas medicinais e aromáticas, buscam cada vez mais aplicar os OEs em suas formulações (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

2.4 *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Causadora de infecção hospitalar, *Staphylococcus aureus* é uma bactéria *gram-positiva* com aproximadamente 0,8 µm de diâmetro. De acordo com Guo *et al.* (2020), é um microrganismo aeróbio ou anaeróbio que a 37° C tem a temperatura ideal para o crescimento de suas colônias. Essa bactéria, segundo esses autores, possui cepas resistentes a penicilina e meticilina. De acordo com a ANVISA (2021), esse patógeno humano ainda pode ter resistência intermediária ou total aos glicopeptídeos, que são alternativas no tratamento contra essas bactérias.

A *Escherichia coli* (*E. coli*), conhecido micro-organismo que vive comensalmente no intestino humano, e que pode ser patogênica ao homem, como a cepa *E.coli* 0157, é uma bactéria *gram-negativa* (PENNINGTON, 2010). De acordo com Oliveira *et al.* (2014), nos últimos anos, essas bactérias denominadas também de uropatógenos têm cada vez mais se tornado resistentes a antibióticos, apresentando 46,9% a sulfametoxazoltrimetoprim, 46,7% a cefalotina, 27,6% ao ácido nalidíxico e 22,3% a nitrofurantoína.

Desta forma, o uso de óleo essencial vegetal pode ser uma alternativa com menor custo e menos tóxicas para o tratamento destes tipos de infecção.

2.5 Cultivo *in vitro*

Além da coleta *ex situ* para a obtenção de matéria vegetal para análises de compostos bioativos e outros estudos, uma alternativa para obtenção de material vegetal é através do cultivo *in vitro*. Neste tipo de cultivo é possível obter mudas de plantas com procedência fitossanitária, maior quantidade de biomassa em menor espaço de tempo (SCHIEHL; FRANÇA; BIASI, 2020).

O cultivo *in vitro* de plantas é uma técnica que permite a reprodução de uma determinada espécie de forma assexuada. Seu método baseia-se na totipotencialidade das células para obter um novo indivíduo, sendo possível através de protocolos de micropropagação de acordo com Esposito-Polesi (2020). Ainda de acordo com a autora, através da micropropagação é possível multiplicar plantas de difícil propagação, realizar limpeza clonal e ainda fazer conservação e intercâmbio de germoplasma, além de outras possibilidades.

Através dos protocolos de micropropagação já disponíveis na literatura é possível ajustar alguns fatores abióticos importantes do cultivo *in vitro* de uma espécie para a outra, otimizando o tempo e a propagação de uma determinada espécie. Deste modo, os fatores abióticos passíveis de alterações que podem ser ajustados para suprir as exigências de uma determinada espécie são: intensidade e qualidade da luz, fotoperíodo, temperatura, meios de cultura (tanto quanto a consistência, composição ou potencial hidrogeniônico) e reguladores de crescimento (QUISEN; ANGELO, 2008).

2.6 Luz e regulador de crescimento no cultivo *in vitro*

A luz é indiscutivelmente essencial para a fotossíntese de todas as plantas *in vitro* e *ex vitro*, principalmente na etapa fotoquímica, em que a planta capta a energia luminosa através do complexo antena para oxidar a água, produzir oxigênio e fixar o dióxido de carbono e produzir posteriormente os compostos orgânicos (MARTINS, 2011).

De acordo com o dicionário Miniaurélio Século XXI (2001, p.434), “luz é a radiação eletromagnética, capaz de provocar sensação visual num observador normal.” A radiação eletromagnética perceptível ao olho humano como descreve o dicionário, é denominada como o espectro da região visível, que compreende os comprimentos de onda de 400 (violeta)-700 nm (vermelho) (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Para otimizar protocolos de micropropagação, umas das maneiras de se obter o espectro de luz desejável é através dos diodos emissores de luz (LED's). Atualmente, o uso dessas fontes de luz está cada vez mais frequente no cultivo *in vitro* como alternativa às utilizadas

tradicionalmente (CRUZ, et al., 2021; ROCHA; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2013). Os LED's têm auxiliado no aumento dos teores dos pigmentos fotossintéticos, número e comprimento de brotações no cultivo *in vitro*, além de alterar estruturalmente o tecido foliar e sua expansão, assim como sua plasticidade fisiológica (BRAGA et al., 2009; ROCHA et al., 2010; SKIN et al., 2008). Isso é possível, pois as plantas, através dos sinalizadores que respondem à qualidade de luz, podem promover padrões de crescimento específicos exibindo morfologia e fisiologia específicas e limitadas pelas variações dos espectros de luz (BRAGA et al., 2009).

Além dos diferentes comprimentos de ondas fornecidos pelos LED's, que podem ser utilizados nos protocolos de micropropagação como fonte alternativa de luz (ROCHA; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2013), também é usual a aplicação de outros métodos para aprimorá-los. Dentre esses métodos, visando à melhoria do cultivo das plantas nessas condições *in vitro*, estão os denominados reguladores de crescimento vegetal (RCV).

Os hormônios vegetais ou fitormônios são substâncias orgânicas de origem natural. Por outro lado, os RCV são substâncias sinalizadoras sintetizadas exogenamente e podem ser utilizados de forma direta nas plantas, aumentando a resiliência aos estresses bióticos e abióticos. Através deles as plantas também podem melhorar a tolerância a seca e a temperatura, além de contribuir para a eficiência do uso da água e do nitrogênio (BONS & KAUR, 2019; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2020; SMALL & DEGENHARDT, 2018). Os RCV modificam o metabolismo das proteínas, elevam a taxa de enzimas responsáveis pela germinação de sementes, além disso, estão ligados a processos fisiológicos de suma importância tais como: enraizamento, multiplicação, floração e senescência de plantas (CASTRO & VIEIRA, 2001; MCDONALD & KHAN, 1983).

Os RCV utilizados em cultura de tecidos, visando a micropropagação e o cultivo *in vitro*, compreendem auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, brassinosteroides, jasmonatos e poliaminas (SMALL & DEGENHARDT, 2018).

As citocininas são os principais RC responsáveis por induzir a divisão e crescimento celular em plantas cultivadas *in vitro*, desencadeando a formação e alongamento dos brotos, além de estar relacionada à expansão de folhas (SILVA et al., 2020; TAIZ et al., 2017). As principais citocininas utilizadas no cultivo *in vitro* são: 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN), isopenteniladenina (2-ip), N6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina ou zeatina (ZEA), 6-benziladenina (BA), 6-benzilamino)-9-2-tetradropiranyl-9H-purina (PBA) e 1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)ureia (Tidiazuron), dentre outras (MELO, 2002).

As auxinas pertencem ao grupo de RCV responsáveis pelo enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*, sendo os ácidos indolbutírico (AIB) e naftaleno-acético (ANA) sintéticos que agem analogamente ao ácido indolacético (AIA) promovendo a formação desse órgão (Souza & Pereira, 2007). Além disso, as auxinas sintéticas também são responsáveis pela calogênese e embriogênese somática *in vitro*, ou seja, pela desdiferenciação de células provenientes de tecidos já diferenciados e com determinação celular e posterior multiplicação. As auxinas sintéticas tais como ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) e ácido 3,6-dicloroanísico (dicamba) são usuais nestas etapas de calogênese e embriogênese em algumas mirtáceas (TITON et al., 2007).

As poliaminas são definidas como policátions orgânicos de baixa massa molecular que atuam principalmente sobre a permeabilidade das membranas celulares, na divisão celular, diferenciação, expressão gênica e síntese de DNA, tamponamento do pH das células além de estar relacionada a síntese de macromoléculas. Os principais tipos de poliamina são a putrescina, espermidina, espermina e cadaverina. Algumas das aplicações das poliaminas no cultivo *in vitro* são: regeneração vegetal, florescimento, indução de brotações e calos, dentre outras (MELO, 2002; TIBURCIO & ALCÁZAR, 2017).

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A. F. *et al.* Antioxidant activity and physico-chemical analysis of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. Fruits. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 44, e016720, 2020.
- AMORIM, J. S.; AMORIM, J. S.; CERQUEIRA-SILVA, B. M.; ROMAGNOLO, M. B. Fenologia das espécies *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) no bosque municipal de Paranavaí, Paraná. **Revista Eletrônica de Biologia**, Perdizes, v. 3, n. 1, p. 84-98, 2010.
- AMORIM, I. P.; SILVA, J. P. N.; BARBEDO, C. J. s sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae) e seus novos conceitos sobre propagação. **Hoehnea**, São Paulo, v. 47, e292020, 2020.
- ANVISA. **Resistência Microbiana – Mecanismos e impacto clínico: II Gram-positivos – resistência aos antimicrobianos: 1 - *Staphylococcus aureus***. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm> Acesso em: 17 maio 2021.
- ARAÚJO, E. F. L.; SOUZA, E. R. B. Fenologia e reprodução de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Scientific Electronic Archives**, Rondonópolis, v. 11, n. 2, p. 166-175, 2018.
- ARRIGONI, M. F.; CARVALHO, D. A.; ALVARENGA, A. A. Efeito de fitopromotores de crescimento e luminosidade sobre a germinação de sementes de casaqueira (*Campomanesia rufa* (Berg) Nied). **Ciência e Prática**, Bebedouro, v. 19, n. 2, p. 149-152, 1995.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. *et al.* Armazenamento e viabilidade de sementes de *Campomanesia rufa*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 21, n. 1, p. 85-90, 1997.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. *et al.* Comportamento fenológico da casaqueira (*Campomanesia rufa* (Berg.) Nied.) durante o período de 1991-1992. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 3, p. 352-356, 1996.
- BERNADES, C. O. *et al.* Transferability of *Psidium microsatellite* loci in Myrteae (Myrtaceae): a phylogenetic signal. **Euphytica**, Wageningen, v. 214, n. 105, p. 1-11, 2018.
- BIZZO, H.R.; HOVELL A.M.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BONS, H. K.; KAUR, E. M. Role of plant growth regulators in improving fruit set, quality and yield of fruit crops: a review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Warszawa v. 95, p. 1-10, 2019.
- BRAGA, F.T. *et al.* Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, 2009.

BÜNGER, M. O.; SCALON, V. R.; SOBRAL, M.; STEHMANN, J.R. Myrtaceae no Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 4, p. 857-881, 2012.

CÂMARA, A. R. M.; VILARINHO, M. P.; ARAUJO, J. S. Anatomia foliar como subsídeo para a taxonomia do gênero *Camarea* St.-Hill. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 9, n.10, e1739108525, 2020.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. 132 p.

CRUZ, J.G. *et al.* Qualidade de luz na multiplicação e enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 10, n. 2, e485100212790, 2021.

CUNHA, A.L. *et al.* Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, Santana do Ipanema, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

DUARTE, L.S. *et al.* *Campomanesia* genus – a literature review of nonvolatile secondary metabolites, phytochemistry, popular use, biological activities, and toxicology. **Eclética Química Journal**, Araraquara, v.45, n.2, 2020.

ENCYCLOPEDIA OF LIFE. *Campomanesia rufa* (Berg) Niedenzu. EOL v.3. 2018. <https://eol.org/pages/5455709>. Acesso em: 14 maio 2021.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo *in vitro* de plantas. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 71, e00562018, 2020.

FERREIRA, A.B.H. **Miniaurélio Século XXI Escolar: O minidicionário da língua portuguesa**.4. ed. rev. e amp. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001.

FIGUEIREDO, A.C.S.; BARROSO, J.M.G.; PEDRO, L.M.G; ASCENSÃO, L. Histoquímica e citokuímica em plantas: Princípios e Protocolos. 1ª ed. 68 p. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal.

GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GARCIA, R. A. *et al.* Colorimetria de madeiras dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* e sua correlação com a densidade. **CERNE**, Lavras, v. 20, n. 4, p. 509-517, 2014.

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

GOGOSZ, A. M. *et al.* Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 613-623. 2010.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, P. C. Polonização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

GUO, Y. *et al.* Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Louisville, v. 10 p. 1-11, 2020.

INCEER, H.; OZCAN, M. Taxonomic evaluations on the anatomical characters of leaf and achene in Turkish *Tripleurospermum* with its relative *Matricaria* (Asteraceae). **Flora**, Freiberg, v. 275, 151759, 2021.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **Red List**, versão 2020-3, Gland, 2021. Disponível em: < <https://www.iucnredlist.org/species/35334/9927548>>. Acesso em: 17/03/2021.

ISAH, T. *et al.* Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dijon, v. 132, n. 2, p. 239-265, 2018.

KRUPEK, R.A.; LIMA, A.G. Variação na estrutura foliar de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) sob diferentes condições de luminosidade em um remanescente de Floresta Ombrófila Mista. **Ambiência**, Guarapuava, v. 8, n. 2, p. 293–305, 2012.

LANDRUM, L. R. The development of the fruits and seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae). **Brittonia**, New York, v. 34, n. 2, p. 220-224, 1982.

LIMA, D. F.; GOLDENBERG, R.; SOBRAL, M. O gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 62, n. 3, p. 683-693, 2011.

McDONALD, M. D.; KHAN, A. A. Acid scarification and protein synthesis during seed germination. **Agronomy Journal**, Madison, v. 2, n. 75, p. 111-114, 1983.

MACHADO, B. F.M.T.; JUNIOR FERNANDES, A. Óleos essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, Tubarão, v.3, n.2, p.105-127, 2011.

MARTINS, N. F. Uma síntese sobre aspectos da fotossíntese. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, São Cristóvão, v. 11, n. 2, p. 10-14, 2011.

MATSUMOTO, K.; CARDOSO, L.D.; SANTOS, I.R.I. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: Conservação in vitro**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.2010. 11p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Documentos, 318).

McDONALD, M. D.; KHAN, A. A. Acid scarification and protein synthesis during seed germination. **Agronomy Journal**, Madison, v. 2, n. 75, p. 111-114, 1983.

- MELO, N. F. Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal. *In: Seminário Coda de Nutrição Vegetal*, 1., 2002, Petrolina. **Anais [...]**. Petrolina: Coda, 2002. p. 37-54.
- MENDES, L.A. *et al.* Óleos essenciais em Myrtaceae. *In: FERREIRA, A. et al. Tópicos especiais em produção vegetal VI*. Alegre, 2016, 553p.
- MORAIS, P. O.; LOMBARDI, J. A. A família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 7, n. 1, p. 3-32, 2006.
- OLIVEIRA, A.L.D. *et al.* Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos na infecção urinária. **Revista Uningá Review**, v. 20, n.3, p. 65-71, 2014.
- OLIVEIRA, M. C.; SANTANA, D. G.; SANTOS, C. M.; Biometria de frutos e sementes e emergência de plântulas de duas espécies de frutíferas do gênero *Campomanesia*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p.446-455, 2011.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Palmas v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- PENNINGTON, H. *Escherichia coli* 0157. **Lancet**, v. 376, n.9750, p. 1428–1435, 2010.
- PREEDY, V.R. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Academic Press, San Diego, USA, 2015. 930 p.
- QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 2008. 44 p. (Embrapa Amazônia Ocidental – Documentos, 61).
- ROCHA, P. S. G. *et al.* Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1922-1928, 2010.
- ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Uso de LEDs na multiplicação e enraizamento *in vitro* de framboeseiras. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 19, n. 1/2, p. 98-105, 2013.
- ROCKENBACH, A.P. *et al.* Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 59-70, 2018.
- SALES, H.J.S.P. *Lavandula L.* - aplicação da cultura *in vitro* à produção de óleos essenciais e seu potencial econômico em Portugal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, supl. II, p.992-999, 2015.
- SANT'ANA, C. R. O. *et al.* Propagação *in vitro* de *Campomanesia rufa*: Uma espécie frutífera em extinção. **Ciênc. Agrotec.**, v.42, n.4, p.372-380, 2018.

SCHIEHL, M.; FRANÇA, T. O.; BIASI, L. A. Adequação de protocolo para cultivo *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* sp) 'Xingu'. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 8, n. 2, p. 79-87, 2020.

SILVA, C. P. *et al.* Reguladores vegetais no crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro*. In: ZUFFO, A. M.; AGUILERA, J. G. **Agricultura 4.0** Nova Xavantina, 2020, 114 p.

SILVA, T. T. A. *et al.* Qualidade fisiológica de sementes de milho na presença de bioestimulantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 840-844, June 2008.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. revisada e ampliada. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2007. 1102p.

SKIN, H. S. *et al.* The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plant. Acta. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 30, p. 339-343, 2008.

SMALL, C. C.; DEGENHARDT, D. Plant growth regulators for enhancing revegetation success in reclamation: A review. **Ecological Engineering**, Praha, v. 118, p. 43-51, 2018.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

STADNIK, A.; OLIVEIRA, M. I. U.; ROQUE, N. Levantamento florístico de Myrtaceae no município de Jacobina, Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 87-97, 2016.

STEFANELLO M. É. A.; PASCOAL A.C.R.F.; SALVADOR M.J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v.8, p. 73-94, 2011.

SVIECH, F.; UBBINK, J.; PRATA, A.S. Analysis of the effect of sugars and organic acids on the ice melting behavior of pitanga and araza pulp by differential scanning calorimetry (DSC). **Thermochimica Acta**, Alabama, v. 700, e- 178934, 2021

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TIBURCIO, A. F.; ALCÁZAR, R. Potential Applications of Polyamines in Agriculture and Plant Biotechnology. **Polyamines**, v. 1694, p. 489-508, 2017.

TITON, M. *et al.* Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 417-426, 2007.

TRINDADE, J. R.; ROSARIO, A. S.; SANTOS, J. U. M.. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Myrtaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 3, p. 1259-1277, 2018.

VALLILO, M. L.; BUSTILLO, O. S.; AGUIAR, O. T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg – Myrtaceae. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, 18, p. 15-22, 2006.

VALLILO, M. I. *et al.* Características físicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 241-244, 2005.

VASCONCELOS, T. N. C. *et al.* Myrteae phylogeny, calibration, biogeography and diversification patterns: Increased understanding in the most species rich tribe of Myrtaceae. **Molecular Phylogenetics Evolution**, Washington, v. 109, p. 113-137, 2017.

VERAS, B. O. *et al.* *Algrizea Minor* Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil. **Natural Product Research**, Bethesda p. 1-5, 2019.

YAMANA, M.Y.; COSTA, R.B.; ALBUQUERQUE, L.B. Avaliação genética do vigor juvenil em progênies de guavira (*Campomanesia cambessedea* Berg.) nativas de Mato Grosso do Sul. **Multitemas**, Campo Grande, n. 35, p. 331-337, 2007

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 – MORFOANATOMIA FOLIAR, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Campomanesia rufa* (O. BERG) NIED.

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Scientia Horticulturae* (ISSN:0304-4238) – versão preliminar

Cecília Ramos de Oliveira ^a, Evaristo Mauro de Castro ^a, Moacir Pasqual ^b, Rafaela Magalhães Brandão ^c, Vinícius Politi Duarte ^a, Nathasha de Azevedo Lira ^a, Filipe Almendagna Rodrigues ^b, Arthur de Paula Metzker ^b, David Lee Nelson ^d; Maria das Graças Cardoso ^c

^a Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Brasil.

^b Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Brasil.

^c Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Brasil.

^d Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal do Jequitinhonha e Vale do Mucuri, Diamantina, MG, Brasil.

Highlights

- Morfologia e anatomia foliar de *Campomanesia rufa*
- Testes histoquímicos para terpenos e lipídeos
- Compostos majoritários: (2E, 6E)-farnesal, (2E,6Z)-farnesal, (2E, 6Z)-farnesol

RESUMO

O gênero *Campomanesia* abriga cerca de 35 espécies catalogadas com a presença de plantas lenhosas, frutíferas e com hábito de crescimento variando de arbustivo até arbóreo. Algumas plantas pertencentes a esse gênero são conhecidas pelas suas propriedades medicinais e por possuírem componentes bioativos com potencial biológico. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar a morfologia, anatomia e histoquímica dos tecidos foliares, e a composição química do óleo essencial extraído a partir desses tecidos, e avaliar seu potencial antibacteriano. A descrição morfológica foi possível através de observações a olho nu e a diafanização das folhas. Por outro lado, a anatomia e caracterização das folhas de *C. rufa* foram realizadas com o auxílio de microscopia de luz e de varredura. A anatomia para fins de caracterização do mesofilo e cutícula foi realizada em segmentos foliares corados com Azul de Astra e Safranina e os testes histoquímicos foram feitos através do reagente de Nadi para terpenos e de Sudam IV para lipídeos. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e caracterizado quimicamente por CG/MS e GC/FID. A atividade antibacteriana foi determinada pela Concentração Mínima Inibitória. As folhas de *C. rufa* possuem limbo simples e inteiro, venação do tipo broquidródomas, são hipostomáticas e a filotaxia é oposta-cruzada. O mesofilo é heterogêneo e dorsiventral e possui cavidades secretoras próximas a epiderme abaxial. Essas estruturas também foram observadas na nervura central. As secções transversais coradas com reagente de Nadi demonstraram presença de terpenos nas células da epiderme na face adaxial e do parênquima paliçádico e nas células epiteliais das cavidades secretoras. As folhas coradas com Sudam IV apresentaram lipídeos nas cavidades secretoras. O rendimento de óleo essencial de *C. rufa* foi de 0,3% e o teor de umidade de 42,43%. Os componentes majoritários do óleo essencial foram (2E,6E)-farnesal, (2E,6Z)-farnesal, (2E, 6Z)-farnesol. O óleo essencial encontrado nas folhas de *Campomanesia rufa* é armazenado em células distintas desde o

mesofilo até a nervura central e os compostos majoritários são os isômeros do farnesal e farnesol. Além disso, o óleo essencial das folhas de *C. rufa* inibiu o crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli.*) até a diluição de 7,10 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Portanto, conclui-se que as folhas de *C. rufa* possui bordo inteiro, filotaxia oposta-cruzada e são elípticas. A anatomia evidenciou presença de cutícula em ambas as faces, as células da epiderme são unisseriadas, a densidade estomática é de 521 estômatos/ mm^2 na face abaxial, o parênquima paliçádico é unisseriado enquanto o esponjoso possui mais de uma camada celular. A histoquímica evidenciou a presença de terpenos e lipídeos. O óleo essencial das folhas de *C. rufa* possui atividade antibacteriana.

Palavras-chave:

Concentração Mínima Inibitória

Escherichia coli

Farnesal

Gabirola

Óleos Voláteis

Staphylococcus aureus

ABSTRACT

The genus *Campomanesia* comprises approximately 35 cataloged species including woody and fruiting plants with growth habits ranging from shrubby to arboreal. Some plants belonging to this genus are known for their medicinal properties and for having bioactive components with biological potential. Thus, the objective of this study was to describe the morphology, anatomy and histochemistry of leaf tissues, characterize the chemical composition of the essential oil extracted from these tissues and evaluate their antibacterial potential. The morphological description was possible through naked-eye observations and leaf clearing. The conventional anatomical study and characterization of *Campomanesia rufa* leaves was performed with the aid of optical and scanning electron microscopy. The anatomical study for the characterization of the mesophyll and cuticle was performed in leaf segments stained with Astra Blue and Safranin, and histochemical tests were performed using the Nadi reagent for terpenes and Sudan IV for lipids. The essential oil was extracted by hydrodistillation and chemically characterized by GC-MS and GC-FID. Antibacterial activity was determined by the minimum inhibitory concentration. *C. rufa* leaves have simple and entire limbs and brochidodromous venation and are hypostomatic, and cross-opposite-phyllotaxis. The mesophyll is heterogeneous and dorsiventral and has secretory cavities near the abaxial epidermis. These structures were also observed in the midrib. The cross-sections stained with Nadi reagent showed the presence of terpenes in the adaxial epidermis and palisade parenchyma cells and in the epithelial cells of secretory cavities (SC). The leaves stained with Sudan IV showed lipids in the SC. The yield of *C. rufa* essential oil was 0.3%, and the moisture content 42.43%. The major components of the essential oil were (2E,6E)-farnesal, (2E,6Z)-farnesal, and (2E,6Z)-farnesol. The essential oil found in the leaves of *C. rufa* is stored in distinct cells from the mesophyll to the midrib, and the major compounds are farnesal isomers and farnesol. In addition, the essential oil of *C.*

rufa leaves inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) at a minimum inhibitory concentration of $7.10 \mu\text{L mL}^{-1}$. Therefore, it is concluded that the leaves of *C. rufa* have an entire border, cross-opposite-phyllotaxis and are elliptical. The anatomy showed the presence of a cuticle on both sides, the cells of the epidermis are uniseriate, the stomatal density is 521 stomata/mm² on the abaxial surface, the palisade parenchyma is uniseriate while the spongy has more than one cell layer. Histochemistry showed the presence of terpenes and lipids. The essential oil of the leaves of *C. rufa* has antibacterial activity.

Keywords:

Escherichia coli

Farnesal

Gabiroba

Minimum inhibitory concentration

Staphylococcus aureus

Volatile oils

1. Introdução

Myrtaceae é uma família com elevada representatividade na flora brasileira, e abrangem os gêneros *Eucalyptus*, *Myrcia*, *Eugenia*, *Campomanesia*, dentre outros (MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014).

O gênero neotropical *Campomanesia* Ruiz & Pav. inclui as plantas conhecidas popularmente como guabiroba, gabioba, guavira, casaqueira e possui 38 espécies endêmicas no Cerrado Brasileiro (RIBEIRO et al., 2018; SANT'ANA et al., 2018). De acordo, com o REFLORA (2020) algumas sinonímias também descrevem esse gênero, tais como: *Abbevillea* O. Berg, *Acrandra* O. Berg, *Britoa* O. Berg, *Burcardia* Neck. ex Raf., *Laceraea* O. Berg e *Paivaea* O. Berg..

Estas plantas possuem hábitos botânicos desde arbustivos a arbóreos. Morfologicamente as folhas das espécies pertencentes a este gênero são simples com filotaxia oposta-cruzada, num estudo anatômico desses órgãos é possível observar a presença de cavidades secretoras (BÜNGER et al., 2012; KRUPPEK & LIMA, 2012; MORAIS; LOMBARDI, 2006; TIMÓTEO et al., 2019).

A presença de cavidades secretoras é uma característica anatômica importante para a uma melhor compreensão da produção de metabólitos secundários e marcante nas folhas de algumas espécies do gênero *Campomanesia*. As cavidades secretoras são caracterizadas pelos espaços celulares de formato circular denominados lúmens, delimitados por uma camada de células que produzem secreção de diferentes composições químicas - as células epiteliais (EVERT, 2006; FAHN, 1990). Além disso, as células das estruturas secretoras são responsáveis por sintetizar e secretar substâncias químicas como os terpenos (FRANCO & ALBIERO, 2018).

A prospecção fitoquímica ajuda a identificar os terpenos entre outras moléculas presentes no material biológico (BESSA et al., 2013). Algumas espécies de gabiobas já foram descritas, e é conhecida a sua prospecção fitoquímica, tanto para óleos essenciais quanto para

extratos vegetais. Contudo, a espécie *C. rufa* carece de ambas as análises. Os óleos essenciais (OEs), também conhecidos como óleos voláteis, são misturas complexas de compostos que geralmente encontram-se no estado líquido na temperatura ambiente. Além disso, as tonalidades dos OEs podem variar de incolor a amarelado e odor aromático, e com fácil absorção na pele (PREEDY, 2015; SALES, 2015).

Algumas das propriedades biológicas dos OEs são: ação antitumoral, larvicida, fungicida, bactericida, atividade antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e analgésica. Desta forma, os potenciais mencionados despertam interesse nas indústrias cosméticas e farmacêuticas visando complementar ou desenvolver produtos à base da fitoquímica (MACHADO & JUNIOR FERNANDES, 2011).

A espécie *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. (*C. rufa*) carece de informações acerca de sua prospecção fitoquímica, descrições morfológicas e anatômicas da planta *in vivo*, inclusive em banco de dados como a *red list* (IUCN 2019) dentre outros. A morfologia e anatomia da espécie além de agregarem informações que auxiliam em futuras identificações no campo da sistemática devido ao valor taxonômico agregado contribuem também nas pesquisas de prospecções fitoquímicas (FRANCO; ALBIERO, 2018; FÉLIX-SILVA, et al. 2012; OLIVEIRA et al., 2018).

Sendo assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar a morfologia, anatomia e histoquímica das folhas de *C. rufa*, o óleo essencial extraído a partir das folhas e avaliar a concentração mínima inibitória desse material em duas espécies de bactérias patogênicas, sendo uma espécie *gram*-positiva e outra *gram*-negativa.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *C. rufa* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil (21°13'35,60" S e 44°58'59,00" W) em altitude de 919 m, em dia sem precipitação durante o outono (maio de 2018).

A identificação da espécie foi realizada pelo Dr. Douglas Antonio de Carvalho do Departamento de Ecologia e Conservação da UFLA. O *voucher* foi depositado no herbário ESAL da UFLA sob o número de registro 29415.

Na plataforma SisGen, o trabalho foi registrado sob o código A4BA5B0, em conformidade com a legislação vigente da Biodiversidade Brasileira nº 13.123/2015.

2.2 Descrição Morfológica das folhas

Através de observação à vista desarmada sobre as folhas, características da morfologia foliar foram analisadas, entre elas: filotaxia, tamanho, consistência, contorno e superfície foliar (VIDAL & VIDAL, 2011). A análise quantitativa do tamanho do órgão foliar foi realizada com o auxílio de uma régua de 30 cm.

2.3 Caracterização foliar por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Discos foliares de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram retirados e fixados em solução de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído + 2,5 % de paraformaldeído, Sigma - Aldrich®, São Paulo, Brasil) (KARNOVSKY, 1965) até o momento da análise. Posteriormente, três lavagens foram feitas utilizando a solução tampão de cacodilato de sódio (0,05 M), e pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% durante 4 horas.

