



TAINÁ TEIXEIRA ROCHA

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Phyla betulifolia* SOB A
INTERVENÇÃO DE LUZ E VENTILAÇÃO: CRESCIMENTO
VEGETATIVO, ANATOMIA, DEFESA ANTIOXIDANTE E
FRAÇÃO VOLÁTIL**

**LAVRAS - MG
2019**

TAINÁ TEIXEIRA ROCHA

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Phyla betulifolia* SOB A INTERVENÇÃO DE LUZ
E VENTILAÇÃO: CRESCIMENTO VEGETATIVO, ANATOMIA, DEFESA
ANTIOXIDANTE E FRAÇÃO VOLÁTIL**

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

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Co-orientadora

Prof. Dr. Manuel Losada Gavilanes
Co-orientador

**LAVRAS - MG
2019**

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

Rocha, Tainá Teixeira.

MICROPROPAGAÇÃO DE *Phyla betulifolia* SOB A
INTERVENÇÃO DE LUZ E VENTILAÇÃO: CRESCIMENTO
VEGETATIVO, ANATOMIA, DEFESA ANTIOXIDANTE E
FRAÇÃO VOLÁTIL. / Tainá Teixeira Rocha. - 2019.

117 p. : il.

Orientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci, Manuel

Losada Gavilanes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Plantas Medicinais. 2. Cultura de tecidos vegetais. 3.
Anatomia vegetal. I. Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. II.
Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. III. Gavilanes, Manuel Losada. IV.

TAINÁ TEIXEIRA ROCHA

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Phyla betulifolia* SOB A INTERVENÇÃO DE LUZ
E VENTILAÇÃO: CRESCIMENTO VEGETATIVO, ANATOMIA, DEFESA
ANTIOXIDANTE E FRAÇÃO VOLÁTIL**

**MICROPROPAGATION OF *Phyla betulifolia* UNDER LIGHT
INTERVENTION AND VENTILATION: VEGETATIVE GROWTH, ANATOMY,
ANTIOXIDANT DEFENSE AND VOLATILE FRACTION**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2019

Prof. Dr. Osmar Alves Lameira - Embrapa Amazônia Oriental
Prof. Dr. Eduardo Alves - UFLA

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Co-orientadora

Prof. Dr. Manuel Losada Gavilanes
Co-orientador

**LAVRAS - MG
2019**

*Aos meus pais José Luiz e Cleonice, e as minhas
irmãs Tânila e Alessandra.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão maior de minha vida e fonte de minha força diária por ter permitido e me guiado pelos caminhos que me trouxeram até aqui. Aos meus pais José Luiz e Cleonice Rocha e as minhas irmãs Tâmila e Alessandra Rocha, pelo amor incondicional, paciência e por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas.

A minha prima/irmã, e acima de tudo incentivadora Neuma, gratidão por todo o apoio tanto na vida pessoal quando acadêmica.

Ao Pablo Teobaldo, uma pessoa super iluminada que tive o prazer de conhecer e que se tornou uma das pessoas mais importantes na minha vida, muito obrigada por todo o companheirismo e paciência, principalmente nos dias difíceis.

A Raissa Moura e a Diene Xavier, por tudo o que vivemos e pelos dias de laboratório, os quais tornaram-se mais leves.

As “belenenses” Fernanda Ribeiro, Carolina Germano e Ana Paula Medeiros (Maria), obrigada por todo o apoio e companheirismo.

Ao Dr. Osmar Lameira e a Dra. Ana Cláudia Tavares-Martins pela amizade e incentivo à carreira acadêmica.

Aos meus Orientadores José Eduardo Pinto, Suzan Kelly Bertolucci e Manuel Gavilanes, que acima de tudo foram amigos. Mostraram-me a beleza das plantas medicinais, cada um com entusiasmo e ponto de vista diferenciado, permitindo-me crescer tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Sou muito grata por todos os ensinamentos e por estarem sempre disponíveis, ajudando a contornar cada dificuldade.