Em seguida, foi realizada a desidratação, a qual consistiu na submissão da amostra em ordem crescente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%). As amostras foram colocadas em gaiolas individuais com identificação. Posteriormente, o material foi transferido para o aparelho de ponto crítico em CO₂ (Bal -Tec CPD 030 Balzers, Liechtenstein) para completar a secagem e montagem dos *stubs* (os quais são estruturados de suporte de alumínio). Para finalizar esta etapa, as amostras foram coladas nos *stubs* utilizando fita dupla-face.

O banho de ouro foi realizado no Sputtering (Bal-Tec modelo SCD 050 Balzers, Liechtenstein). Após o banho de ouro, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo LeoEVO 40XVP (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e extraídas as eletromicrografias.

2.4 Diafanização do tecido foliar

Para análise do padrão de venação das folhas, realizou-se clarificação do tecido foliar através do uso de solução aquosa de hidróxido de sódio a 5%, diariamente realizou-se a troca desta solução até o material estar completamente clarificado. Em hipoclorito de sódio 50% o tecido foliar foi diafanizado, e corado em solução hidroalcoólica de safranina a 1% (FELIPPE & ALENCASTRO, 1966).

2.5 Análises anatômicas das folhas

O material vegetal utilizado foram folhas maduras e completamente expandidas localizadas no terceiro nó em relação ao ápice foliar. Os cortes foram realizados em micrótomo manual. Para as análises das secções transversais, o material a ser corado foi antes fixado em solução de F.A.A.70% (formaldeído (Sigma-Aldrich, Duque de Caxias, RJ, Brasil), ácido acético (Vetec®, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e etanol 70% (Êxodo Científica, Hortolândia, SP, Brasil) na proporção 0,5: 0,5: 9) por 48 h e então armazenadas em etanol 70% até análise

posterior (JOHANSEN, 1940). O material foi clarificado com hipoclorito de sódio a 50% (v/v) e lavado duas vezes com água destilada por 10 minutos.

As secções paradérmicas da face abaxial das folhas foram coradas com solução de 0,1% de safranina (m/v) (Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil). As secções transversais foram coradas pelo corante Safrablau (0,1% de safranina (m/v) (Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil) e 0,9% de Azul de Astra (m/v) (Merck[®], Darmstadt, Hessen, Alemanha)) (BUKATSH, 1972) e, posteriormente, montados em lâminas semipermanentes com glicerol 50% (v/v).

As fotomicrografias foram realizadas utilizando câmara acoplada ao microscópio trinocular (CX31, Olympus, Tokyo, Japan). A análise das imagens foi realizada usando o software ImageJ em uma lâmina e cinco campos por réplica. A média dos dados foi calculada para cada réplica.

2.6 Testes histoquímicos das folhas

Folhas maduras e completamente expandidas recém-coletadas e localizadas no terceiro nó em relação ao ápice caulinar foram utilizadas para os testes histoquímicos, os cortes foram feitos à mão livre com auxílio de lâmina de aço.

Para análise dos terpenos no tecido vegetal, as secções transversais foram colocadas em reagente NADI (α -naftol 0,1% (Sigma[®], Buchs, St. Gallen, Suíça) + cloridrato de dimetil-p-fenileno diamina 1% (Vetec[®], Duque de Caxias, RJ, Brasil) + tampão fosfato de sódio 0,05M (Fosfato de sódio bibásico heptahidratado (Casa da Química, Diadema, São Paulo)) + Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado (Sigma- Aldrich[®], São Paulo, SP, Brasil)) e mantidos por 1 h no escuro. Logo após, as secções foram lavadas imediatamente em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (Fosfato de sódio bibásico heptahidratado + Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado) em pH 7,2 por aproximadamente 2 min (DAVID; CARDE, 1964).

Para detecção de lipídios, secções transversais foram colocadas em solução recém-filtrada de SUDAN IV (Vetec®, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 15 min e lavadas rapidamente em etanol 70% (PEARSE, 1972). As lâminas foram montadas em glicerina e observadas imediatamente. As fotomicrografias foram realizadas utilizando câmara acoplada ao microscópio trinocular (CX31, Olympus, Tokyo, Japan).

2.7 Extração do óleo essencial

O óleo essencial de *C. rufa* (CRO) foi obtido pela técnica de hidrodestilação utilizando aparelho Clevenger modificado. A extração do óleo essencial foi realizada utilizando 200 g de folhas frescas, selecionadas quanto à maturação, ausência de herbívoros e de manchas no limbo. Posteriormente foram limpas e picadas e colocadas em balão de fundo redondo com capacidade para 5.000 mL, contendo 2.500 mL de água, por 2 horas (a temperatura do ponto de ebulição foi mantida) (BRASIL, 2010). Em seguida, o óleo essencial foi separado por centrifugação (Fanem Baby I Modelo 206 BL, São Paulo, Brasil) a 965,36 g por 10 min, o qual foi coletado com micropipeta de vidro de Pasteur, armazenado sob a proteção de luz e refrigerado (8°C) até a análise.

2.8 Teste de umidade e rendimento do óleo essencial

O teste de umidade foi realizado com 5 g de folhas frescas e 80 mL de cicloexano por 2 h em aparelho de Dean & Stark acoplado ao balão de vidro de fundo redondo de 250 mL (PIMENTEL et al., 2006). O cálculo do rendimento do óleo essencial foi feito com Base Livre de Umidade (%p/p BLU), conforme a seguinte equação: $\%R = (100 \times P_o) / [(P_a - (P_a \times P_{H_2O})) / (5)]$, em que, %R refere-se ao rendimento do óleo essencial (Base Livre de Umidade), P_o ao peso do óleo, P_a ao peso da amostra e P_{H_2O} ao peso da água.

2.9 Caracterização química do óleo essencial de *Campomanesia rufa*

A identificação dos constituintes do CRO foi realizada segundo Adams (2007) por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS - Shimadzu Corporation, modelo QP 2010 Plus, Kyoto, Japão), sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar SBLTM-5MS (30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 μm); He 5.0 (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil) como gás carreador; fluxo 1,18 mL min^{-1} ; temperatura do injetor: 220 $^{\circ}\text{C}$; temperatura do detector: 240 $^{\circ}\text{C}$; volume de injeção da amostra de 0,5 μL , diluído em hexano (1%) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA); taxa de partição do volume injetado 1:100; a temperatura foi programada, iniciando-se em 60 $^{\circ}\text{C}$, seguido de aumento de 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingir 240 $^{\circ}\text{C}$, depois a 10 $^{\circ}\text{C}$ até atingir 300 $^{\circ}\text{C}$, mantendo-se constante essa temperatura por 7 minutos. Os parâmetros operacionais do espectrômetro de massa foram os seguintes: potencial de ionização, 70 eV; temperatura da fonte de íons em 200 $^{\circ}\text{C}$, velocidade de varredura de 1.000 Da s^{-1} , intervalo de varredura de 0,50 fragmentos s^{-1} .

As análises de massa foram realizadas em modo de varredura total, variando de 45 a 500 Da. A coleta de dados adquirida e processada foi realizada por meio da LabSolutions LC / GC Workstation 2.72. A equação de Van den Dool e Kratz (1963) foi usada para o cálculo do índice de retenção ($\text{IR} = 100n + 100 [(tR(i) - tR(n)) / (tR(n+1) - tR(n))]$), em que $tR(i)$, $tR(n)$ e $tR(n+1)$ correspondem aos tempos de retenção dos compostos testados e padrões, respectivamente, relacionados à série homóloga de n-alcanos (nC8-nC18).

A identificação dos compostos foi baseada na comparação de seus índices de retenção com a literatura (Adams, 2007), uma comparação de seus espectros de massa com a biblioteca de espectros de massa FFNSC 1.2, NIST 107 e NIST 21. A análise quantitativa dos constituintes foi realizada usando cromatografia gasosa (Shimadzu GC – 2010, Kyoto, Japão) equipado com detector de ionização de chama (DIC). As condições experimentais foram as mesmas utilizadas

na identificação de compostos CRO, realizadas por CG/MS e as porcentagens de compostos foram calculadas pelo método de normalização da área.

2.10 Ensaio da atividade antimicrobiana

2.10.1 Concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial das folhas de *Campomanesia rufa* sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Os testes para obtenção dos valores das concentrações mínimas inibitórias (CMI's) do óleo essencial das folhas de *C. rufa* foram realizados em triplicata, sob dois tipos de bactérias, *Staphylococcus aureus* (ATCC13565) e *Escherichia coli* INCQS00181 (FIOCRUZ-RJ).

Para a ativação das bactérias utilizou-se 10 mL do caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia®, Mumbai, Índia) onde foram inoculadas. Após a inoculação, as bactérias foram incubadas por 24 h em estufa Biochemical Oxygen Demand (B.O.D) a 37°C (NCCLS, 2003 a, b). Posteriormente a ativação dos microrganismos, para realizar o controle de turbidez, foi feita a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) no comprimento de onda 625 nm obtendo-se 108 Unidades Formadoras de Colônia (UFC mL⁻¹).

Para o crescimento das culturas bacterianas, os fundos das placas de Petri foram recobertos com 40 mL do meio Miller Hinton (Kasvi®, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Após o resfriamento e solidificação, foram inoculados 100 µL do caldo com bactérias ativas, as quais foram espalhadas sob o meio de cultura com auxílio da alça de Drigalsky. Posteriormente, os discos de papel filtro (6mm) foram colocados sob o inóculo, onde se aplicou 10 µL do óleo essencial diluído em cada disco. As diluições do óleo essencial das folhas de *C. rufa* foram feitas em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) nas proporções 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 µL mL⁻¹. Em seguida, foram mantidas durante 24 h em B.O.D à 37°C. Para controle positivo, foram utilizados 10 µL Clorofenicol 1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e para controle negativo, 10 µL de DMSO.

3. Resultados e Discussão

3.1 Descrição morfológica e anatomia das folhas de *Campomanesia rufa*

As folhas de *C. rufa* possuem 11,3 cm de comprimento em média. A textura do limbo foliar varia conforme o nível de maturação, sendo semicoriáceas quando completamente expandidas. O padrão de venação das folhas é broquidródoma, bordo inteiro e filotaxia oposta-cruzada e pode ocorrer a morfologia elíptica nos distintos níveis de maturação foliar (Fig. 1). Bünger et al. (2012), descreve as folhas de *C. rufa* como simples, pecioladas, ápice acuminado, margem revoluta, discolores, ambas as faces velutinas não cerosa e a base aguda.

As folhas velutinas de *C. rufa* (Fig. 2) apresentaram maior densidade de tricomas tectores não ramificados de 22 tricomas/mm² na sua superfície adaxial. Por outro lado, a superfície abaxial apresentou 6 tricomas/mm². Essas estruturas apresentam-se distribuídas em diferentes tamanhos. Contudo, a maioria dos tricomas são longos e alguns tricomas apresentam sua base no mesmo nível que as células da epiderme, já em outros a base é mais elevada e varia de uni a pluricelulares. Esses anexos epidérmicos são responsáveis por conferir proteção contra herbivoria e diminuir a perda de água causada por transpiração excessiva (OLIVEIRA; AKISUE, 2009).

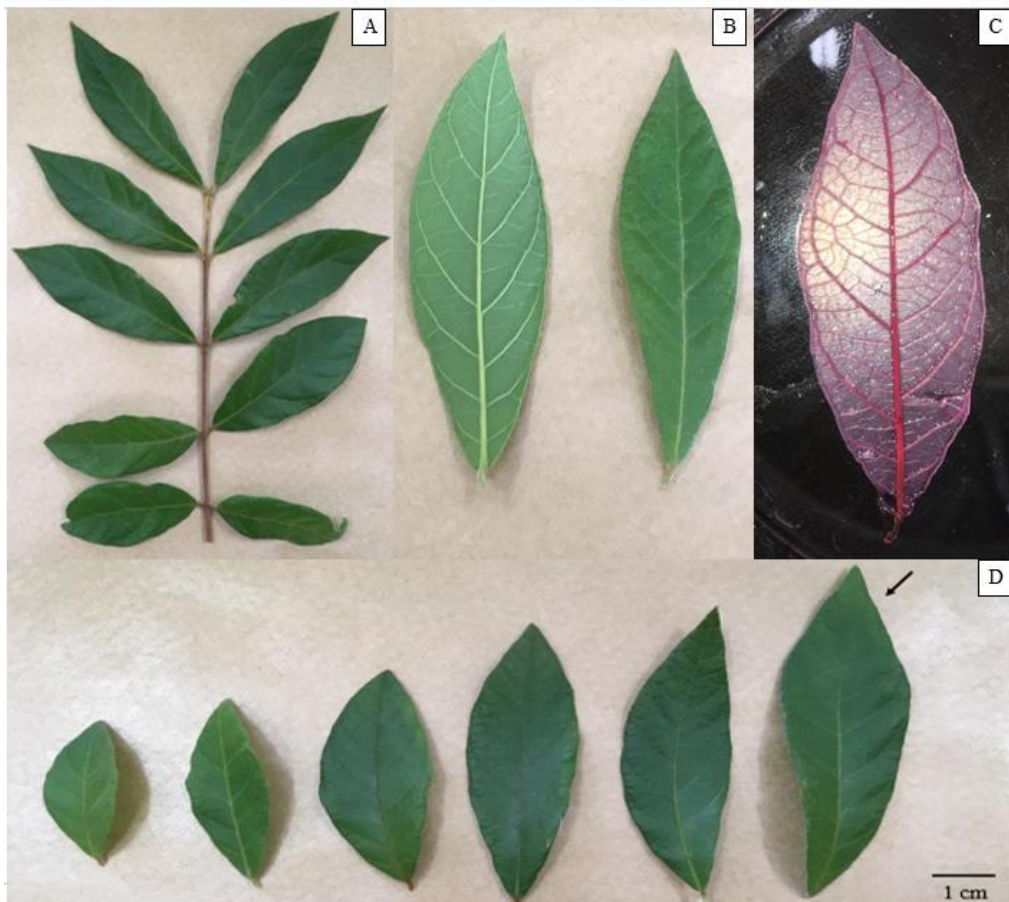


Fig. 1. Filotaxia oposta-cruzada (A), faces do limbo foliar discolores (B), padrão de venação broquidródoma (C) e morfologia das folhas de *Campomanesia rufa* em diferentes níveis de maturação (D). A seta indica uma folha completamente expandida utilizada nas análises deste trabalho (D).

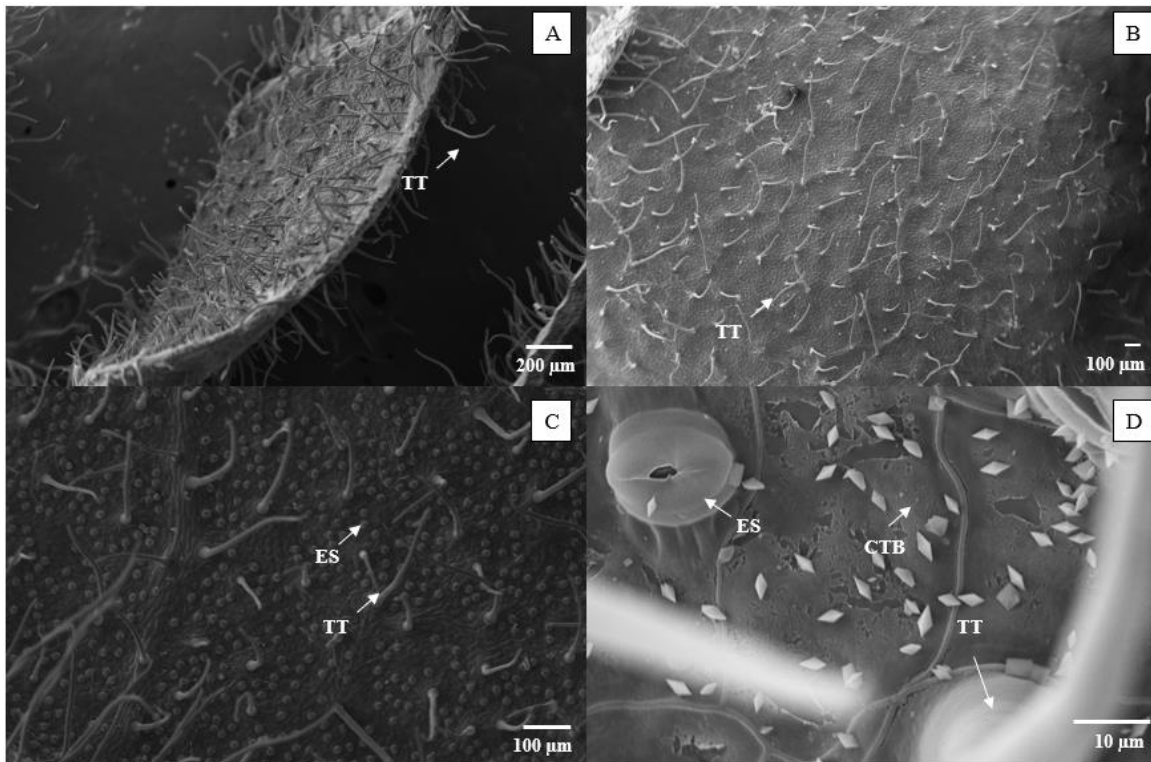


Fig. 2 Tricomas tectores presentes em ambas as faces do limbo foliar de *Campomanesia rufa* (A), face adaxial com numerosos tricomas tectores (B), face abaxial com a presença de estômatos e tricomas tectores (C) estômato saliente (paracítico), tricomas tectores e cutícula abaxial (D). Legenda: tricomas tectores (TT), estômato (ES) e cutícula da face abaxial (CTB).

Até a data do presente trabalho, não há relato da anatomia quantitativa do limbo foliar para *C. rufa*, apenas descritiva de plantas cultivadas *in vitro* da mesma espécie descrevendo as células e os tecidos foliares (TIMÓTEO *et al.*, 2019). As folhas de *C. rufa* ao serem seccionadas transversalmente no terço médio apresentaram 133,01 µm de espessura e o mesofilo foliar com 94,47 µm de espessura em média, sendo este último denominado heterogêneo e dorsiventral.

Em relação à cutícula na face adaxial, ela é proeminente quando comparada a face abaxial. As células da epiderme em ambas as faces do limbo foliar são unisseriadas e possuem formato tabular na face adaxial e irregular na face abaxial. Na face adaxial as células da

epiderme possuem em média 12,71 μm de espessura, por outro lado, as células da epiderme na face abaxial possuem em média espessura de 5,98 μm (Fig. 3A).

Segundo Metcalfe e Chalk (1979), em Myrtaceae é recorrente essa arquitetura anatômica, com epiderme unisseriada, apêndices da epiderme ou tricomas unicelulares e cavidades secretoras.

Ao realizar as secções nas folhas de *C. rufa in vivo* foram confirmados os resultados descritivos encontrados por Timóteo et al. (2019) em plantas da mesma espécie, cultivadas *in vitro* sobre as características referentes à presença e tipo de estômatos. As folhas são hipoestomáticas (Fig. 3B) e os estômatos são paracíticos (Fig. 3D). Além disso, os estômatos podem ser definidos como salientes, devido sua localização ser em plano superior às demais células também da epiderme (Fig. 3 D).

Neste trabalho, foram observados, em média, densidade estomática de 521 estômatos/ mm^2 nas folhas de *C. rufa*, 16,11 μm para diâmetro polar e 9,22 μm para diâmetro equatorial. A elevada quantidade de estômatos pode ter sido ocasionada pela presença de sombreamento onde se encontravam os indivíduos. De acordo com Krupek & Lima (2012), plantas de *C. xanthocarpa* que estavam sob áreas sombreadas apresentaram maiores proporções destes anexos epidérmicos.

O mesofilo das folhas de *C. rufa* é heterogêneo e dorsiventral (assimétrico), ou seja, possui parênquima paliçádico situado abaixo das células da epiderme adaxial e parênquima esponjoso acima das células da epiderme abaxial. O parênquima paliçádico é composto por uma única camada de células, sendo por isso denominado unisseriado. Por outro lado, o parênquima esponjoso possui suas células organizadas em 3 a 5 camadas. As células do parênquima paliçádico são isodiamétricas e colunares com espessura de 43,21 μm , além disso, apresentam cristais prismáticos. O parênquima esponjoso é mais espesso, 51,73 μm , e os espaços intercelulares possuem tamanhos variados.

A nervura central é caracterizada por feixe vascular bicolateral e tecido parenquimático de preenchimento, com células de formato ovalado, além da presença de cristais prismáticos. As células da epiderme na face adaxial possuem formato tabular e ovaladas, e ambas são unisseriadas. O colênquima possui de 3 a 6 camadas (Fig. 3 C e D) está situado acima do feixe vascular e é do tipo anelar.

Na nervura central próximo à região do parênquima de preenchimento e no mesofilo próximo ao parênquima esponjoso e na epiderme da face abaxial estão as cavidades secretoras (CS) (Figs. 3 E e F). Essas estruturas formadas por células do epitélio e lúmen estão distribuídas por toda a lâmina foliar (Figs. 3 G, H e I). Neste estudo, as CS apresentaram diâmetro de 39,26 μm e morfologia ovalada. Já as células epiteliais secretoras possuíam, em média, 5,58 μm de espessura e 68,46 μm^2 de área. Os lúmens das CS apresentaram, em média, uma área de 1.356,94 μm^2 .

As CS presentes tanto na nervura central quanto no mesofilo, ao serem coradas com Sudam IV, evidenciaram a presença de lipídeos no lúmen (Fig. 3 E e H). Esses resultados corroboram com os observados por Gogosz et al. (2010) que ao corarem folhas de *C. xanthocarpa* com Sudam III, observaram que as células secretoras também apresentam conteúdo lipídico tanto nas nervuras quanto no mesofilo. Além disso, o teste histoquímico realizado com o reagente de NADI confirmou a presença de terpenos em células da epiderme na face adaxial, parênquima paliçádico e no lúmen das CS (Fig. 3 F e I). Os terpenos nas CS foram encontrados tanto no lúmen quanto nas células do epitélio secretor (Fig. 3F). Esses resultados são consistentes com os relatados por Kuster e Vale (2016) que observaram a existência de terpenos ao longo do limbo das folhas de *C. adamantium*.

Os terpenos são produtos derivados do metabolismo secundário, encontrados nestas estruturas secretoras e possuem ampla funcionalidade para as plantas, como proteção contra a herbivoria devido a sua toxicidade para muitos insetos (AYOAMA & LABINAS, 2012;

GOGOSZ, et al. 2010; FIUZZA et al. 2008). As cavidades secretoras, além de material lipofílico, também secretam substâncias adicionais que podem ser proteínas ou polissacarídeos (FAHN, 1988). O conhecimento das estruturas secretoras, além do valor taxonômico, contribui para a compreensão do material secretado.

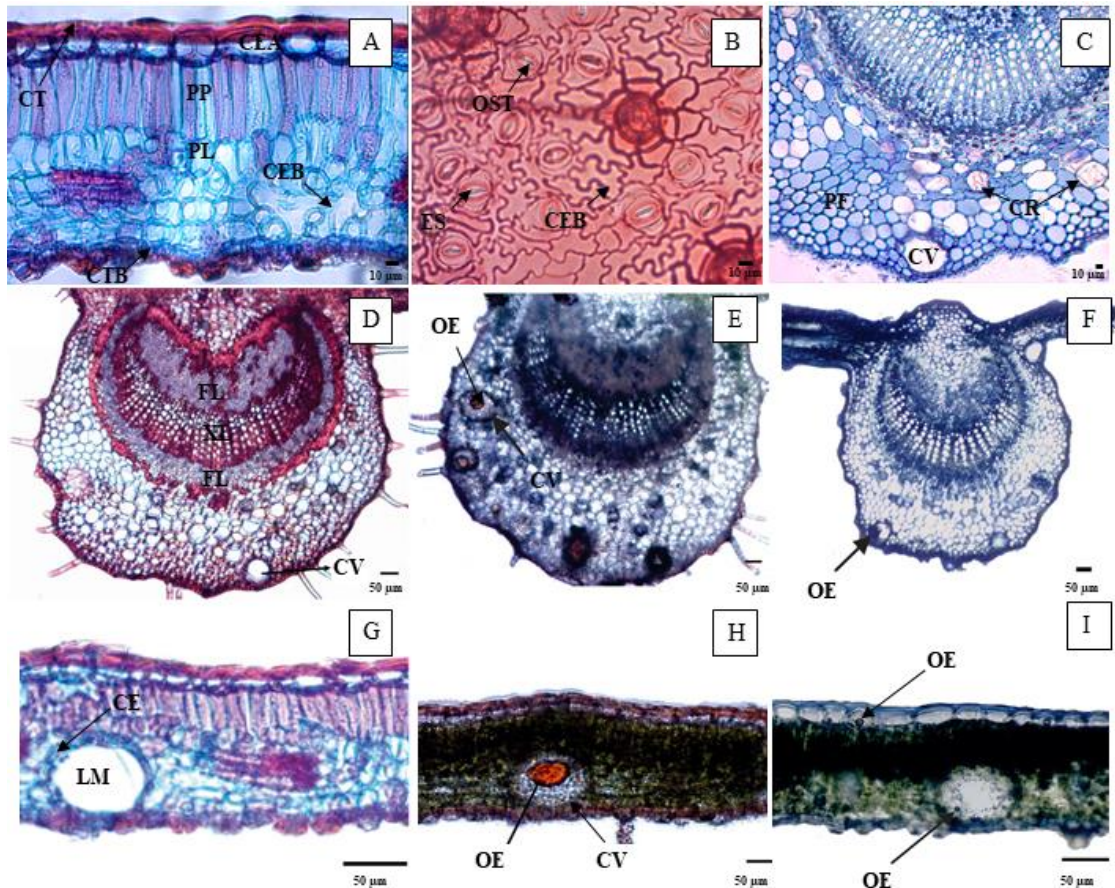


Fig. 3. Folhas de *Campomanesia rufa*. Secção transversal do mesofilo (A), secção paradérmica da epiderme da face abaxial evidenciando os estômatos (B), nervura central evidenciando as cavidades secretoras (C, D), nervura central corada com SUDAM IV (E), nervura central corada com reagente de NADI (F), cavidade secretora (G), cavidades secretoras no mesofilo com presença de óleo essencial (H, I). Cutícula da face adaxial (CT), células da epiderme da face adaxial (CEA), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PL), células da epiderme da face abaxial (CEB), cutícula da face abaxial (CTB), estômato (ES), ostíolo (OST), floema

(FL), xilema (XL), parênquima fundamental (PF), cristais (CR), cavidade secretora (CS) e óleos essenciais (OE).

3.2 Teor de umidade e rendimento do CRO

O teor de umidade das folhas de *C. rufa* foi de 42,43% e o rendimento do CRO foi 0,3% p/p BLU. O CRO apresentou tonalidade clara, cor amarela e odor agradável.

Os rendimentos de óleos essenciais encontrados neste trabalho corroboram com os obtidos por Limberger et al. (2001) a partir de órgãos vegetativos foliares em quatro espécies de gabioba. Esses autores encontraram rendimento de 0,4% em *C. rhombea*, 0,2% em *C. aurea*, 0,1% em *C. guazumifolia* e 0,2% em *C. xanthocarpa*.

No âmbito taxonômico de família, outras mirtáceas podem apresentar rendimento de óleo essencial semelhantes às espécies de *Campomanesia*. Limberger et al. (2004) extraíram óleos essenciais das folhas de nove espécies de *Myrcia* (*M. richardiana*, *M. hatschbachii*, *M. selloi*, *M. oligantha*, *M. lajeana*, *M. obtecta*, *M. arborescens*, *M. pubipetala* e *M. rostrata*) e encontraram resultados variando de 0,1 a 0,5%.

Os metabólitos secundários (MSs) podem variar em quantidade e qualidade devido às condições intrínsecas dos organismos vegetais, tais como genética, morfogenética e ontogenia, além das respostas aos estímulos ambientais. Entre os fatores ambientais que alteram as rotas metabólicas e influenciam no rendimento e produção de MSs dentro das plantas estão temperatura, salinidade, fertilidade do solo, luz, disponibilidade hídrica, nutrientes e altitude, dentre outros (YANG et al., 2018).

Sabe-se também que o rendimento e a diferença de composição em algumas espécies podem ser explicados por fatores geográficos, ecológicos, método de extração e tipo de órgão utilizado para a extração do óleo essencial (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

3.3 Caracterização do óleo essencial de *Campomanesia rufa*

Neste trabalho, foi identificada a presença de 28 compostos no óleo essencial das folhas de *C. rufa*, conforme o cromatograma (Fig. 4) e a Tabela 1. Os constituintes majoritários foram (2E, 6E)-farnesal (41,64%), (2E,6Z)-farnesal (27,74%), (2E, 6Z)-farnesol (3,54%), pertencentes à classe de sesquiterpenos oxigenados (Fig. 5).

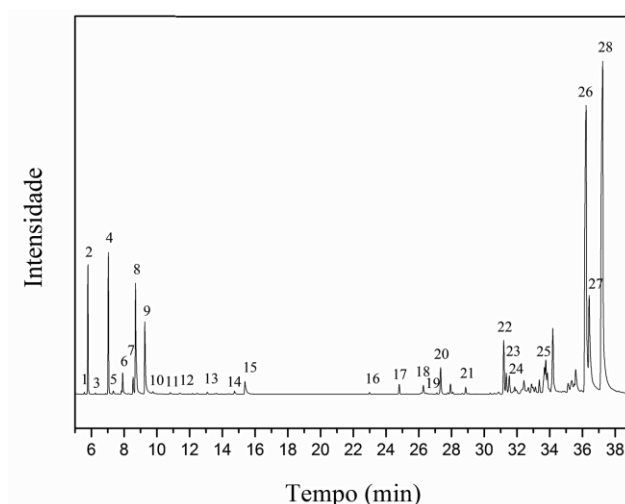


Fig. 4. Cromatograma do óleo essencial das folhas de *C. rufa*.

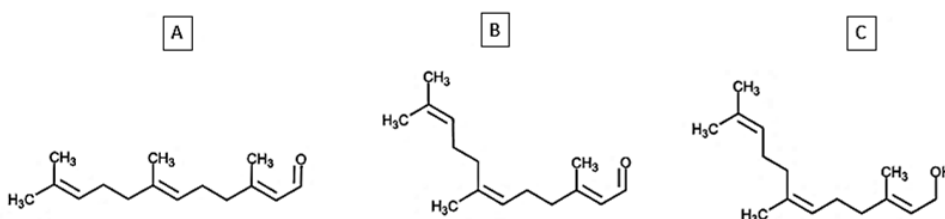


Fig. 5. Compostos majoritários do óleo essencial das folhas de *C. rufa*. (2E, 6E) -Farnesal (A), (2E, 6Z) -Farnesal (B) e (2E, 6Z) -Farnesol (C).

Os sesquiterpenos oxigenados possuem baixo peso molecular, podendo conter grupos funcionais orgânicos como cetonas, lactonas, aldeídos, álcool e ácidos. Diversas propriedades biológicas já foram descritas para esse grupo. Nas plantas, os sesquiterpenos impedem a ação

de herbívoros, além de agirem como fitoalexinas. Aplicações recorrentes, relacionadas a essas moléculas, também foram descritas para as indústrias cosméticas e farmacêuticas pelas propriedades antioxidantes, antitumoral, antibacteriana, dentre outras. Além disso, esses compostos estão presentes em outras plantas de interesse econômico e medicinal (MERFORT et al., 2002).

Tabela 1

Composição química e percentual do óleo essencial de *Campomanesia rufa*.

Compostos	TR (min)	*IR referência	IR calculado	Area (%)
α -Tujona	5.573	924	923	0.0343
α -Pinoeno	5.788	932	931	2.5978
Canfeno	6.246	946	948	0.0247
β -Pinoeno	7.040	974	976	3.3844
Mirceno	7.336	988	990	0.1787
α -Felandreno	7.915	1002	1006	0.5934
ρ -Cimeno	8.548	1020	1023	0.4150
Limoneno	8.698	1024	1027	3.2511
β -(E)-Ocimeno	9.268	1044	1043	2.4289
γ -Terpineno	9.758	1054	1056	0.0635
Terpinoleno	10.814	1086	1085	0.0822

Linalol	11.396	1095	1100	0.1124
<i>Trans</i> -pinocarveol	13.086	1135	1141	0.1195
Terpinen-4-ol	14.748	1174	1180	0.1571
α -Terpineol	15.385	1186	1195	0.5535
α -Copaeno	22.992	1374	1372	0.0871
(E)-Cariofileno	24.808	1417	1415	0.3947
α -Humuleno	26.281	1452	1451	0.2977
Germacreno D	27.336	1484	1477	1.0045
Biciclogermacreno	27.936	1500	1491	0.2802
δ -Cadineno	28.866	1522	1514	0.2659
Espatulenol	31.193	1577	1574	1.8723
Oxido de cariofileno	31.347	1582	1578	1.1930
Viridiflorol	31.532	1592	1582	0.3693
α -epi-Muurulol	33.762	1640	1640	2.3055
(2E,6Z)-Farnesal	36.223	1713	1704	27.7451
(2E,6Z)-Farnesol	36.411	1714	1710	3.5400
(2E, 6E)- Farnesal	37.238	1740	1734	41.6460
<hr/>				
Total				94.99
<hr/>				

Hidrocarbonetos monoterpênicos	13.0197
Monoterpenos oxigenados	0.97680
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos	2.33010
Sesquiterpeno oxigenado	78.6712

TR: Tempo de retenção; IR: Índice de retenção; *Biblioteca de índice de retenção espectral em massa (Adams, 2007).

Em estudo realizado por Bhandari et al. (2010) em *Arabidopsis*, os autores mostraram que o sesquiterpeno oxigenado, farnesal, pode ser produzido a partir de farnesilcisteína e farnesil difosfato, e, possivelmente, as membranas vegetais também podem conter enzima oxirredutase capaz de catalisar a redução do farnesal a farnesol ou a oxidação do farnesol a farnesal.

Os isômeros do farnesal ((2E,6E)-farnesal e (2E,6Z)-farnesal) são escassos na constituição dos óleos essenciais de folhas das espécies do gênero *Campomanesia*. Entretanto, em algumas espécies da família Myrtaceae há registros desses isômeros na composição dos seus óleos essenciais. Figueiredo et al. (2018) encontraram isômeros de farnesal ((2E,6Z)-farnesal e (2E,6E)-farnesal) no óleo essencial das folhas da espécie *Psidium guineense* (Myrtaceae). As plantas foram coletadas em distintas localidades do estado do Pará e obtiveram variações na porcentagem da molécula presente no óleo, desde 0,2-1,3% e 0,3-3,6%, para (2E,6Z)-farnesal e (2E, 6E)-farnesal, respectivamente. Sá et al. (2012) também encontraram no óleo essencial das flores frescas da *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) os compostos (2Z,6Z) - farnesal (6,86%), (2E, 6E) -farnesal (5,36%).

Estudos demonstram que uma variedade de famílias de plantas apresentou apenas traços de isômeros de farnesal, contudo, são esporádicas as espécies que apresentam a concentração de farnesal maior ou igual a 1% (BROPHY et al. 1999).

Outro composto majoritário presente no óleo essencial de *C. rufa* foi o (2E,6Z)-farnesol, corroborando com os estudos de Sá et al. (2012), que encontraram o isômero dessa molécula ((2Z, 6Z) - farnesol (10,65%)) no óleo essencial das flores frescas em *Myrcia tomentosa*. O farnesol é um isoprenoide não-esterol, com várias aplicações para medicamentos e cosméticos. Além disso, é composto intermediário na biossíntese de várias substâncias (BATES et al., 1963). Esse álcool sesquiterpênico possui atividade antineoplásica em humanos ao bloquear a proliferação celular em condições *in vitro*, e inibe também o desenvolvimento tumoral *in vivo* (JUNG et al., 2018).

Outras espécies do gênero em estudo, *C. sessiflora*, *C. phaea*, *C. xanthocarpa*, *C. rhombea* e *C. adamantium*, também possuem maiores percentuais de constituintes pertencentes à classe de sesquiterpenos (ADATI & FERRO, 2006; CARDOSO et al., 2010a; CARDOSO et al., 2010b; LIMBERGER et al., 2001; MARIN et al., 2008). Além das folhas, as flores e o caule de algumas espécies do gênero *Campomanesia*, apresentam óleos essenciais. Desta forma, é válido realizar trabalhos nesse âmbito para a *C. rufa*, visto que não há estudos na literatura.

3.4 Concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial das folhas de *Campomanesia rufa* sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

O óleo essencial das folhas de *Campomanesia rufa* inibiu o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* na diluição 7,10 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Em relação aos controles, o DMSO não inibiu o crescimento dos microrganismos em nenhuma das placas. Por outro lado, o controle positivo clorofenicol inibiu o crescimento bacteriano em todas as placas que continham o inóculo (Fig. 6).

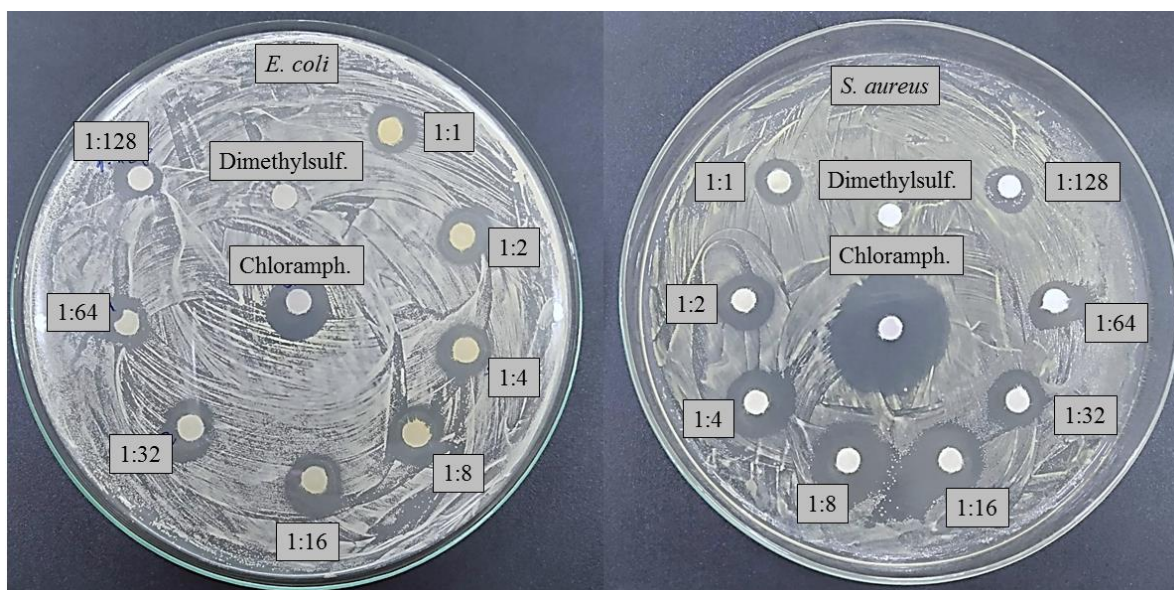


Fig. 6. Inibição do crescimento bacteriano de *Escherichia coli* (à esquerda) e *Staphylococcus aureus* (à direita) após a aplicação do óleo essencial das folhas de *Campomanesia rufa*.

A inibição do crescimento desses microrganismos no meio de cultura pode ter ocorrido devido ao teor de farnesol presente no óleo essencial de *C. rufa*, pois, segundo Kaneko et al. (2011), a aplicação de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de farnesol em *S. aureus* inibiu o crescimento bacteriano por 24 horas. Além disso, Mercier et al. (2009) mencionam o efeito antibacteriano sob cepas Gram positivas assim como *S. aureus* quando monoterpenos, como α -pineno e β -pineno, são combinados da mesma maneira que foram encontrados no óleo essencial das folhas de *C. rufa*.

Adati e Ferro (2000) também observaram atividade antibacteriana em *Campomanesia phaea* contra *S. aureus*, com halo de inibição de 1,2 cm. A planta apresentava os mesmos monoterpenos descritos anteriormente, como alfa-pineno, beta-pineno, limoneno, além de outros.

Os óleos essenciais das folhas de *Campomanesia adamantium* mostraram potencial antibacteriano sob os microrganismos também testados neste trabalho. Entretanto, segundo Coutinho et al. (2009), os óleos essenciais das folhas de *C. adamantium* no estágio reprodutivo

mostraram alto nível de atividade antibacteriana contra *S. aureus*, e os principais compostos bioativos encontrados foram os monoterpenos limoneno, α -pineno e β -pineno. Por outro lado, todos os óleos essenciais das distintas fases de vida da planta (reprodutivo e vegetativo) apresentaram atividade moderada contra *E. coli*.

Na família Myrtaceae, também é descrita a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* devido à presença de outros monoterpenos tanto hidrocarbonados quanto oxigenados (YOKOMIZO & NAKAOKA-SAKITA, 2014), como o limoneno, terpinoleno e terpinen-4-ol, todos também presentes no óleo essencial das folhas de *C. rufa*. Desta forma, foi observado que o óleo essencial das folhas de *C. rufa* possui mais de um composto bioativo com atividade antibacteriana contra *S. aureus*.

Em espécies do gênero *Eucalyptus*, também pertencente a Myrtaceae, houve atividade antibacteriana considerável dos óleos essenciais das folhas de *E. cloeziana*, *E. citriodora*, *E. grandis* e *E. saligna* contra *E. coli* ATCC 8739 e os halos de inibição foram maiores ou igual a 1 cm, assim como neste trabalho. Entretanto, o óleo essencial das folhas de *E. microcorys* não apresentou atividade inibitória sob o crescimento do mesmo microrganismo (ESTANISLAU et al., 2001).

Assim, os resultados obtidos neste estudo contribuem para futuras pesquisas sobre a fitoquímica da espécie, além de suas possíveis aplicações.

4. CONCLUSÕES

As folhas de *Campomanesia rufa* apresentam mesofilo heterogêneo e dorsiventral, cutícula da face adaxial mais espessa quando comparada a abaxial, parênquima paliçádico formado por uma camada de células e o parênquima esponjoso formado entre 3 e 5 camadas.

As cavidades secretoras estão presentes no mesofilo e na nervura central e armazenam óleo essencial. O óleo essencial presente nas folhas de *C. rufa* apresentou como componentes

majoritários o (2E, 6E)-farnesal (41,64%), (2E,6Z)-farnesal (27,74%), (2E, 6Z)-farnesol (3,54%).

Os microrganismos *E. coli* e *S. aureus* mostraram-se sensíveis ao óleo essencial das folhas de *C. rufa*, e o efeito bacteriostático foi observado até a diluição de $7,10 \mu\text{L mL}^{-1}$.

REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4 ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, p. 804, 2007.
- Adati, R.T., Ferro, V.O., 2006. Volatile oil constituents of *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum (Myrtaceae). Journal of Essential Oil Research. 18, 691–692.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699207>.
- Andrade, B.F., 2011. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. Cadernos Acadêmicos Universidade do Sul de Santa Catarina, Santa Catarina.
- Ayoama, E.M., Labinas, A.M., 2012. Características estruturais das plantas contra herbivoria por insetos. Enciclopédia Biosfera. 8, 365–381.
- Bessa, N.G.F, Borges, J.C.M., Bussara, F.P., Carvalho, R.H.A., Pereira, M.A.B., Fagundes, R, Campos, S.L., Ribeiro, L.U., Quirino, M.S., Junior, A.F.C., Alves, A., 2013. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 15, 692-707. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500010>.
- Bhandari, J., Fitzpatrick, A. H., Crowell, D.N., 2010. Identification of a Novel Abscisic Acid-Regulated Farnesol Dehydrogenase from Arabidopsis. Plant Physiology. 154, 1116-1127. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.157784>.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2010. Farmacopeia Brasileira, Brasília, 5 ed., 198-199.
- Brophy, J., Goldsack, R.J., Bean, A.R., Forster, P.I., Lepschi, B.J., 1999. Leaf essential oils of the genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in eastern Australia. Part 5. *Leptospermum continentale* and allies. Flavour and Fragrance Journal.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199903/04\)14:2<98::AID-FFJ797>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199903/04)14:2<98::AID-FFJ797>3.0.CO;2-V).

Bukatsh, F., 1972. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablausafranina. *Microkosmos*. 61, 255-256.

Bünger, M.O., Scalon, V.R.; Sobral, M., Stehmann, J.R., 2012. Myrtaceae no Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*. 63, 857–881. <https://doi.org/10.1590/S2175-78602012000400009>.

Cardoso, C.A.L., Kataoka, V.M.F., Ré-Poppi, N., 2010a. Identification of the volatile compounds of flowers of *Campomanesia sessiliflora* O. Berg and *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. *Journal of Essential Oil Research*. 22, 254-256. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700318>.

Cardoso, C.A.L., Kataoka, V.M.F., Ré-Poppi, N., 2010b. Leaf oil of *Campomanesia sessiliflora* O. Berg. *Journal of Essential Oil Research*. 22, 303–304. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700330>.

Castro, E. M., Pereira, F. J., Paiva, R. *Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos*. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

Coutinho, I.D., Cardoso, C.A.L., Ré-Poppi, N., Melo, A.M., Vieira, M.C., Honda, N.K., Coelho, R.G., 2009. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45, 767–776. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000400022>.

David, R., Carde, J.P., 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences Paris*. 258, 1338–1340.

Estanislau, A.A., Barros, F.A.S.I., Peña, A.P., Santos, S.C., Ferri, P. H., Paula, J.R., 2001.

Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de eucalyptus cultivadas em Goiás. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 11, 95–100.

Evert, R.F., 2006. *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body:*

Their Structure, Function, and Development. 3. ed., John Wiley and Sons, New Jersey.

Fahn, A., 1988. Secretory tissue in vascular plants. *New Phytologist*. 108, 229–257.

Fahn, A., 1990. *Plant anatomy*. Pergamon Press, Oxford.

Franco, M.J.C.S., Albiero, A.L.M., 2018. Estruturas secretoras em folha e caule de

Esenbeckia febrifuga (A.St.-Hil.) A. Juss. ex Mart. e *Esenbeckia grandiflora* Mart.

(Rutaceae). *Hoehnea*. 45, 468–483. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-75/2017>.

Felippe, G.M., Alencastro, F.M.M.R., 1966. Contribuição ao estudo da nervação foliar das

Compositae dos Cerrados. I-Tribus: Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Mutiseae e

Senecioneae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro. 38

(Suplemento), 125-157.

Félix-Silva, J., Tomaz, I.M., Silva, M.G., Santos, K.S.C.R., Silva-Júnior, A.A., Carvalho,

M.C.R.D., Soares, L.A.L., Fernandes-Pedrosa, M.F., 2012. Identificação botânica e

química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista*

Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu. 14(3), 548-555.

Figueiredo, P.L.B., Silva, R.C., Silva, J.K.R., Suemitsu, C., Mourão R.H., MAIA, J.G.S.,

2018. Chemical variability in the essential oil of leaves of Araçá (*Psidium guineense*

Sw.), with occurrence in the Amazon. *Chemistry Central Journal*. 12(52), 1–11.

<https://doi.org/10.1186/s13065-018-0428-z>.

Fiuzza, T.S., Rezende, M.H., Sabóia-Morais, S.M.T., Bara, M.T.F., Tresvenzol, L.M.F.,

Paula, J.R., 2008. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L.

(Myrtaceae). Revista Eletrônica de Farmácia. 2, 1–11. DOI:

<https://doi.org/10.5216/ref.v5i2.5148>.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova. 30(2), 374–381.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.

Gogosz, A. M., Cosmo, N.L., Bona, C., Souza, L.A., 2010. Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). Acta Botanica

Brasilica. 24(3), 613–623. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000300003>.

International Union for Conservation of Nature (IUCN).

<https://www.iucnredlist.org/species/35334/9927548>. (acesso em 09 de maio de 2019).

Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. London: McGraw-Hill Book Company, Inc. 523 p.

Jung, Y.Y., Hwang, S.T., Sethi, G., Fan, L., Arfuso, F., Ahn, K.S., 2018. Potential Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Properties of Farnesol. Molecules. 23(11), 1–15. DOI: [10.3390/molecules23112827](https://doi.org/10.3390/molecules23112827).

Kaneko, M., Togashi, N., Hamashima, H., Hirohara, M., Inoue, Y., 2011. Effect of farnesol on mevalonate pathway of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Antibiotics. 64, 547–549. DOI: [10.1038/ja.2011.49](https://doi.org/10.1038/ja.2011.49).

Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology. 27, 137–138.

Krupek, R.A., Lima, A.G., 2012. Variação na estrutura foliar de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) sob diferentes condições de luminosidade em um remanescente de Floresta Ombrófila Mista. Ambiência Guarapuava, 8(2), 293–305. DOI: [10.5777/ambiencia.2012.02.05](https://doi.org/10.5777/ambiencia.2012.02.05).

- Kuster, V.C., Vale, F.H.A., 2016. Leaf histochemistry analysis of four medicinal species from Cerrado. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 26(6), 673–678.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.015>.
- Limberger, R.P., Sobral, M., Henriques, A.T., Menut, C., Bessi ere, J.M., 2004.  leos vol ateis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*. 27(6), 916–919.
- Limberger, R.P., Apel, M.A., Sobral, M., Moreno, P.R.H., Henriques, A.T., Menut, C., 2001. Aromatic Plant from Brazil - Chemical Composition of Essential Oils from Some *Campomanesia* species (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*. 13, 113–115.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600015>.
- Machado, B. F.M.T.; Junior Fernandes, A., 2011.  leos essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cadernos Acad micos, Tubar o*, 3(2), 105-127.
- Marin, R., Apel, M.A., Limberger, R.P., Raseira, M.C.B., Pereira, J.F.M., Zuanazzi, J.A.S., Henriques, A.T., 2008. Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy*. 27, 172–177.
- Mercier, B., Prost, J., Prost, M., 2009. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): A review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22(4), 331–342. DOI: [10.2478/v10001-009-0032-5](https://doi.org/10.2478/v10001-009-0032-5).
- Merfort, I., 2002. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography A*. 967, 115–130. DOI: [10.1016/s0021-9673\(01\)01560-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)01560-6).
- Metcalf, C.R., Chalk, L., 1979. *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press.
- Morais, L.M.F., Concei o, G.M., Nascimento, J.M., 2014. Família Myrtaceae: Análise morfológica e distribui o geográfica de uma cole o botânica. *Agrarian Academy*. 1(1), 317–346.

- Morais, P.O., Lombardi, J.A., 2006. A Família Myrtaceae na reserva particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana*. 7, 3–32.
<http://hdl.handle.net/11449/68749>.
- NCCLS. 2003a..Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238 486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- NCCLS. 2003b. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Oliveira, M.I.U., Rebouças, D.A., Leite, K.R.B., Oliveira, R.P., Funch, L.S., 2018. Can leaf morphology and anatomy contribute to species delimitation? A case in the *Campomanesia xanthocarpa* complex (Myrtaceae). *Flora*. 249, 111–123.
<https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.10.004>.
- Pearse, A.G.E., 1972. Histochemistry: theoretical and applied. 2, 3 ed. (The Williams & Wilkins Company: Baltimore.
- Pimentel, F.A., Cardoso, M.G., Salgado, A.P.S.P., Aguiar, P.M., Silva, V.F., Moraes, A.R., Nelson, D.L., 2006. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. *Química Nova*. 29(2), 373–375.
- Preedy, V.R. 2015. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Academic Press, San Diego, USA, 930 p.
- Oliveira, M.I.U., Costa, I.R., Proença, C.E.B., 2020. *Campomanesia* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10307> (acesso em 13 de maio de 2021).

- Ribeiro, J.P.O., Junior, A.h.O., Silva, C.J., 2018. Ontogenia das cavidades secretoras de *Campomanesia* sp. (Myrtaceae). Anais do Congresso Nacional de Botânica: XII Encontro de Botânicos do Centro-Oeste.
- Sá, F.A.S., Borges, L.L., Paula, J.A.M., Sampaio, B.L., Ferri, P.H., Paula, J.R., 2012. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa*: composition and variability. Revista Brasileira de Farmacognosia. 22, 1233–1240. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000120>.
- Sales, H.J.S.P., 2015. *Lavandula L.* - aplicação da cultura in vitro à produção de óleos essenciais e seu potencial económico em Portugal. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 17(4), 992–999. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_101.
- Sant’Ana, C.R.O., Paiva, R., Reis, M.V., Silva, D.P.C., Silva, L.C., 2018. In vitro propagation of *Campomanesia rufa*: An endangered fruit species. Ciência e Agrotecnologia. 42(4), 372–380. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018424011018>.
- Van Den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. Journal of Chromatography A. 11, 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X).
- Vidal, W.N., Vidal, M.R.R., 2011. Botânica Organografia. Quadros sinóticos ilustrados de fanerógamas. 4 ed. Viçosa: Editora UFV, p. 124.
- Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X, Zhao, Y.W., Wei, F., Wang, Q., 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. Molecules. 23(4), 1–26. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>.
- Yokomizo, N.K.S., Nakaoka-Sakita, M., 2014. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 16(3), 513–520. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_097.

ARTIGO 2 – EFEITO DA QUALIDADE DE LUZ SOBRE MICROESTACAS DE *Campomanesia rufa* (O.BERG) NIED. CULTIVADAS *IN VITRO*, ANÁLISE BIOMÉTRICA, ANATÔMICA, BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA.

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Scientia Horticulturae* (ISSN:0304-4238) – versão preliminar

Cecília Ramos de Oliveira ^{a*}, Flávio Antônio Zagotta Vital ^a, Filipe Almendagna Rodrigues ^b, Arthur de Paula Metzker ^b, Moacir Pasqual ^b.

*autor para correspondência, endereço de e-mail: croliveirabot@gmail.com.

^a Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^b Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Highlights

- Diodos emissores de luz no cultivo *in vitro* de espécies arbóreas brasileiras
- Pigmentos fotossintéticos e qualidade de luz em *Campomanesia rufa*
- Modificações anatômicas estruturais em folhas de *Campomanesia rufa*

RESUMO

Campomanesia rufa (*C. rufa*) é uma espécie endêmica e frutífera encontrada em áreas de intensas atividades antrópicas de Mata Atlântica e Cerrado brasileiro, e é considerada como deficiente de dados pela *Red List*. Neste sentido, a micropropagação pode ser considerada como alternativa viável para manutenção da espécie e realização de estudos posteriores. Objetivou-se avaliar o efeito da qualidade de luz sobre as plantas de *C. rufa* cultivadas *in vitro* numa perspectiva biométrica, anatômica, bioquímica e fisiológica. Microestacas de *C. rufa* com folhas excisadas foram submetidas ao cultivo *in vitro* em meio Murashige & Skoog (1962) livre de reguladores de crescimento de plantas, sob distintos espectros de luz fornecidos por diodos emissores de luz (LED's). Os tratamentos foram compostos por LED's monocromáticos: verde, azul, amarelo, branco e vermelho, misto 2,5 vermelho: 1,0 azul (roxo), e lâmpadas fluorescentes como controle. Passados os 90 dias de cultivo, os teores de clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides foram avaliados. Análises anatômicas de segmentos foliares e caules foram realizadas, para isso, escolheu-se mesofilo e nervura central para as folhas e porção mediana dos caules. Os resultados revelaram que a qualidade de luz teve influência nas análises biométricas. O maior número de brotos (2,0) obtidos foi no LED roxo, maiores números de gemas e folhas ocorreram no LED roxo e na lâmpada fluorescente. As plantas sob LED roxo apresentaram maior massa fresca (0,09g). As plantas cultivadas sob o LED vermelho apresentaram maiores concentrações para as clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides, sendo respectivamente 1,03 mg g⁻¹, 0,43 mg g⁻¹, 1,47 mg g⁻¹ e 0,34 µg g⁻¹. A anatomia foliar mostrou que as folhas das plantas cultivadas sob LED's azul, verde e roxo ficaram mais espessas assim como o tecido fotossintetizante e as células da epiderme da face adaxial. A área do feixe vascular na nervura central das folhas foi maior nos LED's verde e vermelho. Os caules apresentaram maiores diâmetros nos LED's azul

e roxo e nas lâmpadas fluorescentes. Sendo assim, podemos concluir que o LED roxo e as lâmpadas fluorescentes convencionais dão resultados semelhantes na indução de brotos na ausência de reguladores de crescimento, entretanto, no LED roxo as plantas apresentam maior massa fresca. Plantas cultivadas *in vitro* sob LED vermelho possuem maiores teores de pigmentos fotossintéticos. Além disso, plantas cultivadas nos LED's azul, verde e roxo apresentaram folhas mais espessas. Assim como as plantas cultivadas no LED roxo e lâmpadas fluorescentes apresentaram caules mais espessos.

Palavras-chave:

Anatomia estrutural

Campomanesia

Espectro de luz

Myrtaceae

Pigmentos fotossintéticos

ABSTRACT

Campomanesia rufa (*C. rufa*) is an endemic and fruitful species found in areas of intense anthropic activities in the Atlantic Forest and Brazilian Cerrado, it is data deficient by the Red List. In this sense, micropropagation can be considered as a viable alternative for maintaining the species and carrying out further studies. The objective of this study was to evaluate the effect of light quality on *C. rufa* plants grown *in vitro* from a biometric, anatomical, biochemical, and physiological perspective. Micro cuttings of *C. rufa* with excised leaves were subjected to *in vitro* cultivation in Murashige & Skoog (1962) medium free of plant growth regulators, under different light spectra provided by light emitting diodes (LED's). The treatments were composed of monochromatic LEDs: green, blue, yellow, white, and red, mixed 2.5 red: 1.0 blue (purple), and fluorescent lamps as a control. After 90 days of cultivation, the levels of chlorophylls *a*, *b*, total and carotenoids were evaluated. Anatomical analyzes of leaf segments and stem were performed, for this, mesophyll and midrib were chosen for the leaves and median portion of the stems. The results revealed that the quality of light had an influence on biometric analyzes. The largest number of shoots (2.0) obtained was in the purple LED, higher numbers of buds and leaves occurred in the purple LED and in the fluorescent lamp. Plants under purple LED showed higher fresh weight (0.09g). Plants grown under the red LED showed higher concentrations for chlorophylls *a*, *b*, total and carotenoids, being 1.03 mg g⁻¹, 0.43 mg g⁻¹, 1.47 mg g⁻¹ and 0.34 µg g⁻¹, respectively. The leaf anatomy showed that the leaves of the plants grown under blue, green and purple LEDs became thicker as well as the photosynthetic tissue and the epidermal cells of the adaxial face. The area of the vascular bundle in the central vein of the leaves was greater in the green and red LEDs. The stems showed larger diameters in the blue and purple LEDs and fluorescent lamps. Thus, we can conclude that the purple LED and conventional fluorescent lamps give similar results in the induction of sprouts

in the absence of growth regulators, however, in the purple LED the plants have greater fresh mass. Plants grown *in vitro* under a red LED have higher levels of photosynthetic pigments. In addition, plants grown on the blue, green and purple LEDs showed thicker leaves. As well as the plants grown on the purple LED and fluorescent lamps had thicker stems.

Keywords:

Campomanesia

Light spectrum

Myrtaceae

Photosynthetic pigments

Structural anatomy

1. Introdução

No Brasil, o gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) abriga aproximadamente 35 espécies catalogadas e a área de distribuição abrange diferentes biomas e suas distintas fitofisionomias (DUARTE *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA; COSTA; PROENÇA, 2020). Além disso, existem espécies desse gênero encontradas em solos brasileiros que podem ser definidas como plantas vulneráveis devido a sua localização em *hotspots* de biodiversidade, conforme a Lista Vermelha da União Internacional - IUCN (2020).