A todos os técnicos, pós doutorandos, e iniciação científica que me auxiliaram pelos vários laboratórios por onde passei.

A Embrapa Amazônia Oriental pelo fornecimento do material vegetal e aos laboratórios da Universidade Federal de Lavras, por todo o suporte para a realização dos experimentos: Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Mediciniais do Departamento de Agricultura; Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura; Laboratório de Anatomia Vegetal do Setor de Botânica estrutural; Laboratório de Anatomia e Fisiologia do Cafeeiro; e Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural.

A Capes pela concessão da bolsa.

A todos que participaram de forma direta e indireta na realização desse estudo, deixo os meus inestimáveis agradecimentos.

*“A natureza é o único livro que oferece um
conteúdo valioso em todas as suas folhas.”
(Johann Goethe)*

RESUMO GERAL

Fatores ambientais são parâmetros importantes que influenciam o crescimento e o metabolismo *in vitro* de plantas. *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene (Verbenaceae) é uma planta medicinal que apresenta potencial uso terapêutico. Objetivou-se avaliar os efeitos do sistema de ventilação natural (SVN) e de diferentes intensidades e qualidades de luz no crescimento vegetativo, na anatomia, na defesa antioxidante acúmulo de pigmentos fotossintetizantes e na composição química volátil de *P. betulifolia*. Para as avaliações anatômicas foram empregadas técnicas usuais de microscopia de luz e eletrônica. A defesa antioxidante foi avaliada por métodos clássicos de defesa antioxidante não enzimáticos (captura do radical livre - DPPH, capacidade antioxidante total - CAT, poder quelante e poder redutor). Análise de doseamento de pigmentos fotossintetizantes e composição fenólica foram realizados por métodos espectrofotométricos e da fração volátil por *headspace*-CG/EM. Segmentos nodais de *P. betulifolia* foram inoculados em frascos com 45 mL de meio MS e vedados com tampas contendo 0, 1, 2 e 4 furos, respectivamente nomeados por SM (sem membranas), SVN 1, 2 e 4. Os frascos foram mantidos sob intensidade de luz de 32 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, por 45 dias. O tratamento SVN4 proporcionou melhores condições para o acúmulo de matéria seca das folhas, caule, raiz e total. SVN4 também acumulou maior quantidade de pigmentos fotossintéticos e apresentou os melhores resultados de defesa antioxidante frente aos ensaios de CAT, DPPH, poder quelante e poder redutor. A intensidade de luz foi avaliada a partir de segmentos nodais pré-estabelecidos em meio MS, os quais foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL de meio MS e submetidos a diferentes intensidades de luz 20, 57, 78, 102, 139 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, sendo avaliados ao final de 45 dias. A intensidade de luz de 139 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proporcionou maior acúmulo de matérias secas (MSF, MSR e MST), entretanto, esse tratamento foi responsável pelos menores teores de clorofila *a*, *b* total e carotenoides, além de menor atividade de defesa antioxidante pelo método de captura do radical DPPH. Foram detectados 25 compostos voláteis, sem diferenças qualitativas e quantitativas entre os tratamentos. Quanto a qualidade de luz, segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL de meio MS e cultivadas sob diferentes espectros: vermelho (V); azul (A); combinações de azul e vermelho A:V (1:2,5; 2,5:1; 1:1); branco LED (BR); verde (VD); e amarelo (AM), obtidos por Diodos Emissores de Luz (LEDs) e fluorescente branca fria (FL), por 45 dias. As combinações de luz A:V (1:2,5 e 1:1) foram responsáveis pelo maior acúmulo de matéria seca. O acúmulo de clorofila *a* e carotenoides foi maior em VD, clorofila *b* e total em AM. Os teores de CFT e as atividades antioxidantes avaliadas pelos métodos CAT, DPPH e poder quelante foram mais elevadas no tratamento AZ. O perfil cromatográfico obtido para as amostras do VM indicou diferenças na composição química qualitativa das amostras, sendo o que apresentou menor número de constituintes. Ao final dos experimentos, observou-se que as melhores condições de cultivo *in vitro* para a espécie *P. betulifolia* foram alcançadas no SVN4, nas maiores intensidades luminosas (102 e 139 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), no espectro de luz AZ e nas combinações de A:V (2,5:1 e 1:2,5), sendo estes os tratamentos que apresentaram plântulas mais desenvolvidas e com melhores condições para a fase de aclimatização.