A situação de várias gabiobas, como são popularmente conhecidas as plantas do gênero *Campomanesia* (ALVES *et al.*, 2020), possuem o agravante de ainda não terem sido catalogadas e algumas, além de endêmicas, estão classificadas como ameaçadas de extinção ou vulneráveis (LUBER *et al.*, 2017; SANT'ANA *et al.*, 2018). O gênero em questão está ligado a vários benefícios para a saúde humana, não apenas pelo teor considerável de vitamina C e boa atividade antioxidante de seus frutos, mas estudos comprovam seu potencial para tratamento do trato urinário, diarreia, diabetes, colesterol dentre outras enfermidades, isso pode contribuir para que haja atividade predatória sob algumas espécies (ABREU *et al.*, 2020; DUARTE *et al.*, 2020; REGGINATO *et al.*, 2021; RODRIGUES; CARVALHO, 2008).

A espécie *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. ainda carece de algumas informações sobre sua biologia (estrutural, morfológica e anatômica) e química (óleo essencial e extrato de seus órgãos vegetativos e reprodutivos), tendo em vista que estudos sobre esse táxon ainda se encontram incipientes. Além disso, não há muitos dados na literatura sobre a planta (IUCN, 2020). A conservação da espécie, conhecida também como Casaqueira, pode ser feita com o uso de ferramentas como a cultura de tecidos vegetais, mais especificamente a micropropagação (SANT'ANA *et al.*, 2018).

O cultivo *in vitro* ou micropropagação é uma técnica que pode ajudar na viabilidade de mudas, quer seja para uso agrícola ou na conservação de genes e compreensão da variabilidade

genética. A importância dos protocolos de micropropagação é contundente para a manutenção das espécies, inclusive as florestais, e para uso consciente do seu material vegetal (FERRARI; GLOSSI; WENDLING, 2004; OLIVEIRA; DIAS; BRONDONI, 2013).

Devido à qualidade fitossanitária, elevada produção de mudas em menor espaço de tempo, demanda por menor espaço para sua instalação e a possibilidade de controlar o ambiente de cultivo através das técnicas da micropropagação, justifica-se o uso dessa ferramenta para espécies ameaçadas de extinção, ou mesmo para espécies endêmicas vulneráveis, pouco conhecidas cientificamente como a *C. rufa* que também possui potencial agrônomo e comercial (CARVALHO; VIDAL, 2003; CARVALHO *et al.*, 2011; SANT'ANA *et al.*, 2018).

Além disso, as técnicas da micropropagação permite o uso de vários tipos de explantes para fins de reprodução assexuada, tanto órgãos reprodutivos quanto vegetativos, além de células e tecidos. Frequentemente, são utilizadas as microestacas, as quais são segmentos internodais contendo duas gemas axilares com as folhas seccionadas ou não, para a multiplicação *in vitro*.

Para melhorar essas técnicas de micropropagação, nos últimos anos, a aplicação de Diodos Emissores de Luz ou LED's vem aumentando. Sabe-se que através da utilização desse tipo de fonte de luz é possível manipular o crescimento das plantas em laboratório ao invés de fazer intervenções com reguladores de crescimento, de acordo com Braga *et al.* (2009). Além disso, os LED's emitem baixa quantidade de calor e possuem elevada eficiência na geração de luz, a partir deles é possível escolher um comprimento de onda específico para a sala de crescimento e, conseqüentemente, para o cultivo *in vitro* (ROCHA *et al.*, 2010).

Mediante a importância dessa ferramenta biotecnológica que é a micropropagação e o estado de vulnerabilidade de conservação da *C. rufa*, objetivou-se avaliar o efeito da qualidade de luz no cultivo *in vitro* das plantas de *C. rufa* no âmbito biométrico, anatômico, bioquímico e fisiológico para assim, compreender seu crescimento, desenvolvimento e anatomia da *C. rufa* em relação a qualidade de luz.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

2.1 Cultivo *in vitro* de *Campomanesia rufa*

2.1.1 Efeito da qualidade de luz sobre microestacas e produção de pigmentos fotossintéticos

2.1.1.1 Material vegetal e cultivo *in vitro*

Plantas de *C. rufa*, pré-estabelecidas *in vitro*, foram selecionadas e multiplicadas para obtenção dos brotos. Microestacas, contendo duas gemas axilares, com aproximadamente 1 cm de comprimento e folhas excisadas foram utilizadas nos experimentos. O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) e 6,0 g L⁻¹ de ágar.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5, 8±0,1 antes da autoclavagem à 121°C e 1,2 atm de pressão por 20 minutos. Foram inoculados 5 explantes por frasco de vidro. Os frascos de vidro tinha capacidade para 250 mL contendo 60 mL de meio de cultura. Posteriormente, os frascos foram vedados com filme plástico.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos durante 90 dias em sala de crescimento a 25±2°C e fotoperíodo de 16 h, sob diferentes diodos emissores de luz (LED's) (TECNAL[®], Piracicaba, SP). Os espectros de luz monocromáticos e mistos utilizados foram amarelo, azul, vermelho, roxo (2,5 LED vermelho: 1 LED azul), branco, verde e lâmpadas fluorescentes convencionais (20W), caracterizando-se 7 tratamentos. O espectrômetro portátil SPECTRA PEN Z850, (Qubit Systems-Kingston, Ontario-USA) foi utilizado para medição dos espectros luminosos (Figura 1).

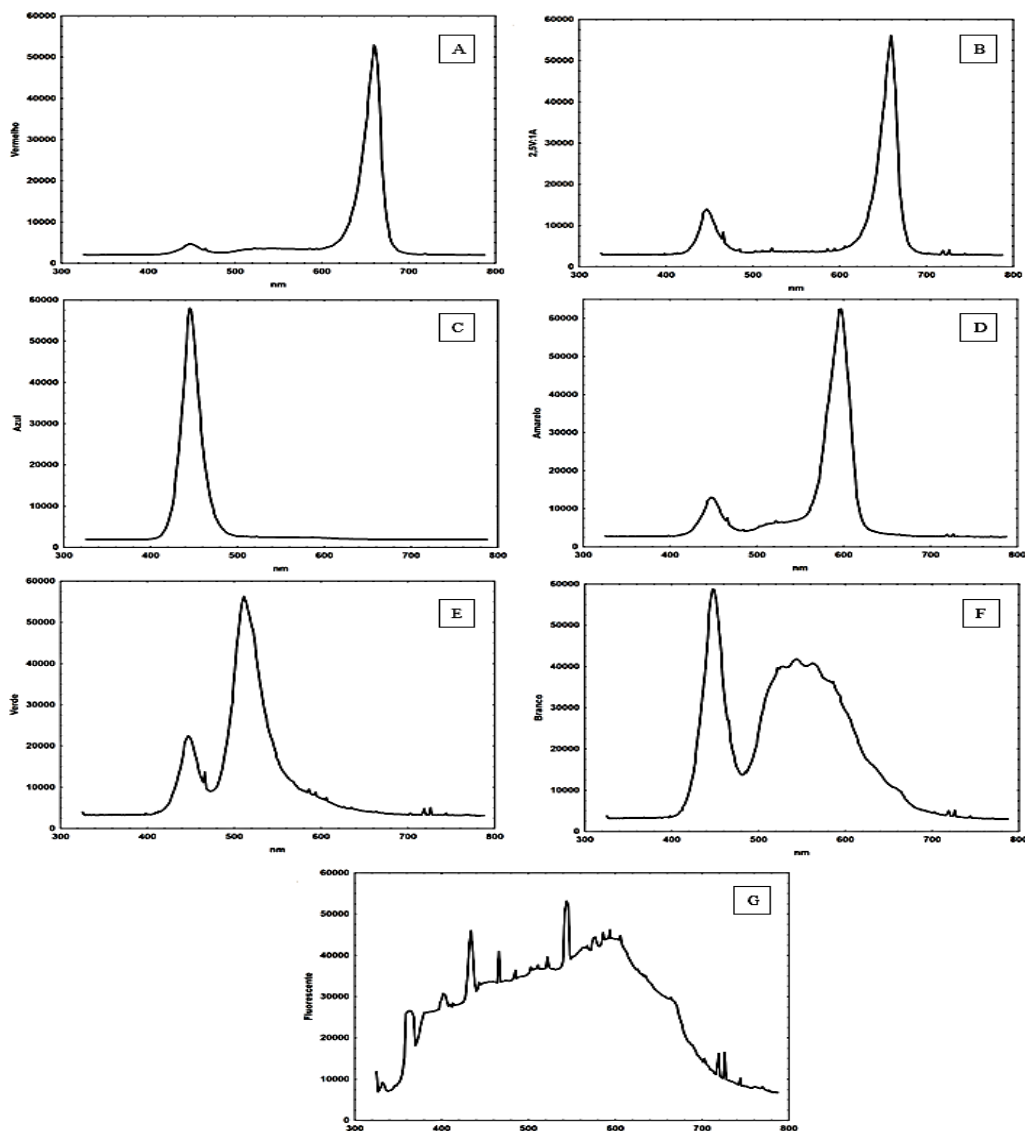


Fig. 1. Perfis espectrais das fontes de luz. LED Vermelho (A); 2,5 LED Vermelho:1LED Azul (B); LED Azul (C); LED Amarelo (D); LED Verde (E); Branco (F) e Lâmpada Fluorescente (G).

Os valores da Densidade de Fluxo Fotossinteticamente Ativa (DFFA) foram aferidos por meio do aparelho Pro Check + Par Photon Flux Sensor modelo QSO-S (Decagon Devices, Pullman Washington, USA). A média de fluxo de fótons estabelecida foi de $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para todos os tratamentos. Após 90 dias, foram avaliadas as análises biométricas: número de brotos, folhas e gemas, comprimento da parte aérea (cm) e massa fresca (g). O comprimento das plantas foi medido com o auxílio de uma régua de 30 centímetros. A massa fresca foi aferida em balança

analítica (CELTAC[®], modelo FA2104N) assim que as plantas foram retiradas dos frascos de vidro. No experimento, foram utilizadas 20 repetições por tratamento.

Na plataforma SisGen, o trabalho foi registrado sob o código A4BA5B0, em conformidade com a legislação vigente da Biodiversidade Brasileira nº. 13.123/2015.

2.1.1.2 Efeito da qualidade de luz sob os pigmentos fotossintéticos

Os teores de clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides foram avaliados aos 90 dias, segundo metodologia para extração e quantificação dos pigmentos de Scopel, Barbosa e Vieira (2011). Para isso, foram amostradas 0,015 g da massa fresca das folhas, homogeneizadas em 3 mL de acetona 80%. Após 24 h, as leituras foram realizadas em leitor de microplacas do tipo ELISA (Multiskan GO, versão ESW 1.01.12, Thermo Scientific[®]) com o auxílio de software (Skant software 5.0 for Microplate Readers RE versão 5.0.0.42). Os comprimentos de onda aplicados para realizar as leituras foram 663, 645, e 470 nm. A unidade para quantificar os pigmentos foi dada em $\text{mg}(\text{pigmento})/\text{g}(\text{matéria fresca})$. Três repetições por tratamento foram utilizadas. Os cálculos dos pigmentos foram feitos por meio das equações propostas por Li, Tang e Xu (2013). Foram analisados os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, razão entre clorofila *a*/ clorofila *b* e carotenoides.

2.1.1.3 Efeito da qualidade de luz sobre a anatomia foliar e caulinar

Após 90 dias em sala de crescimento, as folhas localizadas no terceiro segmento nodal a partir do ápice e segmentos caulinares da porção mediana foram selecionadas para a análise da anatomia foliar. As folhas e os segmentos caulinares foram fixados em solução FAA 70% (formaldeído + ácido acético + etanol 70%, nas proporções 0,5: 0,5: 9,0 v/v) por 72 h (JOHANSEN, 1940). Em seguida, esses materiais foram armazenados em etanol 70% (KRAUS & ARDUIN, 1997).

Posteriormente, os segmentos vegetais foram infiltrados (Folhas e Caule) em série alcoólica de 80, 90 e 100% por 2 horas em cada concentração, e emblocados em resina hidroxietilmetaacrilato (historesina) (Leica[®], Nussloch, Alemanha) conforme as instruções do fabricante. O material foi seccionado transversalmente em espessura de 7 µm em micrótomo rotatório automático (Yidy Medical, YD-355AT) e corados com Azul de Toluidina O (pH = 4,7) (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964). Para finalizar as lâminas, o material vegetal corado foi encoberto com verniz vitral incolor 500 Acrilex[®] (PAIVA *et al.*, 2006) e lamínula. As fotomicrografias foram capturadas em câmera (INFINITY1-2CB, Lumenera[®]) acoplada ao microscópio óptico vertical (Eclipse E100, Nikon[®]), o software utilizado para auxiliar foi o Infinity Analyze (release 6.3, 2013, Lumenera[®]).

As medidas das estruturas vegetais (foliares e caulinares) foram realizadas a partir das fotomicrografias, com o software ImageJ (1.45s, National Institutes of Health, USA). Essas medidas foram realizadas a partir de cinco lâminas por tratamento, e em cada lâmina havia cinco cortes, e posteriormente calcularam-se as médias.

Foram analisadas nas folhas as espessuras do órgão, mesofilo, parênquima paliçádico e esponjoso, células da epiderme adaxial, diâmetros das cavidades secretoras e do lúmen, além da espessura do epitélio secretor. Além disso, também foram medidas a espessura da nervura central e a área do feixe vascular, e por fim, no caule foi medido o diâmetro.

2.1.7 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC). A análise estatística foi realizada no software Sisvar[®]. Foram aplicados a análise de variância e o teste de médias Scott-Knott para análises qualitativas e regressão para as análises quantitativas ($p < 0,05$) para avaliação dos dados (FERREIRA, 2014).

2.1.8 Análises de Correlação

Os cálculos dos coeficientes de correlação de Pearson foram realizados ao nível de significância de 5%, tanto para os tipos de fonte de luz (LED's ou Lâmpadas fluorescentes) quanto para as análises biométricas e pigmentos fotossintéticos. Para isso, utilizou-se a Versão Python 3.7.4 (2019). Para a compreensão dos coeficientes de correlação calculados entre as variáveis, foi utilizada a escala a seguir descrita por Mukaka (2012):

- 0,9 (positivo ou negativo) indica uma correlação muito forte;
- 0,7 a 0,9 (positivo ou negativo) indica uma correlação forte;
- 0,5 a 0,7 (positivo ou negativo) indica uma correlação moderada;
- 0,3 a 0,5 (positivo ou negativo) indica uma correlação fraca;
- 0 a 0,3 (positivo ou negativo) indica correlação desprezível.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito da qualidade de luz sobre microestacas

A qualidade de luz teve influência nas análises biométricas durante o cultivo *in vitro* de *C. rufa*. Diferença significativa foi observada na formação dos brotos em microestacas de *C. rufa*. Os explantes cultivados sob o LED roxo (Azul+Vermelho) apresentaram maior número de brotos (NB) (2,0) quando comparados aos demais tratamentos (Figuras 2A e 3). Segundo Stefano & Rosario (2003), a qualidade de luz pode afetar a regulação da dominância apical e, consequentemente, desencadear a proliferação, através das gemas axilares e pode interferir na origem de novas gemas axilares ao longo do eixo do caule em crescimento. Além disso, os autores reforçam que os espectros de luz do azul e vermelho juntos ou separados, possuem elevada influência sob a proliferação de brotos. Para Batista (2016), a absorção de luz nos

comprimentos de onda azul e vermelho pelos vegetais aumenta o número de brotos e outras características biométricas, além de levar as plântulas a distintos padrões de desenvolvimento.

O número de folhas (NF) também apresentou diferença significativa entre os tratamentos, sendo os maiores valores observados nas lâmpadas fluorescentes (7,55) e no LED roxo (7,06) (Figuras 2B e 3A). Da mesma forma, para o número de gemas (NG), os melhores tratamentos foram aqueles cujas plantas foram cultivadas no LED roxo (6,24) e nas lâmpadas fluorescentes (7,01) (Figuras 2C, 3A e 3B). Resultados semelhantes foram encontrados por Centofante *et al.* (2019) ao cultivarem plantas de *C. pubescens* (DC.) Berg. sob distintos espectros de luz fornecidos por diodos emissores de luz. Esses autores observaram que a combinação dos LEDs azul + vermelho (Roxo) e o LED branco, proporcionaram plantas maiores e com números de folhas e gemas superiores às demais plantas cultivadas em outras faixas espectrais.

Os resultados para comprimento da parte aérea (CPA) dos brotos cultivados *in vitro* de *C. rufa* também foram significativos. As plantas cultivadas nas lâmpadas fluorescentes e nos LED's (branco, roxo e vermelho) foram as melhores, entretanto, não diferiram significativamente entre si e a maior média foi de 1,56 cm (Figuras 2D, 3A, 3B, 3C e 3D). Por outro lado, nos demais diodos emissores de luz (amarelo, verde e azul), as plantas apresentaram crescimento inferior e não houve diferença significativa entre eles (Figuras 2D, 3E, 3F e 3G).

Sarikhani & Sarikhani-Khorami (2021) obtiveram resultados semelhantes ao encontrado na espécie *C. rufa* em relação ao comprimento dos brotos ao analisarem a qualidade de luz na micropropagação do porta-enxerto de duas espécies lenhosas *Prunus persica* x *Prunus davidiana*. De acordo com os autores, explantes cultivados sob o LED misto (vermelho: azul) possibilitou a obtenção de brotos maiores, e isso pode ter ocorrido devido ao efeito conjunto entre os diferentes fotorreceptores. Além disso, regiões de crescimento possuem maiores

quantidades de fitocromo, que são encarregados pelo desenvolvimento do corpo vegetal (KERBAUY, 2013).

E por fim, também foi observada diferença significativa na massa fresca (MF) entre as plantas cultivadas sob os distintos espectros de luz fornecidos pelas lâmpadas LED's. O acúmulo de massa fresca foi maior nas plantas cultivadas sob o LED roxo (0,09 g) (Figura 1E).

Para a compreensão da relação da MF com as demais variáveis, foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson ($p < 0,05$). Os cálculos dos coeficientes contribuem para a compreensão dos efeitos diretos e indiretos sob a resposta ou variável de interesse, a partir de um grupo de variáveis. Além disso, a correlação de Pearson indica o grau de dependência entre duas variáveis e apresentam variação de -1 a 1 (THIESEN *et al.*, 2017). Os tipos de fonte de luz (LED's ou Lâmpadas Fluorescentes) e as variáveis biométricas (MF, CPA, NB e NG), foram as fontes dos dados utilizados para realizar o cálculo dos respectivos coeficientes de correlação (Figura 4 A-G).

Ao analisar MF e NB, foram observados coeficientes de correlação positivos. O LED verde (Figura 4G) teve correlação forte entre essas duas variáveis e o LED roxo (Figura 4B) e a lâmpada fluorescente (Figura 4D) apresentaram coeficiente moderado. Por outro lado, o LED amarelo (Figura 4F) apresentou coeficiente de correlação fraco e os demais espectros fornecidos pelos outros LEDs tiveram coeficientes de correlação desprezíveis.

O NF e NG quando comparados individualmente em relação a MF nos distintos espectros de luz fornecidos pelos LED's, tiveram coeficientes de correlação semelhantes entre si, ou seja, eram positivos e variavam de fortes (LED's branco, amarelo e verde) (Figuras 4C, 4F e 4G) a moderados (LED's roxo, azul e vermelho) (Figuras 4A, 4B e 4E). Entretanto, a lâmpada fluorescente, apresentou correlação fraca entre o NF e MF e moderada entre o NG e MF.

E em relação ao CPA e MF, as plantas cultivadas *in vitro* utilizadas neste trabalho apresentaram coeficientes de correlação positivos e fortes nos diferentes espectros de luz fornecidos pelos LED's. Desta forma, pode-se inferir que a estrutura caulinar aumentou simultaneamente a massa fresca total. De outro modo, na lâmpada fluorescente, a correlação entre MF e CPA apresentou-se de forma positiva e moderada.

Chaves *et al.* (2020) mencionam '*trade-off*' em *Lippia filifolia* cultivadas *in vitro* como resposta as variáveis inversamente proporcionais ao analisar a correlação entre a distribuição da MF, NB, segmentos nodais e a altura da planta. Esse "conflito metabólico e fisiológico" entre crescer ou multiplicar suas estruturas vegetativas em *C. rufa* não ocorreu de acordo com a correlação de Pearson. Tendo em vista, que os coeficientes de correlação referentes a essas variáveis biométricas em sua maioria foram positivos e fortes, ou seja, maiores que 0,7, isso implica que na arquitetura vegetal das plantas cultivadas *in vitro* de *C. rufa* houve equivalência entre crescer e desenvolver dentro de cada espectro de luz.

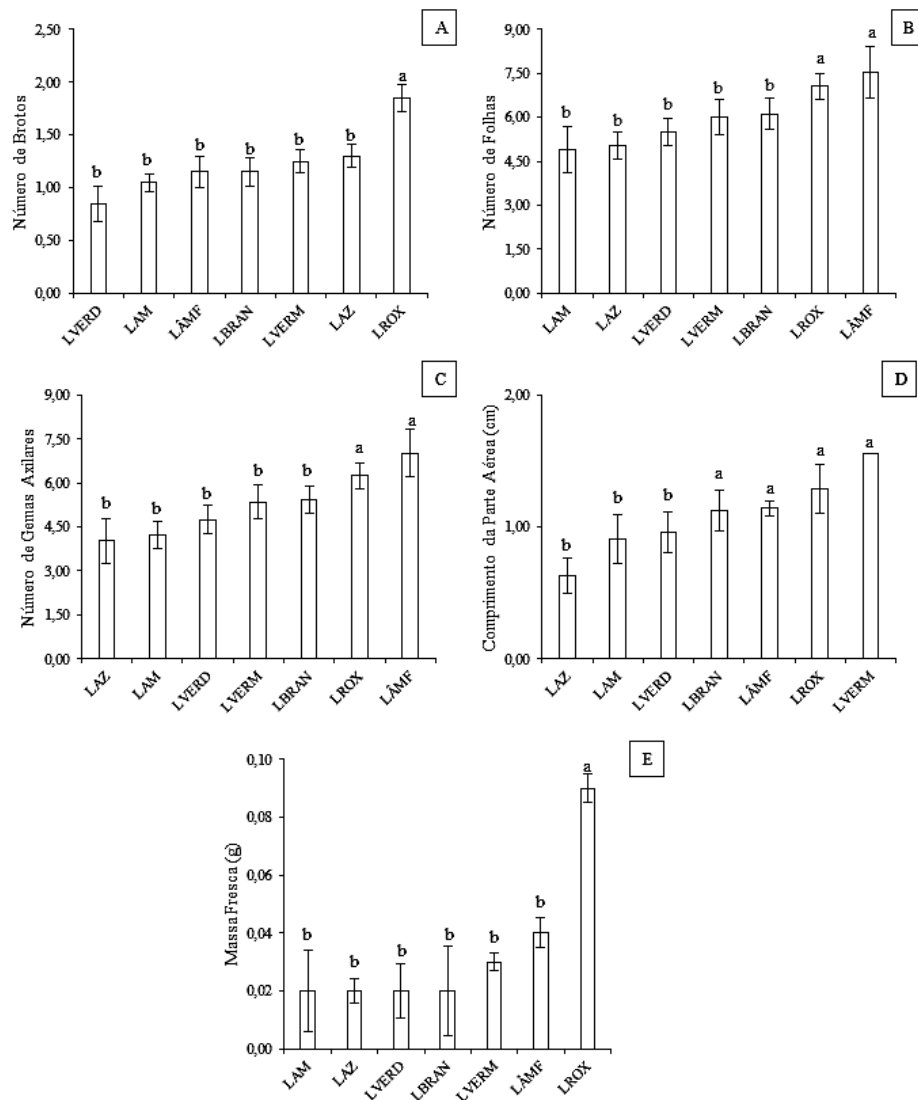


Fig. 2. Análises biométricas das plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro* sob diferentes fontes de luz: LED verde (LVERD); LED amarelo (LAM); Lâmpadas fluorescentes (LÂMF); LED branco (LBRAN); LED azul (LAZ); LED vermelho (LVERM); LED roxo (LROX). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a um nível de 5% de probabilidade.



Fig. 3. Plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas sob diferentes fontes de luz. Lâmpadas Fluorescentes (A); LED branco (B); LED roxo (C); LED vermelho (D); LED amarelo (E); LED verde (F); LED azul (G). Barra = 1 cm.

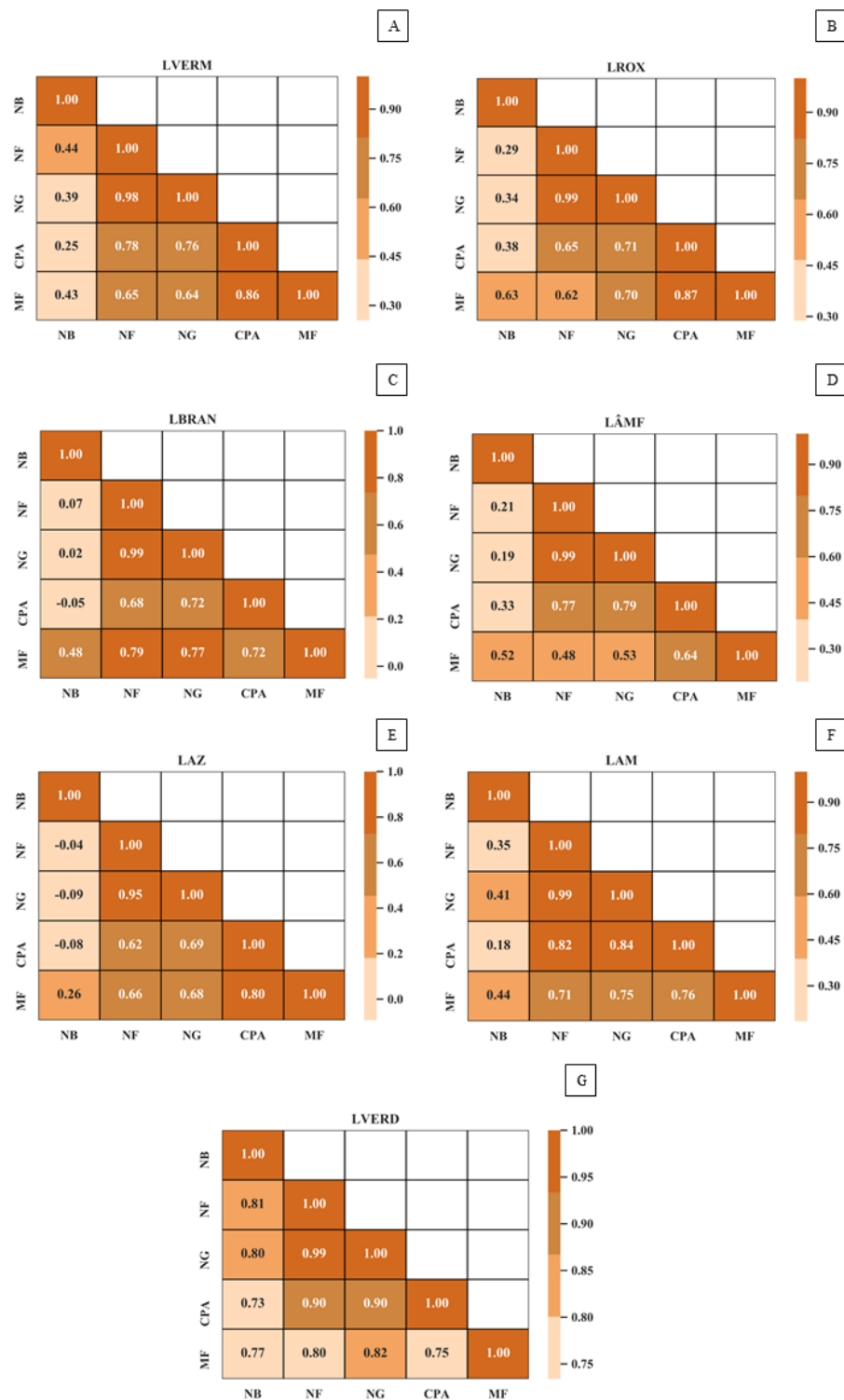


Fig. 4. Coeficientes de correlação de Pearson entre os diferentes tipos de fonte de luz e as variáveis biométricas das plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro*. LED vermelho (LVERM) (A); LED roxo (LROX) (B); LED branco (LBRAN) (C); Lâmpadas fluorescentes (LÂMF) (D); LED azul (LAZ) (E); LED amarelo (LAM) (F); LED verde (LVERD) (G).

3.2 Efeito da qualidade de luz sob os pigmentos fotossintéticos

Diferenças significativas foram observadas para os pigmentos fotossintéticos nas plantas de *C. rufa* cultivadas *in vitro* sobre diferentes condições da qualidade de luz (Fig. 5 e 6). As plantas cultivadas sob o LED vermelho monocromático apresentaram maiores valores de pigmentos fotossintéticos, com valores de 1,03 mg g⁻¹ de clorofila *a*, 0,43 mg g⁻¹ de clorofila *b*, 1,47 mg g⁻¹ de clorofila total e 0,34 µg g⁻¹ de carotenoides (Fig. 5A-C e 5E).

As plantas absorvem melhor o espectro da luz vermelha quando comparada a outros espectros luminosos, e isso ocorre devido a esse espectro ser próximo ao ápice de absorção pelos fitocromos e clorofilas. O espectro da luz azul, por exemplo, tem menor eficiência quântica da sua faixa espectral por ser absorvido tanto pelos flavonoides quanto carotenoides, o que não ocorre com o espectro da luz vermelha (ROCHA *et al.*, 2010; VICTÓRIO; KUSTER; LAGE, 2007).