Palavras-chave: Qualidade de luz. Intensidade de luz. Microscopia eletrônica de varredura. Composição fenólica. *Headspace*-CG/EM.

ABSTRACT

Environmental factors are important parameters that influence the growth and *in vitro* metabolism of plants. *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene (Verbenaceae) is a medicinal plant that presents a potential therapeutic use. The objective of this study was to evaluate the effects of the natural ventilation system (SVN) and of different intensities and light qualities on vegetative growth, anatomy, antioxidant defense, photosynthetic pigment accumulation and volatile chemical composition of *P. betulifolia*. Electronic and light microscopy techniques were used for anatomical evaluations. The antioxidant defense was evaluated by classic non-enzymatic antioxidant defense methods (free radical capture - DPPH, total antioxidant capacity - CAT, chelating power and reducing power). Dosing analysis of photosynthetic pigments and phenolic composition were performed by spectrophotometric methods and volatile fraction by headspace-GC/MS. Nodal segments of *P. betulifolia* were inoculated in flasks with 45 mL of MS medium and sealed with caps containing 0, 1, 2 and 4 holes, respectively named by SM (without membranes), SVN 1, 2 and 4. The flasks were kept under light intensity of $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, for 45 days. The SVN4 treatment provided better conditions for the accumulation of leaves, stem, root and total dry matter. SVN4 also accumulated greater amount of photosynthetic pigments and presented the best results of antioxidant defense regarding CAT, DPPH, chelating power and reducing power assays. The light intensity was evaluated from nodal segments pre-established in MS medium, which were inoculated in culture tubes with 15 mL of MS medium and submitted to different light intensities 20, 57, 78, 102, $139 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, being evaluated after 45 days. The light intensity of $139 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ provided a higher accumulation of dry matter (MSF, MSR and MST). However, this treatment was responsible for the lower contents of chlorophyll a, b and carotenoids, as well as lower antioxidant defense by DPPH radical capture method. 25 volatile compounds were detected, without qualitative and quantitative differences between the treatments. Regarding light quality, nodal segments were inoculated in culture tubes with 15 mL of MS medium and cultured under different spectra: red (V); blue (A); combinations of blue and red A:V (1:2.5; 2.5:1; 1:1); white LED (BR); green (VD); and yellow (AM), obtained by Light Emitting Diodes (LEDs) and cold white fluorescent (FL), for 45 days. The A:V light combinations (1: 2.5 and 1: 1) were responsible for the greater accumulation of dry matter. The accumulation of chlorophyll *a* and carotenoids was higher in VD, chlorophyll *b* and total in AM. The levels of CFT and antioxidant activities evaluated by CAT, DPPH and chelating power methods were higher in A treatment. The chromatographic profile obtained for the V samples indicated differences in the qualitative chemical composition of the samples, being the one that presented a smaller number of constituents. At the end of the experiments, it was observed that the best *in vitro* culture conditions for *P. betulifolia* were reached in the SVN4, at the highest light intensities (102 and $139 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), under A light spectrum and combinations of A:V (2.5:1 and 1:2.5), being these treatments that presented more developed plantlets and with better conditions for the acclimatization phase.