Os teores de clorofila *a*, *b* e total das plantas cultivadas nos LEDs azul, roxo, verde, amarelo e branco e em lâmpadas fluorescentes não apresentaram diferença significativa. Entretanto, as plantas cultivadas nos LEDs branco e amarelo apresentaram valores maiores de carotenoides (0,22 µg g⁻¹) quando comparados aos demais LEDs e a lâmpada fluorescente, mas valores inferiores ao LED vermelho (0,34 µg g⁻¹) (Fig. 5E).

A razão entre clorofila *a* e clorofila *b* foi maior nos LED's roxo e branco, porém não houve diferença significativa entre eles, e a maior média foi 2,71. Os LED's verde e vermelho e lâmpada fluorescente não apresentaram diferença significativa entre si para a razão entre as clorofilas e a maior média foi 2,39. Os LED's amarelo e azul apresentaram as menores médias para a razão entre as clorofilas *a* e *b* (2,01) (Fig. 5D).

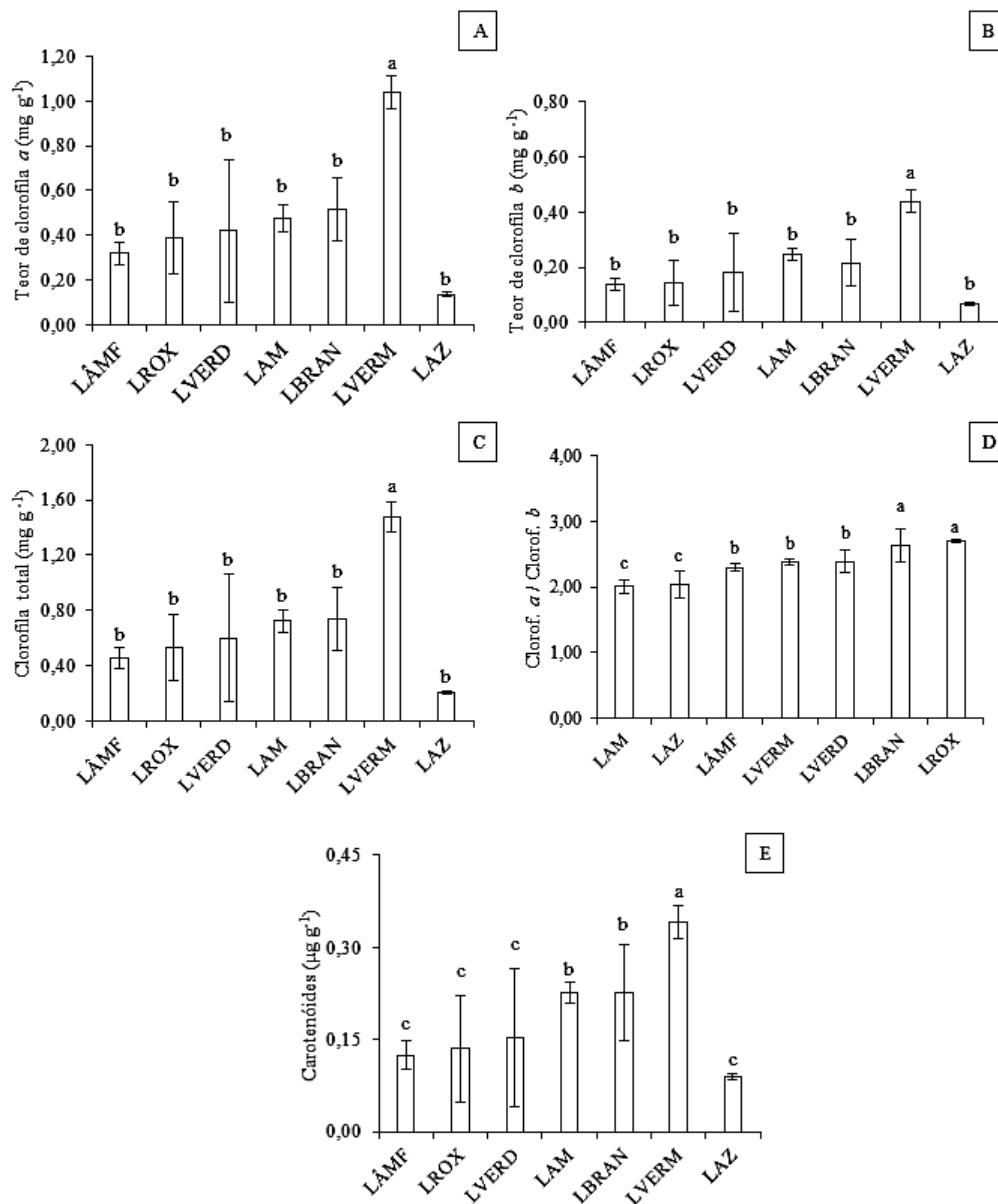


Fig. 5. Teor de clorofila *a* (A), *b* (B), total (C), razão entre as clorofilas *a* e *b* (D) e carotenoides (E) das plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas sob diferentes fontes de luz. LED verde (LVERD); LED amarelo (LAM); Lâmpadas fluorescentes (LÂMF); LED branco (LBRAN); LED azul (LAZ); LED roxo (LROX). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a um nível de 5% de probabilidade.

Os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para os tipos de clorofilas *a*, *b*, *a/b*, total e carotenoides dentro de cada tipo de qualidade de luz. De acordo com Thiesen *et al.* (2017), a aplicação da correlação de Pearson em estudos de pigmentos fotossintéticos contribui para compreender o grau de dependência entre essas moléculas e a associação delas com as adversas condições ambientais as quais as plantas são submetidas.

Nos LED's vermelho, roxo, branco, amarelo e lâmpada fluorescente, os coeficientes de correlação calculados para as clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides foram todos positivos e maiores ou iguais a 0,9, o que indica correlação muito forte. Dessa forma, à medida que um dos pigmentos aumenta o outro também se eleva, ou seja, de forma síncrona. Por outro lado, no LED azul, ao analisar o coeficiente de correlação entre o teor de clorofila *a* e *b*, observou-se correlação desprezível (0,18), ou seja, a relação entre ambos os pigmentos não é influenciada pelo espectro azul.

A clorofila *a* e a clorofila total ainda no LED azul tiveram um coeficiente de correlação muito forte, indicando que ambas aumentaram ao mesmo tempo. No entanto, a clorofila *a* em relação aos carotenoides tiveram coeficiente de correlação moderada. A clorofila *b* por sua vez apresentou coeficiente de correlação moderada com a clorofila total e muito forte com os carotenoides. Segundo Lima *et al.* (2011), a clorofila *b* é degradada de forma lenta quando comparada a clorofila *a*, e juntamente com os carotenoides captam energia da radiação fotossinteticamente ativa e a transferem para a clorofila *a*. Desta forma, contribui para que haja correlação forte entre ambas.

A razão entre as clorofilas *a* e *b* teve correlação muito forte e negativa entre as clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides nos LED's branco e amarelo. O LED roxo apresentou correlação forte e negativa entre essa razão e os demais pigmentos fotossintéticos. Sendo assim, a razão clorofila *a* e clorofila *b* diminui proporcionalmente em relação aos demais pigmentos nestes LED's (Fig.

6 B, C e F). A lâmpada fluorescente apresentou coeficientes de correlação negativos e mais baixos entre todos analisados para os pigmentos fotossintetizantes e razão entre as clorofilas *a* e *b*, denominados desprezíveis devido aos valores serem inferiores a 0,3 (Fig. 6 D).

No LED vermelho, os coeficientes de correlação foram negativos e moderados entre a razão clorofila *a* e *b* e os demais pigmentos. Entretanto, no LED azul foram observadas, em relação à razão clorofila *a* e clorofila *b*, as correlações fortes para clorofila *a*, moderada para clorofila *b*, fraca para clorofila total e desprezível para os carotenoides (Fig. 6 A e E).

A relação entre a razão clorofila *a* e clorofila *b* e os demais pigmentos fotossintéticos apresentou as seguintes correlações no LED verde: moderadas para clorofila *a* e total e fortes para clorofila total e carotenoides (Fig. 6 G).

A razão entre as clorofilas *a* e *b*, serve como indicativo sobre a fisiologia das plantas em relação a luz, pois, através dessa proporção é possível designar se as plantas são adaptadas a ambientes ensolarados ou sombreados. A qualidade dos espectros de luz e a quantidade dos pacotes de fótons que chegam à superfície do tecido foliar variam em ambos os habitats. Sendo assim, maiores valores da relação clorofila *a* e *b*, geralmente, são encontrados em plantas que ocorrem em áreas sombreadas (ALMEIDA *et al.*, 2005).

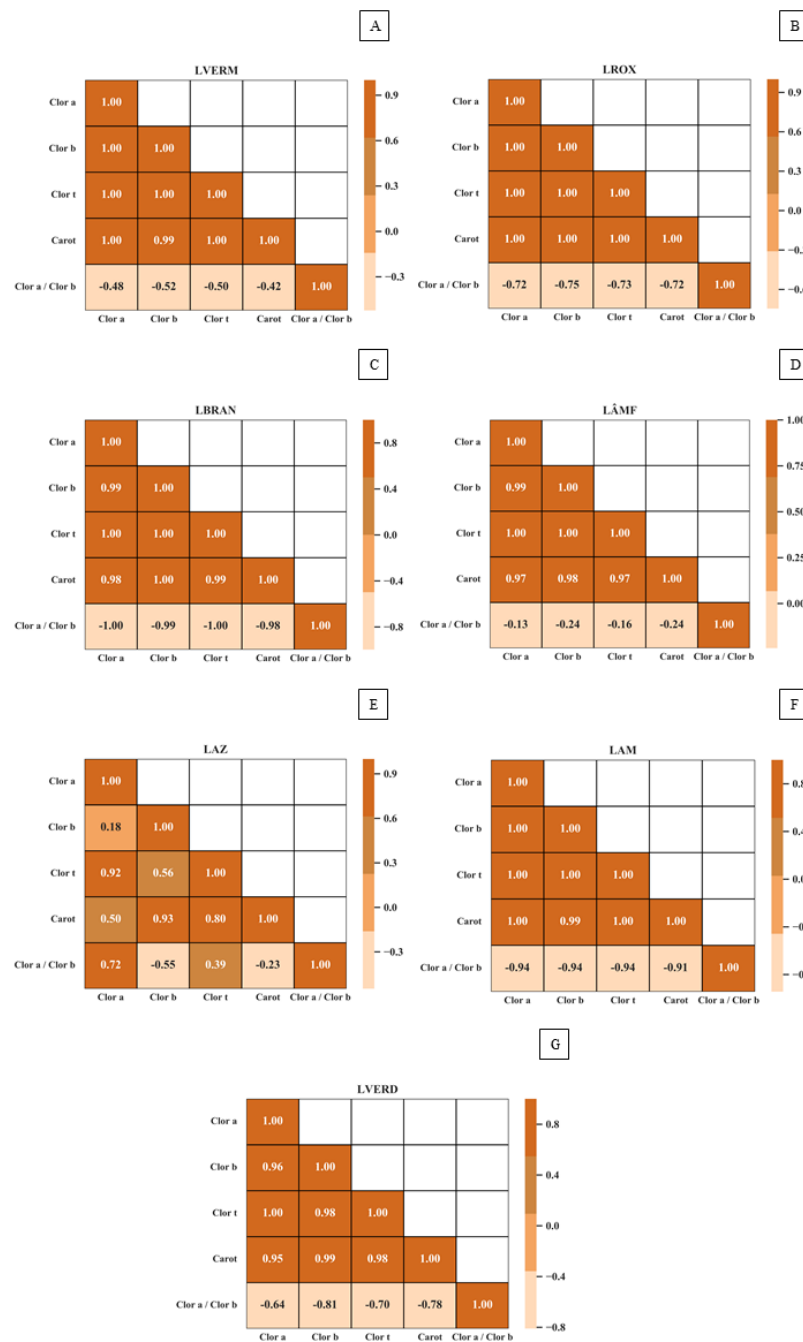


Fig. 6. Coeficientes de correlação de Pearson entre os diferentes tipos de fonte de luz e os diferentes pigmentos fotossintéticos das plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro*. LED vermelho (LVERM) (A); LED roxo (LROX) (B); LED branco (LBRAN) (C); Lâmpadas fluorescentes (LÂMF) (D); LED azul (LAZ) (E); LED amarelo (LAM) (F); LED verde (LVERD) (G).

3.3 Efeito da qualidade de luz sobre a anatomia foliar e caulinar

Os distintos espectros de luz fornecidos pelos LED's e lâmpada fluorescente alteraram significativamente os tecidos foliares das plantas de *C. rufa* cultivadas *in vitro*. Diferença significativa não foi observada entre os LED's azul, verde e roxo, os quais apresentaram as maiores médias de espessura da folha (81,76 μm), mesofilo (66,00 μm), parênquima paliçádico (PP) (33,97 μm) e esponjoso (PE) (35,26 μm), assim como para epiderme da face adaxial (CAD) (9,12 μm) quando comparados aos demais espectros de luz (Fig. 7 e 8). De acordo com Victorio, Tavares e Lage (2007), o espessamento das células da epiderme está intimamente ligado à proteção contra a inserção de radiação nos tecidos sensíveis do mesofilo foliar.

No mesofilo das folhas cultivadas sob as lâmpadas fluorescentes, foram observados grandes e numerosos espaços intercelulares entre ambos os parênquimas, por outro lado, nos LED's branco, amarelo, azul, vermelho, roxo e verde esses espaços eram menores e em menor quantidade em relação às lâmpadas fluorescentes (Fig. 8). As cavidades secretoras (CS) presentes no mesofilo não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos para diâmetro da CS (37,85 μm) e do lúmen (19,24 μm) e células do epitélio secretor (7,89 μm) (Fig. 9).

Em relação ao nível de diferenciação ou maturação celular, é possível observar nas células parenquimáticas dos tecidos clorofilianos (esponjoso e paliçádico) formatos bem definidos na lâmpada fluorescente e nos LEDs azul e vermelho (Fig. 8 A, D e E) quando comparado aos demais tipos de LEDs. Na lâmpada fluorescente, as células do PP são constituídas de células cilíndricas e, no LED azul, apresentam-se mais altas do que largas, por outro lado, as células desse mesmo tecido clorofiliano, no LED vermelho, apresentaram-se mais largas. Desta forma, podemos dizer que esses espectros luminosos tiveram influência na expansão das células durante a diferenciação celular. Ainda na Figura 8, é possível notar nas imagens, diferença na densidade de células dos tecidos parenquimáticos, o que leva a crer que

os diferentes comprimentos de ondas fornecidos pelos LED's tiveram efeito também na taxa de divisão celular desses tecidos vegetais.

De acordo com Dosseau *et al.* (2008), a plasticidade e a diferenciação nos tecidos foliares é crucial no processo de absorção de luz pelas plantas.

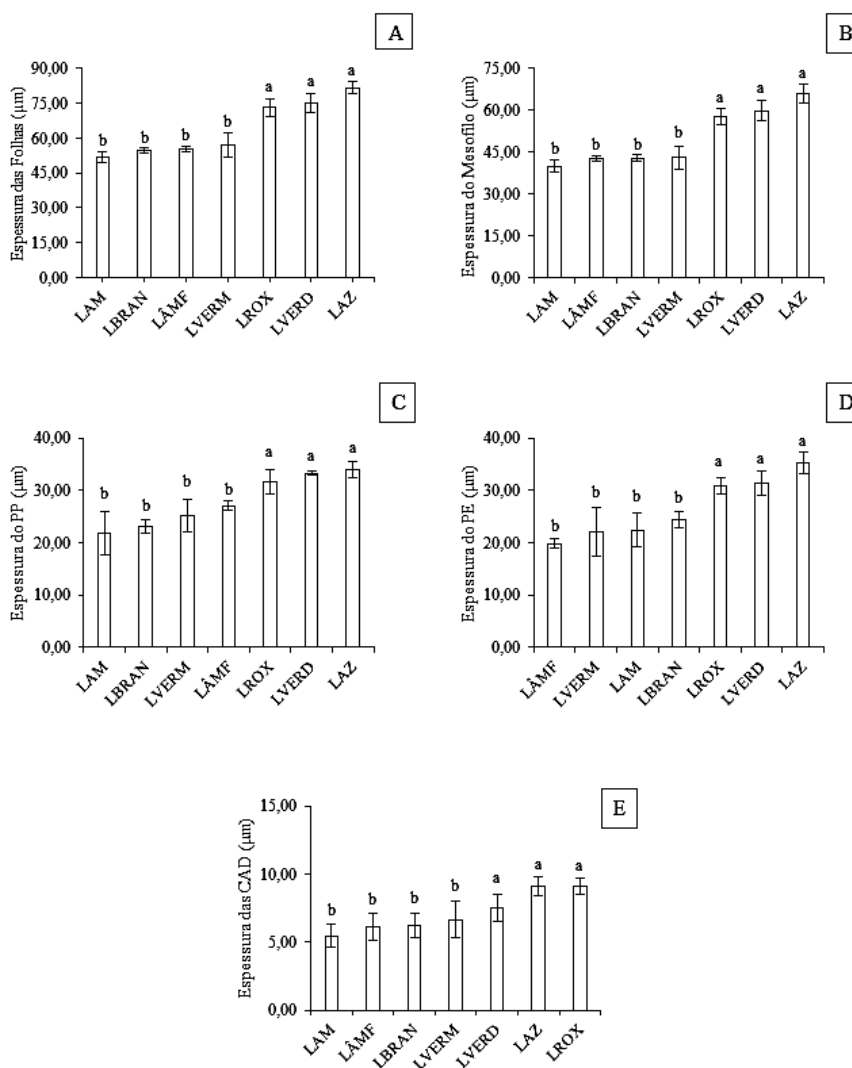


Fig. 7. Espessura das folhas (A), espessura do mesofilo (B), espessura do parênquima paliçádico (C), espessura do parênquima esponjoso (D) e da epiderme na face adaxial (E) de *Campomanesia rufa*. LED verde (LVERD); LED amarelo (LAM); Lâmpadas fluorescentes (LÂMF); LED branco (LBRAN); LED azul (LAZ); LED vermelho (LVERM); LED roxo (LROX). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a um nível de 5% de probabilidade.

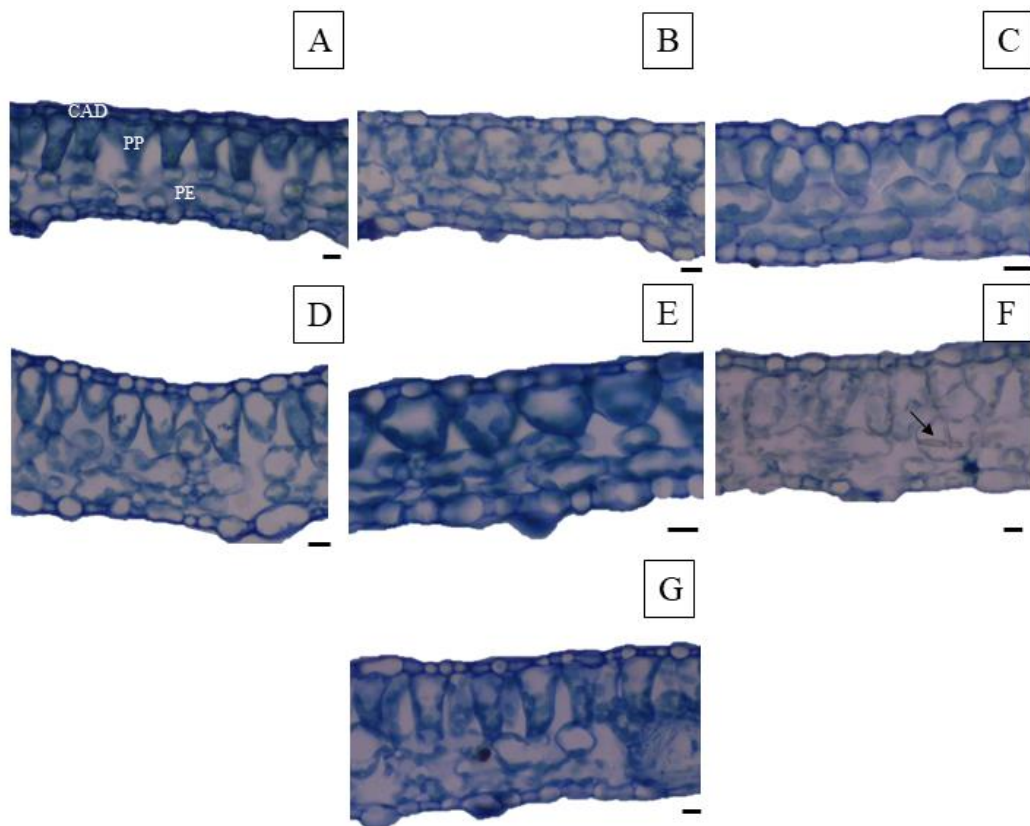


Fig. 8. Fotomicrografias do mesofilo de plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro* em diferentes espectros de luz. Lâmpada fluorescente (A); LED branco (B); LED amarelo (C); LED azul (D); LED vermelho (E); LED roxo (F); LED verde (G) e biomineralização (cristais) (seta). Barras: 10 μ m. Legenda: Células da epiderme adaxial (CAD), Parênquima paliçádico (PP) e Parênquima esponjoso (PE).

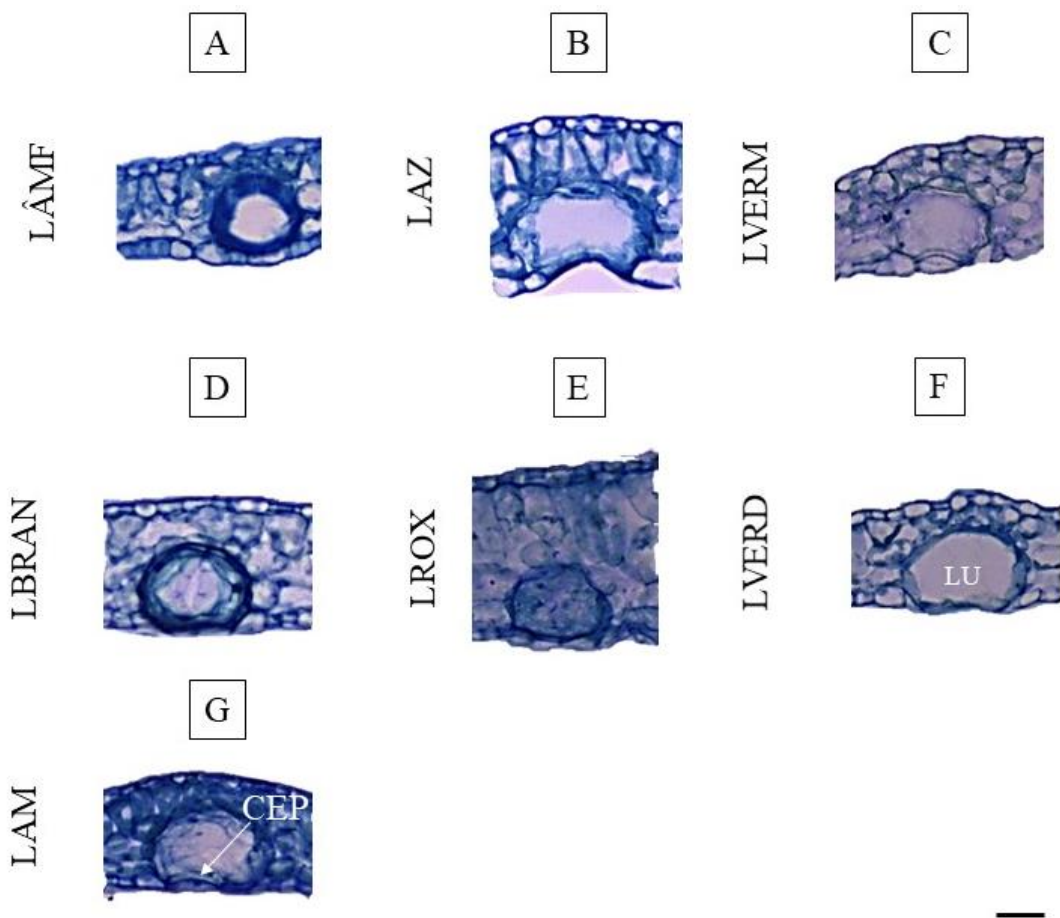


Fig. 9. Fotomicrografias das cavidades secretoras presentes no mesofilo das plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro* em diferentes espectros de luz. Lâmpada fluorescente (A); LED azul (B); LED vermelho (C); LED branco (D); LED roxo (E); LED verde (F); LED amarelo (G). Barra: 25 μ m. Legenda: Células do epitélio (CEP) e Lúmen (LU).

Nas plantas de *C. rufa* cultivadas sob o LED roxo destacaram-se estruturas semelhantes a cristais de oxalato de cálcio (COC) no interior das células, dispersos por todo o tecido foliar (mesofilo e nervura central) e ocorrendo de forma isolada ou em agregados cristalinos, no formato estiloide como descreve Oliveira & Akisue (2009) (Fig. 10 A e B). Esse processo de formação de cristais inorgânicos intra e extracelulares é denominado biomineralização de acordo com Gonzalez *et al.* (2009).

A biomineralização em folhas, pecíolos e caules de outras espécies do gênero *Campomanesia* é recorrente. De acordo com Arruda *et al.* (2013), a espécie *C. guazumifolia* apresenta cristais prismáticos no caule, *C. phaea* no pecíolo (ADATI, 2001), *C. guaviroba* no e *C. xanthocarpa* na região cortical da nervura central (SAIBERT; ROMAGNOLO; ALBIERO, 2018).

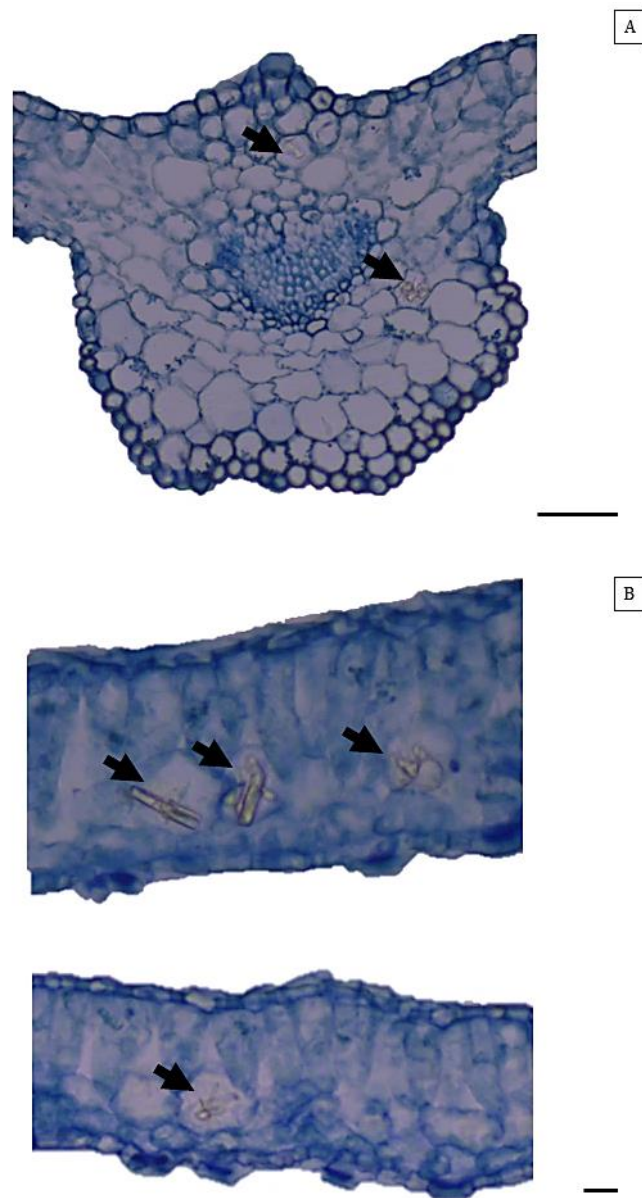


Fig. 10. Fotomicrografias da nervura central (A) e do mesofilo (B) de plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro* sob o LED roxo evidenciando estruturas semelhantes a cristais de oxalato de cálcio (setas). Barras: 25 μ m.

Segundo Volk et al. (2001), a síntese de cristais de oxalato de cálcio deriva do metabolismo vegetal e tem função de eliminar o excesso de cálcio nesses organismos. Além da eliminação desse elemento químico, outra função descrita é a proteção contra herbívoros, pois essas estruturas tornam os tecidos menos palatáveis aos insetos e outros animais. Plantas crescidas em solos pobres de nutrientes e pouco férteis também possuem elevada ocorrência dessas estruturas inorgânicas em seus tecidos foliares para evitar danos ou perda de suas folhas (AERTS & CHAPIN, 1999). Entretanto, há muitas funcionalidades atribuídas a formação de oxalato de cálcio nas plantas além de proteção contra herbívoros (GONZALEZ *et al.*, 2009). Essas estruturas podem atuar contra o excesso de deposição de cálcio intracelular e contribuir estruturalmente na esclerificação da parede celular (BRUBAKER; HONER, 1989; FINK, 1991).

Embora haja na literatura relatos de ocorrências de COC em outras espécies de *Campomanesia*, nenhum deles são relacionados à aplicação de distintos espectros de luz sob as plantas até o presente trabalho. Desta forma, outros estudos necessitam ser realizados para a compreensão da relação entre essas estruturas e a qualidade de luz em plantas cultivadas *in vitro*.