Keywords: Light quality. Intensity of light. Scanning electron microscopy. Phenolic composition. Headspace-CG/EM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1 - Imagem de *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene (Verbenaceae)..... 22
- Figura 2 - Interface da produção de metabólitos secundários..... 26
- Figura 3 - Papel das espécies reativas de oxigênio (EROs)..... 27

CAPÍTULO 2 - CONCENTRAÇÕES DE SAIS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Phyla betulifolia* (KUNTH) GREENE

- Figura 1 - Crescimento e enraizamento de plântulas de *Phyla betulifolia*, aos 15 dias de cultivo *in vitro*. 43
- Figura 2 - Crescimento de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas em meio MS e MS/2. A - Aos 15 dias de cultivo *in vitro*; B - Aos 40 dias de cultivo *in vitro*. 44
- Figura 3 - Plantas de *Phyla betulifolia* após 40 dias de aclimatizadas em casa de vegetação. 45
- Figura 4 - Análise de peso fresco e seco de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* durante 30 dias. 46
- Figura 5 - Taxa de multiplicação de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro*. 47

CAPÍTULO 3 - CRESCIMENTO, ANATOMIA E DEFESA ANTIOXIDANTE DE *Phyla betulifolia* (KUNTH) CULTIVADA *IN VITRO* COM SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL

- Figura 1 - Confeção da membrana porosa e distribuição dos tratamentos. A - Esquema de membrana e de tampa. B - Distribuição dos tratamentos: SM e SVN (1,2 e 4)..... 55
- Figura 2 - Plântulas de *Phyla betulifolia* aos 45 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação natural (SVN). A) Plântulas no frasco, com setas indicando a retração do meio de cultivo conforme o tipo de SVN; B) Aspecto de plântulas fora dos frascos de cultivo. 62
- Figura 3 - Crescimento vegetativo de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação natural. A) Comprimento do broto (CB); B) Número de folhas (NF); C) Número de raízes (NR); D) Comprimento de raiz (CR). 63
- Figura 4 - Influência do sistema de ventilação natural no acúmulo de matérias secas em plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro*. A) Folhas (MSF); B) Caule (MSC); C) Raiz (MSR); D) Total (MST). 64
- Figura 5 - Fotomicrografias de secções transversais de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação, evidenciando o desenvolvimento do mesofilo e a diminuição de volume das células do parênquima lacunoso. A - Sem membrana - SM; B - SVN1; C - SVN2; e D - SVN4..... 66
- Figura 6 - Fotomicrografias de secções transversais de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação, demonstrando o desenvolvimento do feixe vascular. A - Sem membrana - SM; B - SVN1; C - SVN2; e D - SVN4..... 67

Figura 7 - Eletromicrografias de varredura de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação natural, mostrando a densidade estomática entre as faces adaxial e abaxial, as setas indicam os estômatos. A) e B) SM; C) e D) SVN1; E) e F) SVN2; G) e H) SVN4..... 69

Figura 8 - Fotomicrografias de secções transversais de caules de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. A e B- SM; C e D- SVN1; E e F- SVN2; G e H- SVN4..... 71

Figura 9 - Fotomicrografias de secções transversais de raízes de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. A- SVN1; B- SVN2; C- SVN4. 72

CAPÍTULO 4 - CULTURA *in vitro* DE *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene: INTENSIDADE E QUALIDADE DA LUZ NO CRESCIMENTO, DEFESA ANTIOXIDANTE E PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS

Figura 1 - Perfis espectrais das fontes de luz utilizadas no experimento, as proporções a seguir indicam a relação entre as intensidades de absorção dos diodos emissores de luz: A) Vermelho - V; B) Azul - A; C) 2,5 Azul: 1 Vermelho; D) 1 Azul: 2,5 Vermelho; E) 1 Azul: 1 Vermelho; F) Verde - VD; G) Amarelo - AM; H) Branca LED - BR; I) Fluorescente - FL. 91

Figura 2 - Plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de luz. 94

Figura 3 - Crescimento vegetativo de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro* em diferentes intensidades de luz. A) Comprimento do broto (CB); B) Número de folhas (NF); C) Número de raízes (NR); D) Comprimento da raiz (CR). 95