As plantas cultivadas sob os LED's roxo, vermelho e azul apresentaram maiores espessuras da nervura central (NC) (275,52 μm) quando comparados às plantas cultivadas sob outros espectros de luz (Fig. 11 A). Entretanto, as plantas cultivadas nos LED's vermelho e verde apresentaram maiores áreas dos feixes vasculares (7.194, 67 μm^2) (Figura 11B). Fatores abióticos relacionados ao meio ambiente, tais como, umidade, temperatura, precipitação, entre outros, interferem nas dimensões e arranjos dos vasos condutores (ALVES & ANGYALOSSY-ALFONSO, 2000). Essas alterações ocorrem para assegurar o transporte de seiva quando a planta está submetida a algum tipo de estresse (WERNER, 2014). Algumas plantas cultivadas

sob os LED's branco e amarelo apresentaram, na nervura central de suas folhas CS, medidas (diâmetro da CS, lúmen e células epiteliais secretoras) superiores àquelas encontradas em outras CS do próprio mesófilo dessas folhas, e até mesmo em relação a outras folhas de outros tratamentos (Fig. 12). As alterações nas CS ocasionadas por fatores abióticos como o espectro luminoso, não ocorrem apenas na composição do material secretado, mas também como modificações na formação e desenvolvimento, distribuição e morfologia dessas estruturas secretoras (EYLES *et al.*, 2004; LANGENHEIM, 2003; LIN *et al.*, 2001; ROSNER & HANRUP, 2004; RUSSIN *et al.*, 1988). Essas modificações desencadeadas pela luz podem ocorrer durante a ontogenia das folhas, ou até mesmo através de alterações no nível de expressão de alguns genes como forma de resposta própria aos espectros de luz, de acordo com Buarque (2013), neste caso fornecidos pelos LED's branco e amarelo.

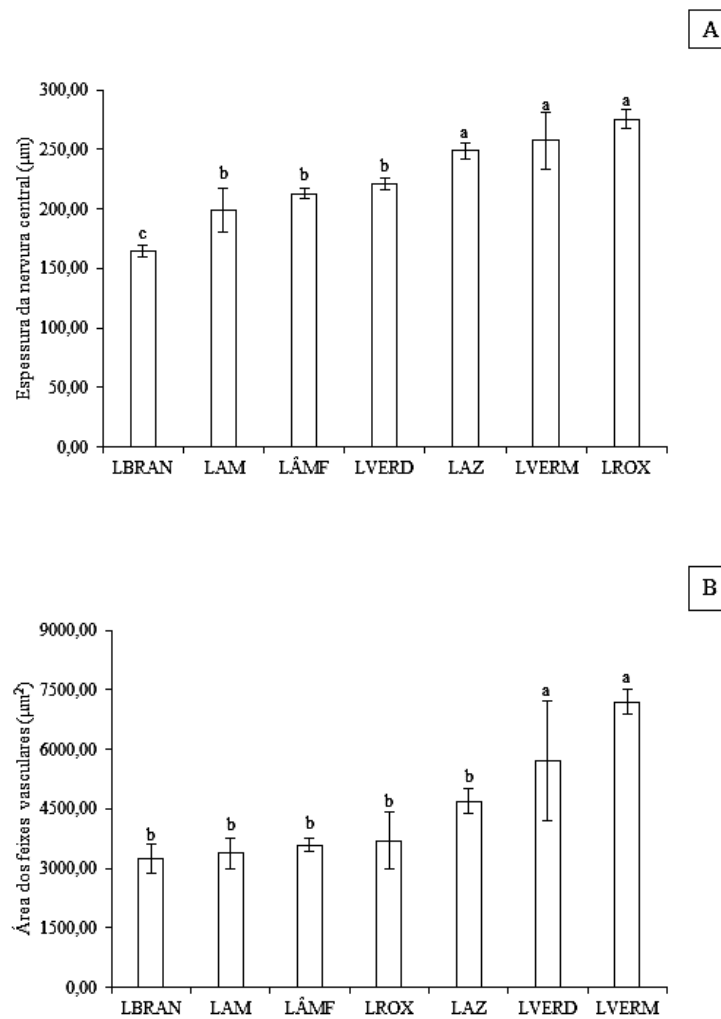


Fig. 11. Espessura (A) e área dos feixes vasculares (B) da nervura central das folhas de plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro*. LED Verde (LVERD); LED Amarelo (LAM); Lâmpadas Fluorescentes (LÂMF); LED Branco (LBRAN); LED Azul (LAZ); LED vermelho (LVERM); LED Roxo (LROX). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a um nível de 5% de probabilidade.

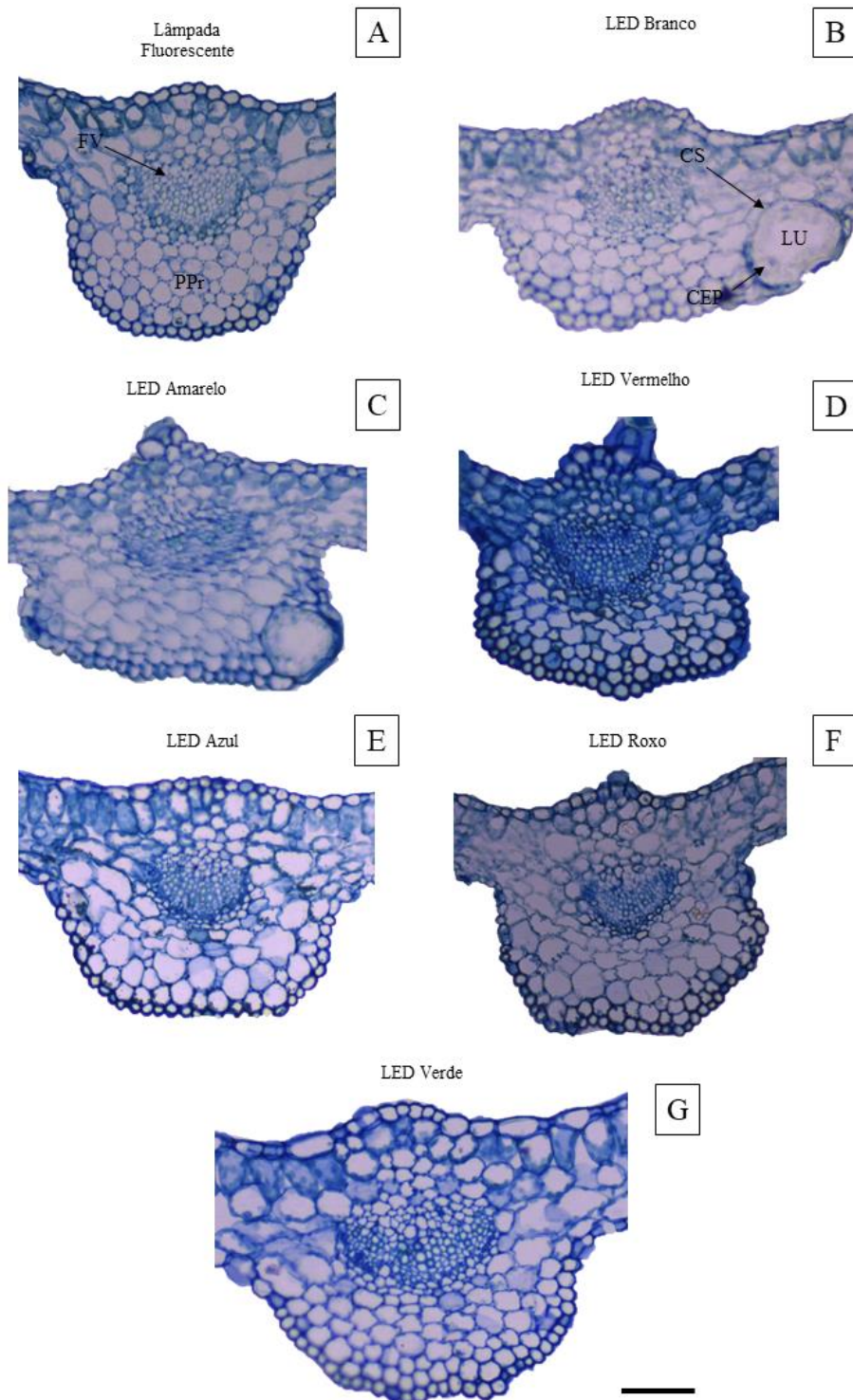


Fig. 12. Fotomicrografias das nervuras centrais das folhas de *Campomanesia rufa* cultivadas em diferentes espectros de luz. Barra: 50 µm. Legenda: Feixe vascular (FV), Parênquima de preenchimento (PPr), Cavidade secretora (CS), Células do epitélio secretor (CEP) e Lúmen (LU).

Diferença significativa foi observada nos caules das plantas cultivadas sob distintos espectros de luz. Os caules foram mais espessos nos LED's azul e roxo e em lâmpada fluorescente que nas plantas cultivadas em outras faixas espectrais (Fig. 13 e 14). Assim como nas folhas, as plantas de *C. rufa* cultivadas *in vitro* apresentaram CS também nos caules, entretanto, os diferentes espectros de luz não influenciaram no diâmetro dessas estruturas, apresentando em média 55,22 μm (Fig. 14).

Desta forma, os distintos níveis de percepção da luz próximo aos comprimentos de onda entre 400-500 nm (fornecidos pelos LED's aAzul e Branco e a lâmpada fluorescente) pelos criptocromos das células das plantas cultivadas *in vitro* podem ter alterado a expressão gênica dessas plantas e, conseqüentemente, refletiu na morfogênese dos caules, que por sua vez apresentaram diferentes espessuras quando submetidos a estes tratamentos.

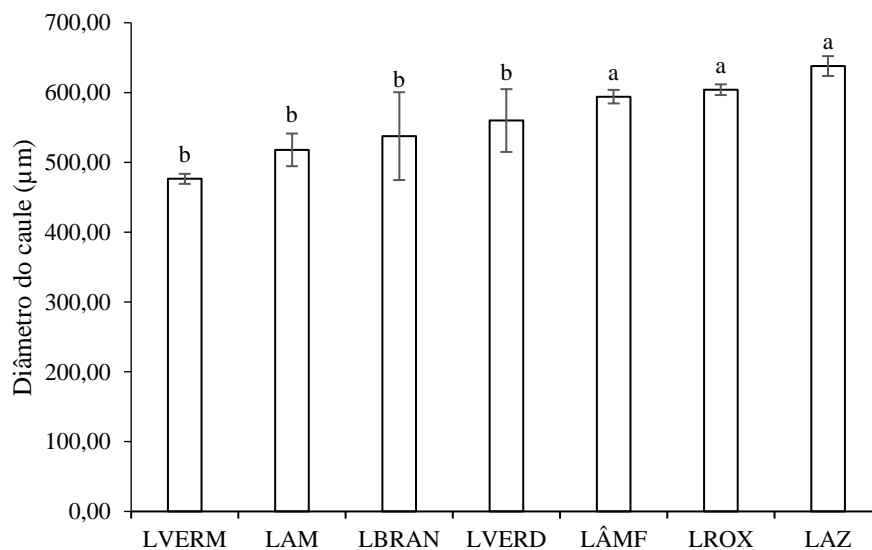


Fig. 13. Medidas do diâmetro dos caules das plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro* sob diferentes tipos de luz. Legenda: LED Verde (LVERD); LED Amarelo (LAM); Lâmpadas Fluorescentes (LÂMF); LED Branco (LBRAN); LED Azul (LAZ); LED vermelho (LVERM); LED Roxo (LROX). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a um nível de 5% de probabilidade.

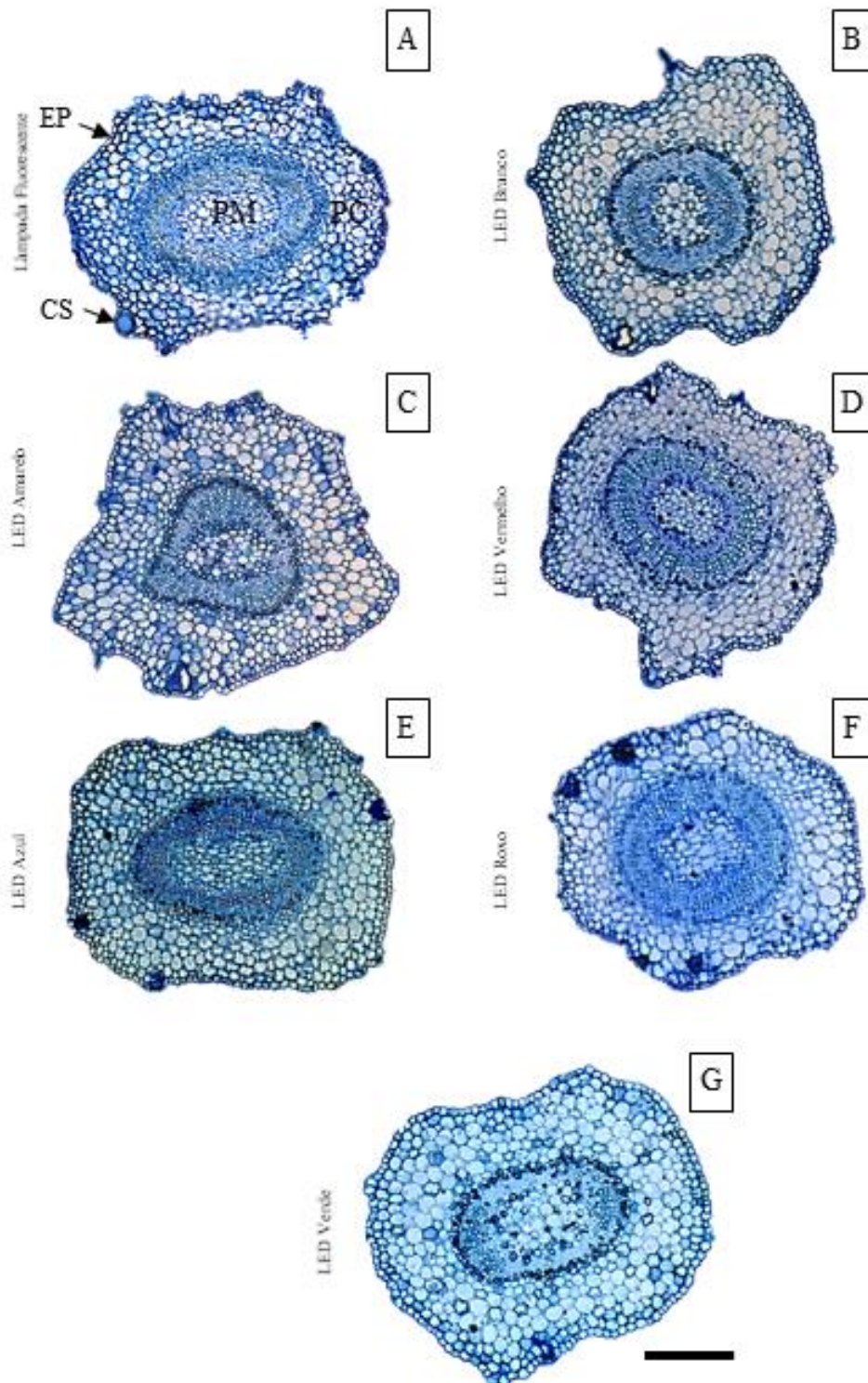


Fig. 14. Fotomicrografias dos caules de plantas de *C. rufa* cultivadas em diferentes espectros de luz. Barras: 50 μm . Legenda: Epiderme (EP), Parênquima cortical (PC), Parênquima Medular (PM) e Cavidade secretora (CS).

4. CONCLUSÕES

As plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro* apresentaram maiores valores para número de brotos (NB) e massa fresca no LED roxo. Em relação ao número de folhas (NF) e gemas (NG), as plantas cultivadas no LED roxo quanto na lâmpada fluorescente apresentaram resultados satisfatórios.

Além disso, através da anatomia foi possível observar que as plantas que foram cultivadas sob LED's azul, verde e roxo apresentaram folhas mais espessas.

Em relação à espessura dos caules, as plantas cultivadas sob os LED's roxo e azul e lâmpadas fluorescentes apresentaram maiores espessuras para o caule.

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, plantas cultivadas sob o LED vermelho apresentaram maiores valores.

REFERÊNCIAS

- Abreu, L.A.F., Paiva, R., Mosqueira, J.G.A., Reis, M.V., Araújo, A.B., Boas, E.V.B.V. 2020. Antioxidant activity and physico-chemical analysis of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. fruits. *Agricultural Sciences*. 44, 1-11. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202044016720>.
- Adati, R.T. 2001. Estudo Biofarmacognóstico *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. Myrtaceae. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Aerts, R.; Chapin III, F. S. 1999. The Mineral Nutrition of Wild Plants revisited: Re-evaluation of processes and Patterns. *Advances in Ecological Research*. 30, 1-67. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60016-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60016-1).
- Almeida, S.M.Z., Soares, A.M., Castro, E.M., Vieira, C.V., Gajego, E.B. 2005. Alterações morfológicas e alocação de biomassa em plantas jovens de espécies florestais sob diferentes condições de sombreamento. *Ciência Rural*. 35, 62-68. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000100010>.
- Alves, V.M., Silva, E.P., Silva, A.G.M., Asquiere, E.R., Damiani, C. 2020. Gabiroba e Murici: Estudo do valor nutricional e antinutricional da casca, polpa e semente. *Research, Society and Development*. 9, 1-20. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i5.3260>.
- Alves, E.S., Angyalossy-Alfonso, V. 2000. Ecological trends in the wood of some Brazilian species: growth rings and vessels. *IAWA Journal*. 21, 3-30. <https://doi.org/10.1163/22941932-90000233>.
- Arruda, M.F.C., Miguel, O.G. Stuelp-Campelo, P.M., Duarte, M.R. 2013. Leaf and Stem Morpho-Anatomy of *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. *Latin American Journal of Pharmacy*. 32, 1342-1348.

- Batista, T. R. 2016. Transformação genética de cana de açúcar e validação de genes de referência para avaliação de número de cópias inseridas por PCR em tempo real. 2016. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba. <https://doi:10.11606/T.11.2016.tde-03102016-182202>.
- Braga, F. T., Pasqual, M., Castro, E.M., Dignart, S.L., Biagiotti, G. Porto, J.M.P. 2009. Qualidade de luz no cultivo in vitro de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. *Ciência e Agrotecnologia*. 33, 502-508. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542009000200022>.
- Brubaker, C. L., Horner, H. T. 1989. Development of epidermal crystals in leaflets of *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae; Papilionoideae). *Canadian Journal of Botany*. 67, 1664-1670.
- Buarque, P.F.S.M. 2013. Influência da luz e temperatura em cavidades e canais secretores em plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae): estudo anatômico e ultraestrutural. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Carvalho, A. C. P. P., Torres, A.C., Braga, E.J.B., Lemos, E.e.p., Souza, F.V.D., Peters, J.A. Willadino, L. Câmara, T.R. 2011. Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant Cell Culture & Micropropagation*. 7.
- Carvalho, J. M. F. C., Vidal, M. S. 2003. Criopreservação no melhoramento vegetal. Campina Grande: Embrapa Algodão, 26p. (Boletim Técnico - Documentos, 115).
- Centofante, A.R., Neto, A.R., Filho, S.C.V., Oliveira, E.A., Assis, E.S., Rosa, M., Silva, F.G. 2019. Light quality on the morphoanatomy and physiology of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. Seedlings”. *Scientia Horticulturae*. 267, e-109083. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109083>.
- Chaves, M. C., Freitas, J.C.E., Nery, F.C., Paiva, R., Prudente, D.O., Costa, B.G.P, Daubermann, A.G., Bernades, M.M., Grazul, R.M. 2020. Influence of colorful light-

- emitting diodes on growth, biochemistry, and production of volatile organic compounds in vitro of *Lippia filifolia* (Verbenaceae). *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 212. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112040>.
- Dousseau, S., Alvarenga, A.A., Castro, E.M., Soares, R.P., Emrich, E.B. Melo, L.A. 2008. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas in vitro, in vivo e durante a aclimatização. *Ciência e Agrotecnologia*. 32, 1694-1700. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000600002>.
- Duarte, L.S., Pereira, M.T.M., Pascoal, V.D.A.B., Pascoal, A.R.F. 2020. Campomanesia genus – a literature review of nonvolatile secondary metabolites, photochemistry popular use, biological activities and toxicology. *Eclética Química Journal*. 45, 12-22. <https://DOI: 10.26850/1678-4618eqj.v45.2.2020.p12-22>.
- Eyles, A., Davies, N.W., Mohammed, C.M. 2004. Traumatic oil glands induced by pruning in the wound-associated phloem of *Eucalyptus globules*: chemistry and histology. *Trees*. 18, 204-210. <https://doi.org/10.1007/s00468-003-0297-4>.
- Ferrari, M. P., Grossi, F., Wendling, I. 2004. Propagação vegetativa de espécies florestais. Colombo, PR: Embrapa Florestas, (Série-Documentos, 94).
- Ferreira, D. F. 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*. 38, 109-112.
- Fink, S. 1991. Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in spruce needles and their possible relationships to the impact of pollutants. *New Phytologist*. 119, 41-51. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb01006.x>.
- Gonzalez, J. A. Z., Costa, M.D., Silva, I.R., Neves, J.C.L., Barros, N.F., Borges, A.C. 2009. Acúmulo de ácido oxálico e cristais de cálcio em ectomicorrizas de eucalipto.: II- formação de cristais de oxalato de cálcio induzida por fungos ectomicorrízicos em

raízes laterais finas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 33, 555-562.

<https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000300008>.

IUCN, 2020. <https://www.iucnredlist.org/search?taxonomies=114692&searchType=species>
(acessado em 20 de junho de 2020).

Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGrawHill.

Kerbauy, G.B. 2013. *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro: Gen, Guanabara Koogan. segunda ed.

Kraus, J. E.; Arduim, M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR,
Rio de Janeiro.

Langenheim, J.H., 2003. *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, ethnobotany*. Timber
Press: Cambridge.

Li, H., Tang, C.; Xu, Z. 2013. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus L.*) plantlet growth and morphogenesis in vitro. *Scientia Horticulturae*. 150, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.10.009>.

Lima, M.C. 2011. Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos em *Achillea millefolium L.* cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio. *Ciência Rural*. 41, 45-50. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000100008>.

Lin, J., Sampson, D.A., Ceulemans, R. 2001. The effect of crown position and tree age on resin-canal density in Scots pine (*Pinus sylvestris L.*) needles. *Canadian Journal of Botany*. 79, 1257-1261. <https://doi.org/10.1139/b01-108>.

Luber, J., Oliveira, M.I.U., Ferreira, M.F.S., Carrijo, T.T. 2017. Flora do Espírito Santo: *Campomanesia* (Myrtaceae). *Rodriguésia*. 68, 1767-1790. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768514>.

Mukaka M. M. 2012. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal: the journal of Medical Association of Malawi*. 24, 69–71.

- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- O'Brien, T. P, Feder, N, McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. 59, 368-373.
- Oliveira, F., Akisue, G. 2009. *Fundamentos de Farmacobotânica*. 3 ed. Atheneu. São Paulo. 228 p.
- Oliveira, L.S., Dias, P.C., Brondani, G.E. 2013. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira*. 33, 439-453.
<https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>.
- Oliveira, M. C., Santana, D. G., Santos, C. 2011. Biometria de frutos e sementes e emergência de plântulas de duas espécies frutíferas do gênero *Campomanesia*. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 33, 446-455. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011005000069>.
- Oliveira, M.I.U., Costa, I.R., Proença, C.E.B. 2020. *Campomanesia* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10307>. (acesso 19 março de 2021).
- Paiva, J.G.A., Fank-de-Carvalho, S.M., Magalhães, M.P., Graciano-Ribeiro, D. 2006. Verniz vitral incolor 500®: a mounting medium alternative and economically viable. *Acta Botanica Brasilica*. 20, 257-264. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000200002>.
- Regginato, A., Cunico, L., Bertonecello, K.T., Schindler, M.S.Z., Chitolina, R., Marins, K., Zanatta, A.P., Calisto, J.F., Oliveira, J.V., Magro, J.D., Zanata, L. 2021. Antidiabetic and hypolipidemic potential of *Campomanesia xanthocarpa* seed extract obtained by supercritical CO₂. *Brazilian Journal of Biology*. 81, 621-631.
<https://doi.org/10.1590/1519-6984.227388>.

- Rocha, P.S.G., Oliveira, R.P., Scivittaro, W.B., Santos, I. L. 2010. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação in vitro de morangueiro. *Ciência Rural*. 40, 1922-1928. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000900011>.
- Rodrigues, V. E. G., Carvalho, D. A. 2008. Florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. *Cerne*. 14, 93-112.
- Rosner, S., Hannrup, B. 2004. Resin canal traits relevant for constitutive resistance of Norway spruce against bark beetles: environmental and genetic variability. *Forest Ecology and Management*. 200, 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.06.025>.
- Russin, W.A., Uchytíl, T.F., Feistner, G., Durbin, R.D. 1988. Developmental changes in content of foliar secretory cavities of *Tagetes erecta* (Asteraceae). *American Journal of Botany*. 75, 1787-1793. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb11259.x>.
- Saibert, P.C.S., Romagnolo, M.B., Albiero, A.L.M. 2018. Comparação morfoanatômica de folhas de *Campomanesia xanthorcapa* O. Berg E *Campomanesia guaviroba* (DC.) Kiaersk. (Myrtaceae) como contribuição a farmacognosia. *Visão Acadêmica*. 19, 5-27. <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v19i3.60594>.
- Sant'Ana, C. R. O., Paiva, R., Reis, M.V., Silva, D.P.C., Silva, L.C. 2018. Propagação in vitro de *Campomanesia rufa*: Uma espécie frutífera em extinção. *Ciência e Agrotecnologia*. 42, 372-380. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018424011018>.
- Sarikhani, H., Sarikhani-Khorami, H. 2021. Effect of Light Quality on Micropropagation and Some Morphological Properties of Cadaman Avimag (*Prunus persica* x *P. davidiana*) Rootstock. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 8, 51-65. <http://dx.doi.org/10.22059/IJHST.2020.298841.351>.
- Scopel, W., Barbosa, J. Z., Vieira, M. L. 2011. Extração de pigmentos foliares em plantas de canola. *Unoesc & Ciência – ACET*. 2, 87-94.

- Stefano, M., Rosario, M. 2003. Effects of Light Quality on Micropropagation of Woody Species. *In*: Jain, S.M., Ishii, K. (eds) Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Ciências Florestais. 75, 3-35. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0_1.
- Thiesen, L.A., Pinheiro, M.V.M., Holz, E. Fontana, D.C., Santos, J. 2017. Correlação de Pearson entre pigmentos fotossintetizantes e fitomassa de plantas de *Aloysia triphylla*. Journal of Environmental Analysis and Progress. 2, 249-257. <http://dx.doi.org/10.24221/jeap.2.3.2017.1450.249-257>.
- Victório, C.P., Tavares, E.S., Lage, C.L.S. 2007. Anatomia de plantas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. cultivadas in vitro sob diferentes qualidades de luz. Revista Brasileira de Biociências. 5, 216-218.
- Volk, G. M., Lynch-Holm V.J., Kostman, T.A., Goss, L.J., Franceschi, V.R. 2001. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. Plant Biology. 4, 34-45. <https://doi.org/10.1055/s-2002-20434>.
- Werner, E.T. 2014. Cultivo in vitro de *Crambe abyssinica* Hochst.: Germinação, micropropagação, estabilidade genética e anatomia foliar. Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.

ARTIGO 3 – MULTIPLICAÇÃO E RIZOGÊNESE *in vitro* DE *Campomanesia rufa* (O. BERG) NIED.

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Scientia Horticulturae* (ISSN:0304-4238) – versão preliminar

Cecília Ramos de Oliveira ^{a*}, Flávio Antônio Zagotta Vital ^a, Filipe Almendagna Rodrigues ^b, Arthur de Paula Metzker ^b, Moacir Pasqual ^b.

*autor para correspondência, endereço de e-mail: croliveirabot@gmail.com.

^a Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^b Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Highlights

- Indução de brotos em *Campomanesia rufa* com suplementação de citocininas
- Espermina no cultivo *in vitro* de *Campomanesia*
- Enraizamento de *Campomanesia rufa in vitro*

RESUMO

A multiplicação e o enraizamento *in vitro* de espécies do gênero *Campomanesia* são etapas dos protocolos de micropropagação consideradas críticas para pesquisadores da Cultura de Tecidos de Plantas. Para *Campomanesia rufa* (O. Berg.) Nied, existem alguns protocolos visando a etapa de multiplicação, entretanto, estudos da etapa de enraizamento *in vitro* são incipientes. Desta forma, objetivou-se com este trabalho otimizar protocolos já preexistentes para a etapa de multiplicação e elaborar um protocolo para o enraizamento das plantas cultivadas *in vitro*. Na etapa de multiplicação, três experimentos foram conduzidos, e as microestacas foram inoculadas em tubos de ensaios contendo meio de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS) em distintas condições em relação a presença dos reguladores de crescimento, porém, a fonte de carboidrato, agente antioxidante e solidificante foram iguais para todos. No primeiro experimento, as microestacas foram inoculadas no meio de cultura suplementado com 1 mg L⁻¹ do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e após a inoculação do explantes, uma parte deles foi mantida na ausência de luz e a outra parte na presença de luz, sendo esta dividida entre o LED misto (2,5 Vermelho: 1.0 Azul) e as Lâmpadas Fluorescentes. No segundo experimento, os explantes foram inoculados em meio MS com as citocininas BAP e 2-isopenteniladenina (2ip) conjuntamente, porém em diferentes concentrações de 2ip (1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹) com exceção do tratamento controle que foi utilizado apenas o BAP na concentração de 1 mg L⁻¹. No terceiro e último experimento desta etapa, aplicou-se ao meio MS diferentes concentrações da poliamina espermina (1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹). E por fim, na etapa do enraizamento, o meio de cultura escolhido foi o *Wood Plant Medium* (WPM) (LLOYD & MC COWN, 1980), que foi suplementado com diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), além do controle. As plantas cultivadas sob as lâmpadas fluorescentes e o LED roxo não apresentaram diferença significativa para a indução de brotos (3,53), número de folhas

(NF) (4,50) e gemas (NG) (5,46), aos 38 dias. Ao combinar as citocininas BAP e 2ip, o maior número de brotos aos 40 dias foi de 5,80 quando foi utilizado 2 mg L⁻¹ de 2-ip e 1 mg L⁻¹ de BAP. O uso da poliamina espermina apresentou baixa proliferação de brotos, entretanto, as variáveis biométricas NF e NG e comprimento da parte aérea apresentaram respectivamente os valores 6,26, 5,48 e 0,66 cm. A concentração de 4 mg L⁻¹ de AIB apresentou os melhores valores para percentual de enraizamento (37,5%), número de raízes/planta (9,75), comprimento radicular (1,23 cm) e massa fresca das raízes 0,02 g. Desta forma, conclui-se que a aplicação do regulador de crescimento BAP na concentração de 1,0 mg L⁻¹ ao meio de cultura e o uso do LED roxo ou lâmpadas fluorescentes apresentam resultados semelhantes na indução de brotos de *C.rufa*. O uso dos reguladores de crescimento BAP + 2ip é recomendado nas concentrações de 1,0 mg L⁻¹ + 2,0 mg L⁻¹, respectivamente, para a indução de brotos de *C. rufa*. A espermina não é aconselhável para multiplicar brotos, porém, ela eleva o NF e NG, e aumenta o comprimento dos brotos. O uso do AIB possibilitou o enraizamento *in vitro* de plantas de *C. rufa*, contudo, foi obtido baixo percentual de enraizamento.

Palavras-chave:

Citocininas combinadas

Espermina

Enraizamento

Multiplicação

Myrtaceae

ABSTRACT

The multiplication and rooting *in vitro* of species of the genus *Campomanesia* are stages of the micropropagation protocols considered critical for researchers of Plant Tissue Culture. For *Campomanesia rufa* (O. Berg.) Nied, there are some protocols aiming at the multiplication stage, however, studies of the *in vitro* rooting stage are incipient. Thus, the objective of this work was to optimize protocols that already exist for the multiplication stage and to elaborate a protocol for the rooting of plants grown *in vitro*. In the multiplication stage, three experiments were conducted, and the micropiles were inoculated in test tubes containing Murashige & Skoog (1962) (MS) culture medium under different conditions in relation to the presence of plant growth regulators, however, the source of carbohydrate, antioxidant and solidifying agent were the same for all. In the first experiment, the micropiles were inoculated in the culture medium supplemented with 1 mg L⁻¹ of the growth regulator 6-benzylaminopurine (BAP) and after the explants were inoculated, part of them were kept in the absence of light and the other part in the presence of light, which is divided between the mixed LED (2.5 Red: 1.0 Blue) and the Fluorescent Lamps. In the second experiment, the explants were inoculated in MS medium with the cytokinins BAP and 2-isopentenyladenine (2ip) together, but in different concentrations of 2ip (1, 2, 4 and 8 mg L⁻¹) except for the control treatment that was used only BAP in the concentration of 1 mg L⁻¹. In the third and last experiment of this stage, different concentrations of polyamine sperm (1, 2, 4 and 8 mg L⁻¹) were applied to the MS medium. Finally, in the rooting stage, the culture medium chosen was Wood Plant Medium (WPM) (LLOYD & MC COWN, 1980), which was supplemented with different concentrations of indolbutyric acid (IBA) (0.5; 1, 0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹), in addition to the control. Plants grown under fluorescent lamps and purple LED showed no significant difference for the induction of shoots (3.53), number of leaves (NL) (4.50) and buds (NB) (5.46), at 38 days. When combining

cytokinins BAP and 2ip, the largest number of shoots at 40 days was 5.80 when 2 mg L⁻¹ 2-ip and 1 mg L⁻¹ BAP were used. The use of sperm polyamine showed a low proliferation of shoots; however, the biometric variables NL and NB and length of the aerial part showed the values 6.26, 5.48 and 0.66 cm, respectively. The concentration of 4 mg L⁻¹ of IBA showed the best values for rooting percentage (37.5%), number of roots / plant (9.75), root length (1.23 cm) and fresh root weight 0.02 g. Thus, it is concluded that the application of the plant growth regulator BAP in the concentration of 1.0 mg L⁻¹ to the culture medium and the use of the purple LED or fluorescent lamps show similar results in the induction of shoots of *C.rufa*. The use of BAP + 2ip growth regulators is recommended at concentrations of 1.0 mg L⁻¹ + 2.0 mg L⁻¹, respectively, for the induction of *C. rufa* shoots. Spermine is not advisable to multiply shoots, however, it raises the NL and NB, and increases the length of the shoots. The use of IBA allowed the *in vitro* rooting of *C. rufa* plants, however, a low rooting percentage was obtained.

Keywords:

Combined cytokinins

Multiplication

Myrtaceae

Rooting

Spermine

1. Introdução

A família Myrtaceae Juss. é rica em espécies economicamente importantes devido seus frutos serem apreciados para consumo *in natura* ou para a indústria de alimentos. Algumas espécies também são utilizadas para arborização urbana, reflorestamento, além de diversas outras aplicações como nas indústrias farmacêuticas e cosméticas (COSMO *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2017).

Na família Myrtaceae, a *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. (*C. rufa*) é uma espécie frutífera e arbórea (SANT'ANA *et al.*, 2018). Os frutos possuem sabor adocicado, baixo teor calórico, são ricos em compostos fenólicos, carotenoides, ácido cítrico e vitamina C, porém, são produzidos anualmente (ABREU *et al.*, 2020). Devido ao seu potencial agrônomico, estudos na área de cultura de tecidos podem auxiliar para maior produção de mudas para comercialização dessa frutífera, além de contribuir para diminuir o impacto sobre a espécie pelo uso de forma não sustentável (OLIVEIRA, 2016).

A técnica de cultura de tecidos permite propagar espécies arbóreas ornamentais, florestais e até mesmo as cultivadas através dos protocolos de micropropagação. As plantas geradas a partir dessa técnica são ditas provenientes de propagação clonal que possuem procedência fitossanitária. No cultivo *in vitro* de plantas, como também é definida a micropropagação, é possível obter elevado número de mudas em curto espaço de tempo (JAGIELLO-KUBIEC, *et al.*, 2021).

Para se estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* de determinada espécie, alguns fatores precisam ser levados em consideração, dentre eles: meio de cultivo, tipo de explante, intensidade e qualidade da luz e reguladores de crescimento (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010).

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas aplicadas ao meio de cultura no intuito de promover efeitos similares aos fitorreguladores, que são substâncias naturais

sintetizadas pelas plantas. Através dessas substâncias sintéticas é possível regenerar plantas, pois ao serem absorvidas pelo tecido vegetal atuam em distintos níveis, tais como: sinalização e divisão celular, regulação de síntese proteica, inibição ou estímulo do crescimento de um determinado órgão (GOELZER *et al.*, 2019).

O BAP (6-Benzilaminopurina) e 2iP (N6-D2- isopentenil) são reguladores classificados como citocininas, responsáveis por estimular a divisão, diferenciação e alongamento celular e conseqüentemente contribuem para a indução de brotos em explantes como microestacas de plantas. As auxinas por sua vez, contribuem para o enraizamento além de outras funções dependendo da concentração utilizada. Nessa classe de reguladores de crescimento usualmente aplicadas em meio de cultura são mencionados o ácido 1-naftalenoacético (ANA), ácido indol-3-butírico (AIB) e ácido indolacético (AIA) (GOELZER *et al.*, 2019; TAIZ *et al.*, 2017).

Além dos reguladores de crescimento, outra maneira de tornar os protocolos de cultivo *in vitro* eficiente é usando o controle da qualidade de luz através do uso de diodos emissores de luz ou LED's. O uso de LED's tornou-se cada vez mais frequente em salas de crescimento vegetal nos laboratórios de cultura de tecidos. Essas fontes de luz com as tecnologias mais atuais são chips de lâmpadas que podem ter pico de luz entre 220 até 100 0nm, que permitem controlar a intensidade e comprimento de onda da luz, interferindo na morfogênese das plantas (LAZZARINI, *et al.*, 2017).

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo multiplicar microestacas de *C. rufa* com distintos reguladores de crescimento e fonte de luz e enraizar plantas provenientes do cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de auxina.

2. Material e Métodos

2.1 Indução de brotos em microestacas na ausência de luz, no LED roxo e na lâmpada fluorescente convencional

Microestacas (1 cm) de *C. rufa* foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura MS enriquecido com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, 0,4 g L⁻¹ de PVP e 1 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). Anteriormente à inoculação do explante, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8±0,1 e autoclavado à 121°C e 1,2 atm de pressão por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 h para aqueles que permaneceram sob as lâmpadas fluorescentes brancas (20W) (36 μmol m⁻² s⁻¹) e no LED roxo (42 μmol m⁻² s⁻¹), as demais plantas foram mantidas na ausência de luz (ROSSATO *et al.*, 2015; SANT'ANA *et al.*, 2018).

Aos 38 dias, foram avaliados o número e o comprimento (com auxílio de uma régua de 30 cm) dos brotos, número de gemas e folhas. O experimento foi composto por 15 repetições por tratamento.

2.2 Indução de brotos em microestacas a partir da combinação de duas citocininas

Microestacas (1 cm) com as folhas excisadas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 g L⁻¹ de PVP, 6 g L⁻¹ de ágar, 1 mg L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2ip) (1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹) além do controle sem o regulador de crescimento 2-ip apenas com BAP.

O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem à 121°C e 1,2 atm de pressão por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento à 25±2°C, fotoperíodo de 16 h e DFFA 36 μmol m⁻² s⁻¹.

Após 40 dias, número e comprimento dos brotos, número de gemas e folhas, presença de oxidação nos explantes e taxa de senescência das plantas foram avaliados por tratamento. Uma régua de 30 cm de comprimento foi utilizada para medir o comprimento dos brotos. Cada tratamento foi constituído por 17 repetições.

2.3 Espermina na proliferação de brotos e crescimento

Microestracas (segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento) foram inoculadas em tubos de ensaio sob 15 mL do meio MS enriquecido com 6 g L⁻¹ de ágar, 0,4 g L⁻¹ de PVP e 30 g L⁻¹ de sacarose. Distintas concentrações da poliamina espermina (1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹) foram acrescentadas ao meio de cultura além do controle com a ausência do regulador de crescimento.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 para posterior autoclavagem à 121°C e 1,2 atm de pressão por 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h à 25±2°C e DFFA 36 µmol m⁻² s⁻¹. Após 30 dias, o número de brotos, número de gemas, comprimento (com auxílio de uma régua de 30 cm) da parte aérea, porcentagem de oxidação, taxa de senescência e formação de calo na base do explante foram avaliados. Para cada tratamento foram utilizadas 20 repetições.

2.4 Enraizamento de plantas com diferentes concentrações de AIB

Plantas provenientes de cultivo *in vitro*, com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo dois segmentos nodais, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura *Wood Plant Medium* (WPM) (LLOYD & MC COWN, 1980) suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) além do controle. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8±0,1 e

autoclavado à 121°C e 1,2 atm de pressão por 20 minutos. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em sala de crescimento, à 25±2°C, DFFA 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h.

Após 120 dias, foram avaliadas porcentagem de formação, número, comprimento e massa fresca das raízes, além do número e comprimento dos brotos e a massa fresca da parte aérea. Os tratamentos foram compostos por 16 repetições.

2.5 Anatomia da raiz

Após os 120 dias para a ilustração da anatomia radicular, as raízes foram seccionadas na porção mediana para posteriormente serem fixadas em solução FAA 70% (formaldeído + ácido acético + etanol 70%, nas proporções 0,5: 0,5: 9,0 v/v) por 72 h (JOHANSEN, 1940). Em seguida, esses materiais foram armazenados em etanol 70% (KRAUS & ARDUIN, 1997).

Posteriormente, as raízes foram infiltradas em série alcoólica de 80, 90 e 100% por 2 horas em cada concentração, e emblocados em resina hidroxietilmetaclilato (historesina) (Leica[®], Nussloch, Alemanha). A espessura que os materiais foram seccionados foi de 7 μm em micrótomo rotatório automático (Yidy Medical, YD-355AT) e corados com Azul de Toluidina O (pH = 4,7) (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964). Na finalização do processo de confecção das lâminas, encobriu-se as raízes com verniz vitral incolor 500 Acrilex[®] (PAIVA *et al.*, 2006) e lamínula. As fotomicrografias foram capturadas em câmera (INFINITY1-2CB, Lumenera[®]) acoplada ao microscópio óptico vertical (Eclipse E100, Nikon[®]), o software utilizado para auxiliar foi o Infinity Analyze (release 6.3, 2013, Lumenera[®]).

2.6 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada no software Sisvar[®]. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC). Aplicou-se a análise de variância e o teste de médias Scott-

Knott para análises qualitativas e regressão para as análises quantitativas ($p < 0,05$) para avaliação dos dados (FERREIRA, 2014).

3. Resultados e Discussão

3.1 Indução de brotos em microestacas na ausência de luz, no LED roxo e na lâmpada fluorescente

A indução de brotos em *C. rufa* foi significativa entre as distintas fontes de luz (lâmpada fluorescente e LED roxo) e na ausência de luz quando utilizado $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP no meio de cultivo. Aos 38 dias, não houve diferença significativa na formação de brotos entre as plantas cultivadas na lâmpada fluorescente e no LED roxo, e a média observada foi de 3,53. Entretanto, houve diferença significativa para o número de brotos quando foram comparadas as plantas cultivadas sob alguma fonte de luz e na ausência de luz. No escuro, houve menor indução de brotos e a média de brotos foi de 1,50 (Figs. 1A e 2).

Resultados encontrados por Sant'Ana et al. (2018), para o número de brotos também em segmentos nodais de *C. rufa* cultivadas *in vitro*, diferiram dos encontrados neste trabalho, pois, os autores obtiveram diferença significativa entre os tratamentos aplicados entre os tipos de luz. Os tratamentos foram LED misto (70 vermelho: 30 azul) e lâmpada fluorescente, sendo o maior número de brotos (4,9) encontrados apenas no LED misto aos 90 dias. Essas diferenças na etapa de multiplicação *in vitro* de *C. rufa* em ambos os trabalhos, podem ter ocorrido devido ao tipo de explante usado, pois, naquele trabalho a gema apical permaneceu e neste foi excisada para induzir os brotos. Ao excisar o meristema apical houve o bloqueio da síntese de auxina endógena que contribuiu para maior proliferação dos brotos em menor tempo (38 dias), haja vista que a dominância apical pode ter influência total ou parcial sobre as gemas axilares e ao eliminá-la esse mecanismo é inibido (LALLANA & LALLANA, 2017).

As plantas cultivadas sob o LED roxo apresentaram maiores médias para o comprimento dos brotos (0,65 cm) quando comparadas às outras plantas cultivadas nos demais tratamentos (Figura 1 B).

Não houve diferença significativa para números de gemas e folhas entre a lâmpada fluorescente e LED roxo, sendo as maiores médias para as duas variáveis, 4,50 e 5,46, respectivamente. Por outro lado, houve diferença significativa quando foram comparadas as plantas provenientes do cultivo na lâmpada fluorescente e no LED roxo com as plantas que estavam na ausência de luz. No escuro, as médias de número de gemas e folhas foram respectivamente 1,85 e 1,98 (Figs. 1 C e D e Figs. 2 A-C).

A dualidade da ausência de luz combinada a condições limitadas de reservas de açúcares e disponibilidade de fonte de carbono via sacarose no meio de cultivo pode determinar forçadamente a condição mixotrófica em plantas cultivadas *in vitro*. A mixotrofia é uma estratégia nutricional que um organismo pode assumir caso tenha características auto e heterotrófica ao mesmo tempo. Assim sendo, as plantas cultivadas *in vitro* possuem a capacidade de realizar fotossíntese e fixar dióxido de carbono se as condições forem favoráveis ou podem assimilar compostos orgânicos através de outras vias (SILVA, 2004), como por exemplo, o meio de cultura.

As plantas cultivadas *in vitro* de *C. rufa* na ausência de luz e na presença de sacarose, além de aumentar e manter a síntese da aparelhagem fotossintética (proteínas e moléculas) para compor compartimentos próprios das células pertencentes aos tecidos parenquimáticos das brotações induzidas por BAP precisam regular seu potencial osmótico e fragmentar compostos orgânicos advindos do meio de cultura. Segundo Yassen *et al.* (2013), todas essas atividades de caráter morfofisiológico ocorrendo simultaneamente no interior do organismo vegetal requer um elevado custo energético, que implica negativamente na taxa de crescimento e

desenvolvimento, pois, inibe até mesmo o estiolamento que, fisiologicamente, ocorre em plantas sob condições de ausência de luz.

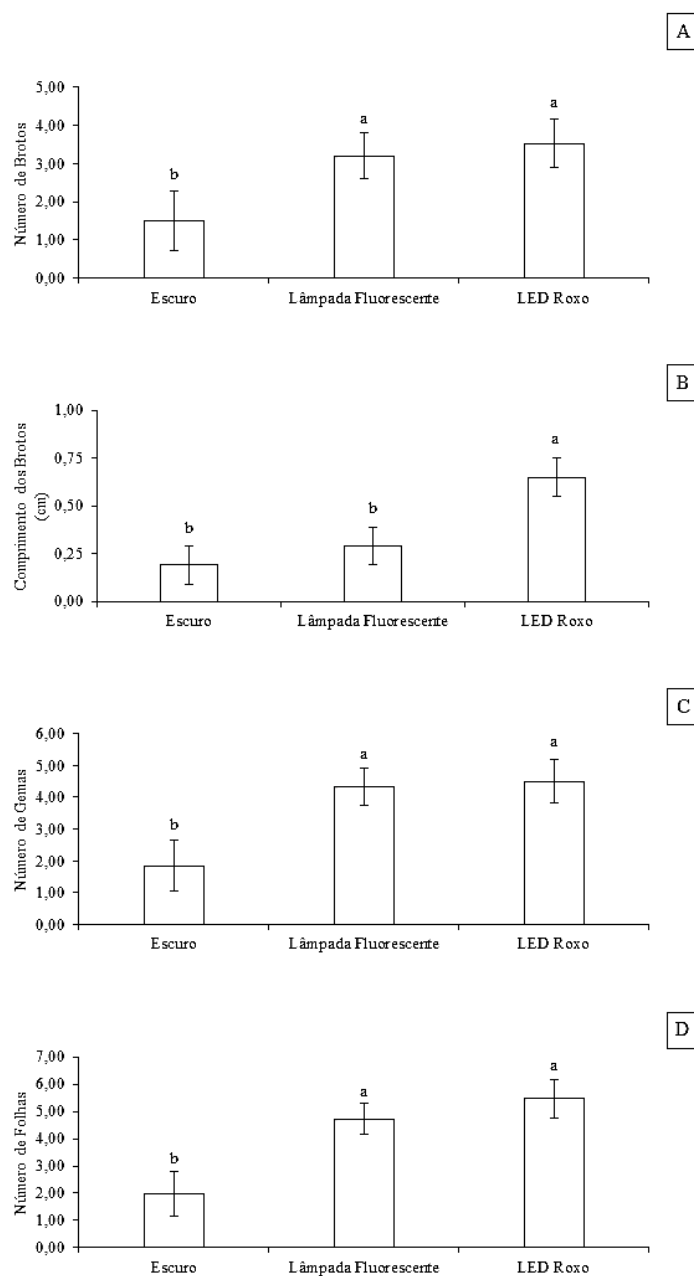


Fig. 1. Análises biométricas de plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro* sob diferentes fontes de luz (Lâmpadas fluorescente e LED roxo) e ausência de luz. Número de brotos (A), comprimento dos brotos (B), número de gemas (C) e número de folhas (D). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a um nível de 5% de probabilidade.



Fig. 2. Plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro* sob a ausência de luz (A), lâmpada fluorescente (B) e Led vermelho-roxoo (2:1). Barras: 1 cm.

3.2 Indução de brotos em microestacas a partir da combinação de duas citocininas

A indução de brotos em microestacas de *C. rufa* foi significativa quando utilizadas diferentes concentrações de 2-ip combinadas com 1 mg L⁻¹ de BAP aos 40 dias de cultivo. Melhor resultado para o número de brotos (5,80) foi na combinação de 2 mg L⁻¹ de 2-ip e 1 mg L⁻¹ de BAP (Fig. 3 A), as variáveis número de folhas e gemas não apresentaram diferença significativas, e a média geral foram, respectivamente, 5,61 e 5,00. Para Silva e Ferreira (2016), as citocininas são responsáveis pela formação de parte aérea, expansão celular e multiplicação no cultivo *in vitro*, além de outras funções.

Multiplicando a mesma espécie *in vitro*, Sant'Ana et al. (2018), após suplementarem o meio de cultura apenas com BAP (1,0 mg L⁻¹) após 90 dias, observaram média de 4,08 brotos.

O uso de duas citocininas sintéticas exógenas tais como o BAP acrescido de 2-ip no cultivo *in vitro* de *C. rufa* pode ser viável para a otimização do tempo de cultivo e maior produção de mudas.

Na mesma família da *C. rufa*, a submissão de explantes de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) a elevada concentração de BAP (200 mg L⁻¹), estimulou a divisão celular no parênquima cortical e no procâmbio em explantes, pois, foi observado a formação de meristemoides (ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES, 2006). Entretanto, os autores relataram plantas com hiperhidricidade, essa condição é responsável por desordens morfológicas e fisiológicas devido a elevada quantidade de água que passa a compor tecidos e células (PALMA *et al.*, 2011).

Nas plantas cultivadas *in vitro* de *C. rufa* em meio de cultura suplementado com 2-ip e BAP, não foram observados aspectos de hiperhidricidade, pois, o 2-ip apenas potencializou o efeito do BAP na indução de brotações e não foi desencadeada essa desordem fisiológica nas plantas. O 2-ip individualmente no meio de cultura é menos eficiente (LÉON, REINIGER e SILVA, 2020) se comparado ao BAP. Entretanto, na ausência do regulador de crescimento 2-ip e apenas na presença do BAP, os brotos tiveram maior comprimento (3,15 cm) (Figuras 3 B e 4 A-E). Já NF e NG não apresentaram diferenças significativas e as médias foram 5,61 e 5,00 respectivamente.

Em relação à presença de oxidação e à taxa de senescência nos explantes, não houve diferença significativa para ambas as variáveis dentro dos tratamentos, e a média geral foi de 4,25 e 0,07% respectivamente. A baixa taxa de senescência pode ser explicada pelo aumento dos níveis de citocininas nas plantas de *C. rufa* cultivadas *in vitro*, pois, algumas substâncias que retardam o crescimento em plantas cultivadas *in vitro*, elevam os níveis de citocininas nas plantas e em seguida reduz os níveis de etileno responsáveis pela senescência em vários órgãos vegetais, diminuindo assim a taxa de plantas senescentes (RADEMACHER, 2000). Além disso,

a suplementação do meio de cultura com o PVP também contribuiu para diminuir danos causados aos tecidos vegetais por oxidação de fenóis inerentes ao cultivo *in vitro*.

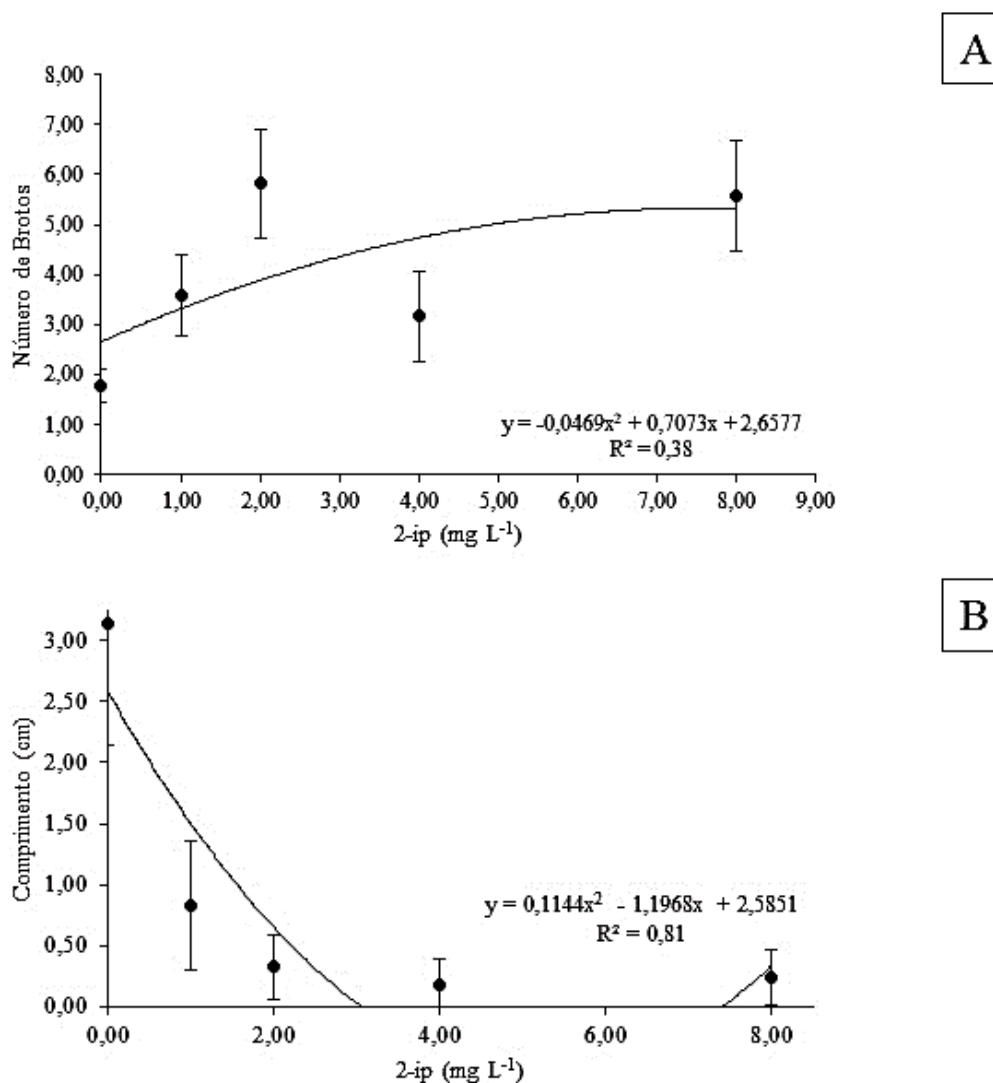


Fig. 3. Número (A) e comprimento (B) dos brotos em microestacas de *Campomanesia rufa* cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de 2-ip e 1 mg L⁻¹ de BAP.

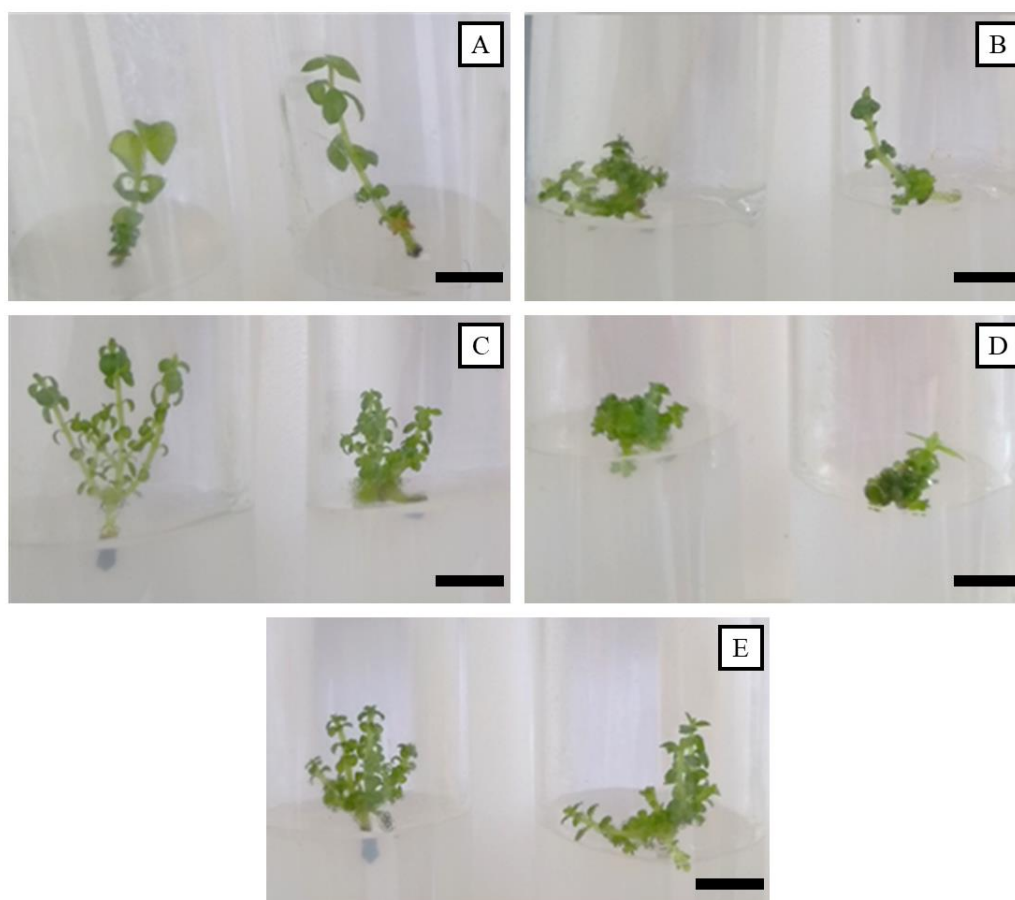


Fig. 4. Plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas em meio de cultura MS suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de 2-ip. 1 mg L⁻¹ de BAP + 0 mg L⁻¹ de 2-ip (A), 1 mg L⁻¹ de BAP + 1 mg L⁻¹ de 2-ip (B), 1 mg L⁻¹ de BAP + 2 mg L⁻¹ de 2-ip (C), 1 mg L⁻¹ de BAP + 4 mg L⁻¹ de 2-ip (D) e 1 mg L⁻¹ de BAP + 8 mg L⁻¹ de 2-ip (E). Barra: 1 cm.

3.3 Espermina na proliferação e crescimento

O número de brotos aos 30 dias não foi significativo e a média por microestacas foi de 1,42. Pinhal (2017) também não obteve resultados satisfatórios ao induzir brotos em *Campomanesia* spp. nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de espermina e outras poliaminas. Entretanto, o número de folhas, gemas e comprimento dos brotos diferiram entre si ao utilizar diferentes concentrações de espermina no cultivo *in vitro* de *C. rufa*, sendo os respectivos valores encontrados 6,26, 5,48 e 0,66 cm, ao utilizar a concentração de 8 mg L⁻¹ de espermina

na suplementação do meio de cultura (Fig. 5). Além disso, não houve diferença significativa para a porcentagem de oxidação e senescência. As médias gerais foram de 11,50% explantes oxidados e 0,22 senescentes, também não foi observada a formação de calos nas bases dos explantes. Debiasi, Fráguas e Lima (2007) ao utilizar distintos tipos de poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) no cultivo *in vitro* de calos no intuito de induzir a diferenciação de *Hemerocallis* sp., chegaram à conclusão que as poliaminas além de participar na diferenciação dos tecidos através da morfogênese também está ligada aos padrões oxidativos das células e tecidos. Os autores observaram que maiores números e comprimentos dos brotos diferenciados foram possíveis ao combinarem as demais poliaminas com a putrescina (10 µM de cada uma) ou utilizar apenas a putrescina isolada (10 µM).

Estudos realizados com Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) demonstraram que a aplicação de 0,1 mg L⁻¹ de espermina ao meio de cultura aumentou significativamente o número de folhas da espécie cultivada *in vitro*. De acordo com Bacilieri (2019), isso foi possível porque a aplicação exógena da espermina pode ter aumentado os níveis pré-existentes da substância nas plantas através do metabolismo das enzimas poliaminas sintetase e S-adenosilmetionina sintetase que ao acumular elevou o número desses órgãos vegetativos.

Segundo Francisco *et al.* (2008), a espermina é uma poliamina definida como polication que além de regular o processo de divisão celular, atribui-se também a ela as funções de diferenciação, estabilização da dupla hélice do DNA e morfogênese nas plantas. O processo de crescimento vegetal pode ser evidenciado após a aplicação exógena de poliaminas ao meio de cultivo que contribuiu para elevar as poliaminas endógenas promovendo o crescimento e o desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (GHABEL; KARAMIAN, 2020; MOGOR; LIMA; MOGOR, 2007; TASSONI *et al.*, 2000).

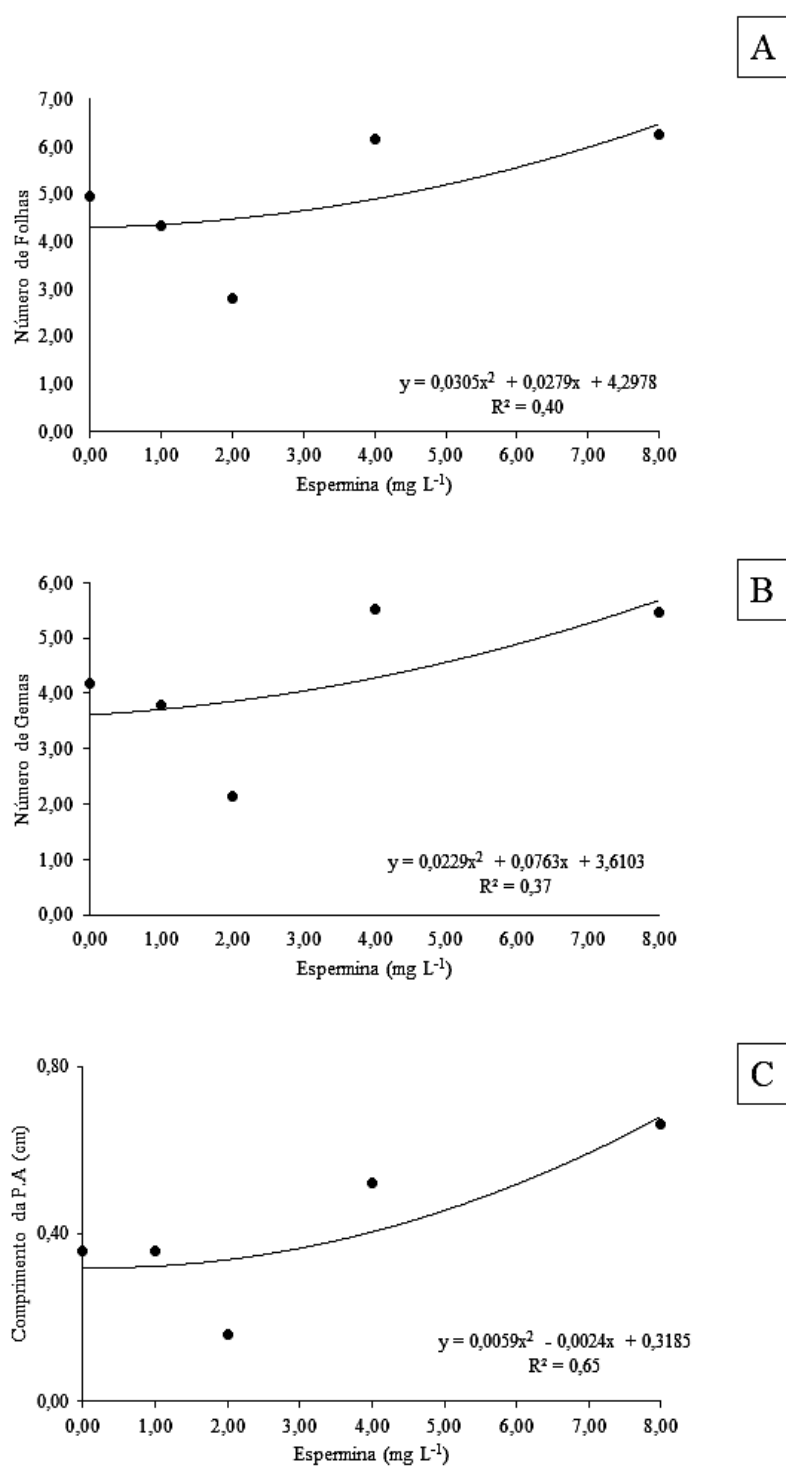


Fig. 5. Plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações da poliamina espermina. Número de folhas (A), número de gemas (B) e comprimento da parte aérea (C).

3.4 Enraizamento de plantas com diferentes concentrações de AIB

A formação de raízes foi significativa nas plantas de *C. rufa* cultivadas *in vitro* e submetidas a distintas concentrações de AIB no meio de cultura. Maior percentual de formação do sistema radicular ocorreu na concentração 4 mg L⁻¹ de AIB (Fig. 6). Nesta concentração, observou-se 37,5% de formação de raízes nas plantas de *C. rufa*, 9,75 raízes (Fig. 7 A), 1,23 cm de comprimento radicular (Fig. 7 B) e 0,02 g de massa fresca (Fig. 7 C). O uso de AIB em plantas lenhosas cultivadas *in vitro*, segundo Uribe et al. (2012), estimula células indiferenciadas a promoverem o enraizamento ou a emergência das raízes adventícias, que o caracteriza como um regulador de crescimento com elevada capacidade de iniciação radicular (LANA et al., 2008).

O enraizamento das plantas cultivadas *in vitro* de *C. rufa* refletiram na parte aérea e foi observada diferença significativa entre os tratamentos. Em relação ao número de brotos, na ausência do regulador de crescimento obteve-se a maior média de brotos (1,93) (Fig. 7 D). Por outro lado, na maior concentração 4,0 mg L⁻¹ de AIB foram obtidas as maiores médias para comprimento (2,99 cm) (Figs. 7 E e 8 A-E) e massa fresca da parte aérea (0,12 g) (Fig. 7 F).

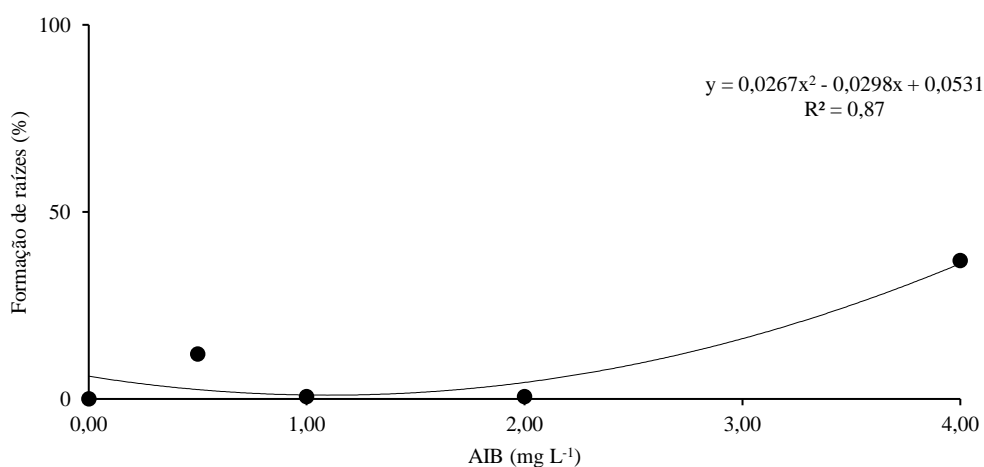


Fig. 6. Formação de raízes em plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro*.

A maior concentração do AIB não apresentou toxicidade para as plantas de *C. rufa* cultivadas *in vitro*, tendo em vista que as plantas enraizaram e chegaram à etapa de alongação (crescimento). O tecido radicular apresentou-se conservado e em desenvolvimento (Fig. 9). Além disso, não foram observadas formação de calos na base dos explantes. O número de raízes por microcaule, comprimento do órgão radicular e a ausência de calos são fatores que determinam a qualidade do enraizamento para posterior aclimatização em *Quercus rubra* L., conforme Vengadesan & Pijut (2009).

Entretanto, é necessário testar doses superiores a 4 mg L⁻¹ de AIB visando uma concentração ideal, pois, a taxa de enraizamento foi baixa para *C. rufa* no meio de cultivo WPM nessas condições. Por outro lado, vale ressaltar que ao submeter as plantas a elevadas concentrações de AIB por um longo período, pode inibir o crescimento e o desenvolvimento do primórdio radicular (URIBE *et al.*, 2012).

Ainda de acordo com Uribe *et al.* (2012), o enraizamento é um desafio para plantas lenhosas cultivadas *in vitro*. No gênero *Campomanesia*, as baixas taxas de enraizamento dificultam o estabelecimento de um protocolo de cultivo *in vitro* eficiente da etapa de germinação até a aclimatização. Machado *et al.* (2020) utilizaram três meios de cultivos distintos sendo eles MS, WPM e QL (QUOIRIN & LEPOIVRE, 1977) e diferentes concentrações de AIB (4,9, 9,8, 14,7, 24,5 e 34,3 µM) e ANA (5,37, 10,7, 16,1, 26,8 e 37,6 µM) no enraizamento de *C. xanthocarpa*. Estes autores observaram que após 60 dias de cultivo em WPM sem regulador de crescimento essa espécie apresentou uma taxa de enraizamento de 49 % nas microestacas cultivadas *in vitro*, isso pode ter ocorrido devido aos níveis do fitormônio endógeno das plantas. Além disso, os autores obtiveram até 53% de enraizamento na concentração de 24,5 µM o que equivale a quase 5 mg L⁻¹ de AIB.

Rossato *et al.* (2015) identificou possível ocorrência de toxicidade do regulador de crescimento causado pelo uso de AIA no meio de cultivo em plantas de *C. adamantium in vitro*, onde o maior número de formação de raízes ocorreu com a diminuição do órgão, o que não foi observado neste trabalho. Além disso, os mesmos autores empregaram o uso dos reguladores de crescimento ANA e AIB, em todos os casos não foi possível obter um protocolo eficiente para a rizogênese nas concentrações testadas (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mg L⁻¹).

Ross e Grasso (2010) observaram formação de raízes em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*), também pertencente à família Myrtaceae, ao utilizar o AIB tanto *in vitro* quanto *ex vitro*.

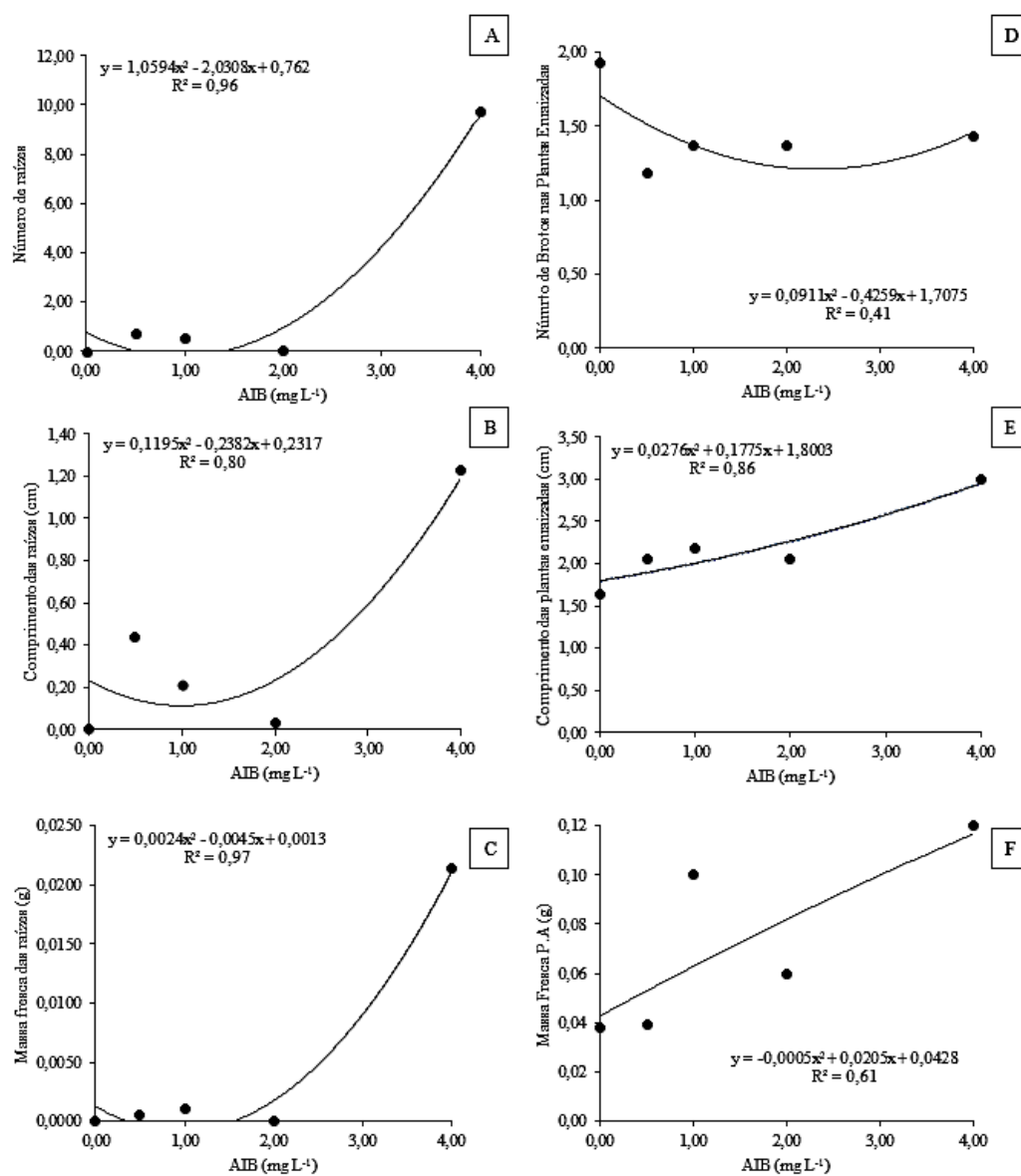


Fig. 7. Enraizamento e parte aérea de *Campomanesia rufa* cultivada *in vitro* sob diferentes concentrações de AIB. Número de raízes (A), comprimento das raízes (B), massa fresca das raízes (C), número de brotos nas plantas enraizadas (D), comprimento da parte aérea das plantas enraizadas (E) e massa fresca da parte aérea (F).

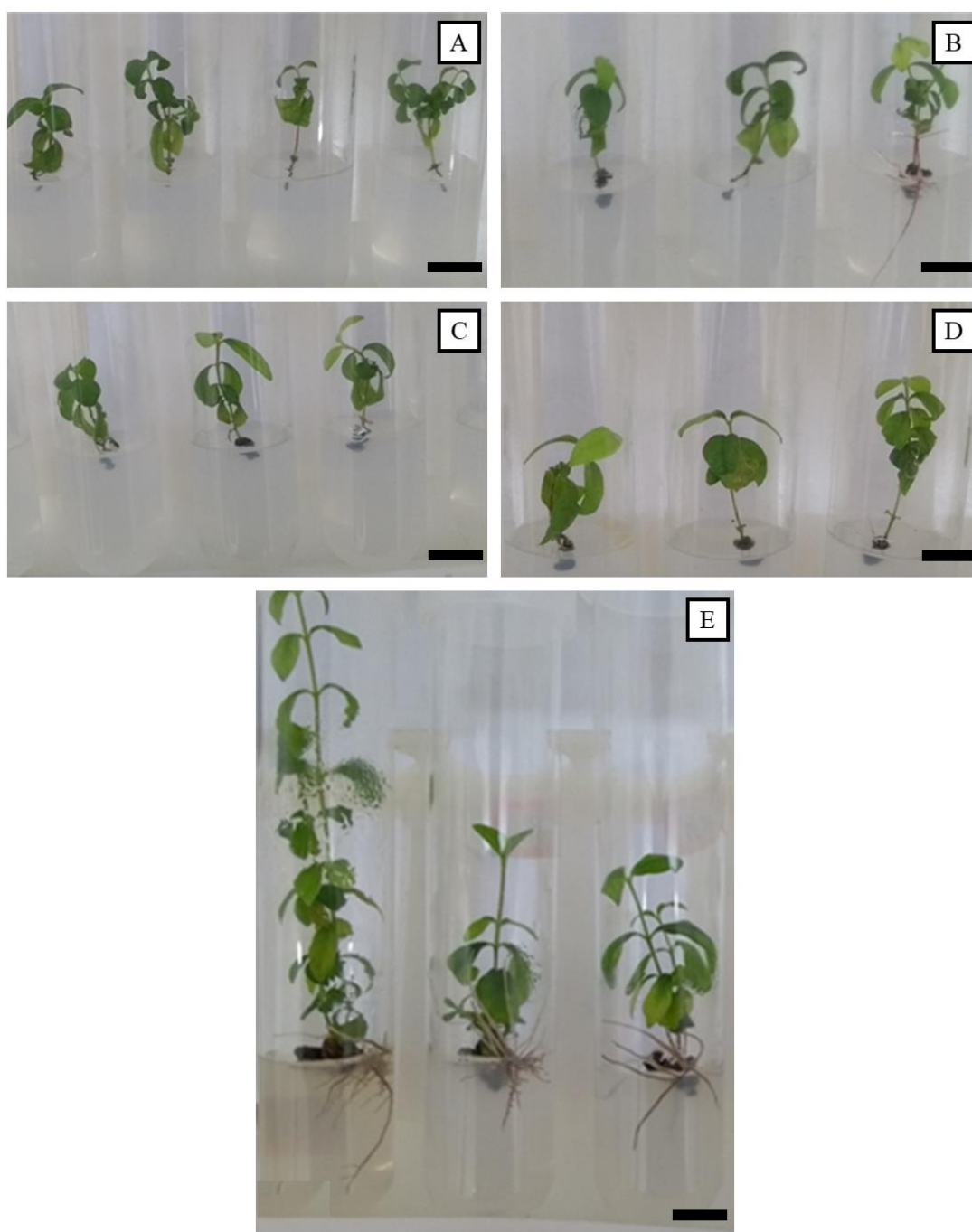


Fig. 8. Enraizamento das plantas de *Campomanesia rufa* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de AIB, controle: 0,0 mg L⁻¹ (A), 0,5 mg L⁻¹ (B), 1,0 mg L⁻¹ (C), 2,0 mg L⁻¹ (D) e 4,0 mg L⁻¹ (D). Barras: 1 cm.

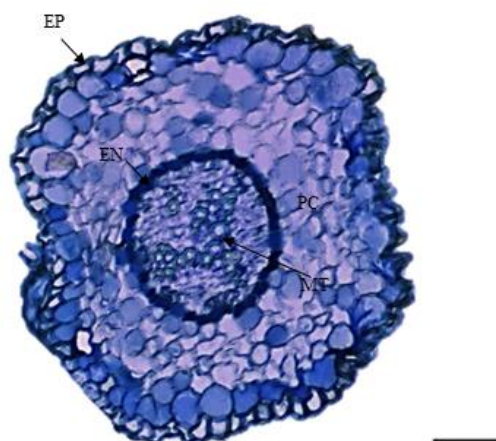


Fig. 9. Anatomia da raiz de uma planta cultivada em meio MS acrescido de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. Barra 50 μm . Legenda: Epiderme (EP), Endoderme (EM), Metaxilema (MT) e Parênquima cortical (PC).

4. CONCLUSÕES

A combinação de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e LED roxo ou lâmpadas fluorescentes apresentaram maiores número de brotos, gemas e folhas.

O uso de duas citocininas no meio de cultivo, 2 mg L^{-1} de 2-ip e 1 mg L^{-1} de BAP, possibilitou que os explantes tivessem maiores NB (5,80) aos 40 dias.

Em relação ao regulador de crescimento espermina, na concentração de 8 mg L^{-1} , as plantas apresentaram resultados melhores para NF, NG e CPA.

Na etapa do enraizamento *in vitro*, a melhor concentração foi 4 mg L^{-1} de AIB em que 37,5% das plantas de *C. rufa in vitro* enraizaram.

REFERÊNCIAS

- Abreu, L.A.F., Paiva, R., Mosqueira, J.G.A., Reis, M.V., Araújo, A.B., Boas, E.V.B.V., 2020. Antioxidant activity and physico-chemical analysis of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. fruits. *Agricultural Sciences*. 44, 1–11. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202044016720>.
- Andrade, W.F., Almeida, M., Gonçalves, A.N., 2006. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* sob estímulo de benzilaminopurina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41, 1715–1719. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006001200005>.
- Bacilieri, F.S., 2019. Conservação in vitro da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão) e estabelecimento in vitro da baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Cosmo, N.L., Gogosz, A.M., Nogueira, A.C., Kuniyoshi, Y.S., 2017. Morfologia de fruto, semente e plântula, e germinação de sementes de *Myrceugenia euosma* (O.Berg) D. Legrand (Myrtaceae). *Floresta*, 47 (4), 479–488.
- Debiasi, C., Fraguas, C. B., Lima, G. P. P., 2007. Estudo das poliaminas na morfogênese in vitro de *Hemerocallis* sp. *Ciencia Rural*. 37, 1014–1020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000400015>.
- Francisco, A. A., Tavares, A.R., Kanashiro, S., Ramos, P.R.R., Lima, G.P.P., 2008. Reguladores vegetais e teores endógenos de poliaminas durante o desenvolvimento de taro cultivado in vitro. *Ciencia Rural*. 38, 1251–1257. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000500008>.
- Ferreira, D. F., 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*. 38, 109–112.

- Ghabel, V. K., Karamian, R., 2020. Effects of TiO₂ nanoparticles and spermine on antioxidant responses of *Glycyrrhiza glabra* L. to cold stress. *Acta Botanica Croatica*. 79, 137–147.
[https:// DOI: 10.37427/botcro-2020-025](https://doi.org/10.37427/botcro-2020-025)
- Goelzer, A., Déo, T.G., Lopes, G.B., Damiani, C.R., 2019. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). *Brazilian Applied Review*. 3(2), 1280-1291.
- Gomes, J. P., Dacoregio, H. M., Silva, K. M., Rosa, L. H., Bortoluzzi, R. L. C., 2017. Myrtaceae na Bacia do Rio Caveiras: Características Ecológicas e Usos Não Madeireiros. *Floresta Ambiente*. 24, 1–10.
- Jagiello-Kubiec, K., Nowakowska, K., Ilczuk, A., Łukaszewska, A.J., 2021. Optimizing micropropagation conditions for a recalcitrant ninebark (*Physocarpus opulifolius* L. maxim.) cultivar. *In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant*. 57, 281–295.
<https://doi.org/10.1007/s11627-020-10154-0>
- Johansen, D. A., 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGrawHill.
- Kraus, J. E.; Arduim, M., 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR, Rio de Janeiro.
- Lallana, V.H., Lallana, M.C., 2017. *Manual de prácticas de fisiologia vegetal*. Córdoba: Eduner.
- Lana, R.M.Q., Lana M.Q., Barreira, S., Morais, T.R. Faria, M.V.F., 2008. Doses do ácido indulbutírico no enraizamento e crescimento de estacas de Eucalipto (*Eucalyptus urophylla*). *Bioscience Journal*. 24, 13–18.
- Lazzarini, L.E.S., Pacheco, F.V., Silva, S.T., Coelho, A.D., Bertolucci, S.K., Pinto, J.E.B.P., Soares, J.D.R., 2017. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas – Revisão. *Scientia Agraria Paranaensis*. 16(2), 137–144.

- Leitzke, L. N., Damiani, C. R., Schuch, M. W., 2010. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. *Ciência e Agrotecnologia* [online]. 34 (2), 352–360. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000200012>
- Leon, B. E., Reiniger S. L. R., Silva B. K., 2020. Efeito de diferentes fontes e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. *Investigación Agraria*. 22, 63–69. <https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2020.diciembre.2202667>
- Lloyd, G., Mccown, B., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*. 30, 421–427.
- Machado, J.S., Degenhardt, J., Maia, R.F., Quoirin, M., 2020. Micropropagation of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae), a medicinal tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Trees*. 34, 791–799. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-01958-z>
- Mogor, G., Lima, G.P.P., Mogor, A., 2007. Espermidina e espermina exogena na micropropagação de *Aloe vera* (L.) Burm. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 12. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962007000200008&lng=es&nrm=iso (accessed 02 June 2021).
- O'Brien, T. P, Feder, N, Mccully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*. 59, 368–373.
- Oliveira, K.S., 2016. Comunidades extrativistas e o uso da biotecnologia vegetal como alternativa à conservação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

- Paiva, J.G.A., Fank-de-Carvalho, S.M., Magalhães, M.P., Graciano-Ribeiro, D., 2006. Verniz vitral incolor 500®: a mounting medium alternative and economically viable. *Acta Botanica Brasilica*. 20, 257–264. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000200002>
- Palma, D., Schuelter, A.R., Stefanello, S., Fortes, A.M.T., 2011. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade nas culturas de tecidos vegetais. *Bras. Agrociência*. 17, 174–184. <https://doi.org/10.18539/CAST.V17I2.2047>
- Pinhal, H.F., 2017. Fitorreguladores no cultivo in vitro de gabirobeira (*Campomanesia* spp.) e baruzeiro (*Dipteryx alata* VOG.). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Quoirin M., Lepoivre, P., 1977. Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de Prunus. *Acta Hortic*. 78, 437–442.
- Rademacher, W., 2000. GROWTH RETARDANTS: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51, 501–531, <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.501>.
- Ross, S., Grasso, R., 2010. In vitro propagation ‘Guayabo del país’ (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnonology*. 4, 83–87.
- Rossato, M., Schumacher, P. V., Netto, A. P. D. C., Souza, G. C., Reis, E. F., Stein, V. C., 2015. Multiplication and in vitro rooting of *Campomanesia adamantium* Camb. *Plant Cell Culture & Micropropagation*. 11, 70–77.
- Sant’Ana, C. R. O., Paiva, R., Reis, M.V., Silva, D.P.C., Silva, L.C., 2018. Propagação in vitro de *Campomanesia rufa*: Uma espécie frutifera em extinção. *Ciência e Agrotecnologia*. 42, 372–380. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018424011018>
- Silva, M.M.A., Ferreira, L.T., 2016. Cultivo in vitro de plantas e suas aplicações em cactáceas. INSA. Campina Grande.

- Silva, J. A. T., 2004. The effect of carbon source on in vitro organogenesis of chrysanthemum thin cell layers. *Bragantia*. 63, 165–177.
<https://doi.org/10.1590/S000687052004000200002>
- Tassoni, A., Buuren, M., Franceschetti, M., Fornalè, S., Bagni, N., 2000. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38, 383–393.
[https://doi.org/10.1016/S09819428\(00\)00757-9](https://doi.org/10.1016/S09819428(00)00757-9)
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I., Murphy, A., 2017. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed.
- Uribe, M. E., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F., Cartes, P., 2012. Influência de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Botánica*. 69, 105–112.
<http://dx.doi.org/10.4067/S071766432012000100010>
- Vengadesan, G., Pijut, P.M., 2009. In vitro propagation of Northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 45, 474–482. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-008-9182-6>
- Yaseen, M., Ahmad T., Sablok, G., Hafiz, I.A., 2013. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular Biology Reports*. 40, 2837–2849.
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-2299-z>