Figura 4 - Influência de diferentes intensidades de luz no acúmulo de matérias secas em plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro*. A) Folhas (MSF); B) Caule (MSC); C) Raiz (MSR); D) Total (MST). 96

Figura 5 - Plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes qualidades de luz. 100

Figura 6 - Análise de crescimento de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro* em diferentes qualidades de luz. A) Comprimento de broto (CB); B) Número de folhas (NF); C) Número de raízes (NR); D) Comprimento da raiz (CR). 101

Figura 7 - Influência de diferentes qualidades de luz no acúmulo de matérias secas de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro*. A) Folhas (MSF); B) Caule (MSC); C) Raiz (MSR); D) Total (MST). 102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - CONCENTRAÇÕES DE SAIS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Phyla betulifolia* (KUNTH) GREENE

Tabela 1 - Comprimento de brotação (cm) e sobrevivência (%) de plântulas de *Phyla betulifolia*, aos 15 dias de cultivo *in vitro*. 42

Tabela 2 - Parâmetros de crescimento de plântulas de *Phyla betulifolia*, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. 44

Tabela 3 - Taxa de crescimento absoluto (TCA) de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro*. 45

CAPÍTULO 3 - CRESCIMENTO, ANATOMIA E DEFESA ANTIOXIDANTE DE *Phyla betulifolia* (KUNTH) CULTIVADA *IN VITRO* COM SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL

Tabela 1 - Área foliar e índices fisiológicos da análise de crescimento de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. 65

Tabela 2 - Análises anatômicas de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. 66

Tabela 3 - Densidade e diâmetro de estômatos de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. 68

Tabela 4 - Densidade de tricomas tectores e capitados em folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. 70

Tabela 5 - Análises anatômicas de caules de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. 72

Tabela 6 - Análises anatômicas de raízes de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. 73

Tabela 7 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas em diferentes sistemas de ventilação. 73

Tabela 8 - Quantificação de compostos fenólicos, e atividade antioxidante de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. 73

CAPÍTULO 4 - CULTURA *in vitro* DE *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene: INTENSIDADE E QUALIDADE DA LUZ NO CRESCIMENTO, DEFESA ANTIOXIDANTE E PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS

Tabela 1 - Área foliar total e índices fisiológicos de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de luz. 97

Tabela 2 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de luz. 97

Tabela 3 - Quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de luz. 98

Tabela 4 - Composição química de <i>Phyla betulifolia</i> cultivada <i>in vitro</i> sob diferentes intensidades de luz.	99
Tabela 5 - Área foliar total e índices fisiológicos de folhas de <i>Phyla betulifolia</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes qualidades de luz.	103
Tabela 6 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de <i>Phyla betulifolia</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes qualidades de luz.	103
Tabela 7 - Quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante de <i>Phyla betulifolia</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes qualidades de luz.	104
Tabela 8 - Composição química de <i>Phyla betulifolia</i> cultivada <i>in vitro</i> sob diferentes intensidades de luz.	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

A	Azul
AAPH	Dihidrocloreto de 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida)
ACC	Área do Cilindro Central
ACV	Área do Cilindro Vascular
AFT	Área Foliar Total
AFE	Área Foliar Específica
AFV	Área do Feixe Vascular
AM	Altura do Mesofilo
AM	Amarelo
APC	Área do Parênquima Cortical
APM	Área do Parênquima Medular
AT	Área Total
A:V	Combinação de luz azul:vermelho
BHT	Butil-hidroxitolueno
BR	Branco <i>LED</i>
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CB	Comprimento de Broto
CC	Comprimento do Caule
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CG/EM	Cromatógrafo gasoso/Espectrômetro de Massa
CO ₂	Gás carbônico
CR	Comprimento da Raiz
DAG	Departamento de Agricultura
DIC	Delineamento Interiramente Casualizado
DE	Diâmetro Equatorial dos Estômatos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Diâmetro Polar dos Estômatos
DP/DE	Relação diâmetro polar e equatorial dos Estômatos
DPPH	2,2 difenil-1-picril-hidrazila
EA	Número de Estômatos Abertos
EDTA	Etilenodiaminotretacético
EF	Número de Estômatos Fechados;

EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
EPC	Espessura do Parênquima Cortical
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FL	Lâmpada fluorescente branca fria
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
LEDs	Diodos de Emissão de Luz
LF	Limbo Foliar
MSC	Matéria Seca de Caule
MSF	Matéria Seca de Folha
MSR	Matéria seca de Raiz
MST	Matéria seca Total
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NF	Número de Folhas
NR	Número de Raízes
ORAC	Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singleto
OH•	Radical hidroxila
PANG	Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
PEF	Peso Específico da Folha
PL	Parênquima Lacunoso
PP	Parênquima Paliçádico
PTFE	Politetrafluoroetileno
RAF	Razão de Área Foliar
RPF	Razão de Peso das Folhas
SM	Sistema sem Membranas
SVN	Sistema de Ventilação Natural
SVN1	Sistemas de Ventilação Natural com uma membrana
SVN2	Sistemas de Ventilação Natural com duas membranas
SVN4	Sistemas de Ventilação Natural com quatro membranas
TCA	Taxa de Crescimento Absoluto
TT	Número de Tricomas Tectores

TCMe	Número de Tricomas Capitados Menores
TCA	Ácido Tricloroacético
TCM	Número de Tricomas Capitados Maiores
TPC	Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais
UFLA	Universidade Federal de Lavras
V	Vermelho
VD	Verde

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO	19
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 Caracterização geral da espécie.....	21
2.2 Composição química volátil do gênero <i>Phyla</i>	22
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas medicinais.....	23
2.4 Sistema de ventilação natural (SVN)	24
2.5 Influência da luz no cultivo <i>in vitro</i> de plantas	25
2.6 Metabolismo secundário, compostos fenólicos e defesa antioxidante.....	26
2.7 Anatomia vegetal.....	28
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 2 - CONCENTRAÇÕES DE SAIS NO ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Phyla betulifolia</i> (Kunth) Greene.....	37
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Local dos experimentos e identidade do material vegetal.....	40
2.2 Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>	40
2.2.1 Processo de assepsia.....	40
2.2.2 Estabelecimento de segmentos <i>in vitro</i>	40
2.2.3 Aclimatização das plantas em casa de vegetação.....	41
2.2.4 Taxa de crescimento absoluto (TCA) ou velocidade média de crescimento	41
2.2.5 Taxa de multiplicação	41
2.3 Análise estatística.....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1 Estabelecimento e aclimatização.....	42
3.2 Taxa de crescimento absoluto (TCA).....	45
3.3 Taxa de multiplicação	47
4 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO 3 - CRESCIMENTO, ANATOMIA E DEFESA ANTIOXIDANTE DE <i>Phyla betulifolia</i> (Kunth) CULTIVADA <i>in vitro</i> COM SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL.....	51
1 INTRODUÇÃO.....	53
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1 Local dos experimentos e identidade do material vegetal.....	54
2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	54

2.2.1 Origem e estabelecimento dos explantes	54
2.2.2 Confeção das membranas porosas.....	54
2.2.3 Sistema de cultivo e ventilação natural.....	55
2.2.4 Análise de crescimento.....	56
2.3 Análises anatômicas	56
2.3.1 Microscopia de Luz.....	56
2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	57
2.4 Análise de pigmentos fotossintéticos	57
2.5 Quantificação de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes	58
2.5.1 Preparo do extrato	58
2.5.2 Quantificação dos compostos fenólicos totais (TPC)	58
2.5.3 Capacidade antioxidante total (CAT)	59
2.5.4 Atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH.....	59
2.5.5 Determinação do poder quelante.....	60
2.5.6 Determinação do poder redutor.....	60
2.5.7 Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio - ORAC	61
2.5.7.1 Solubilização das amostras.....	61
2.5.7.2 Realização do ensaio ORAC	61
2.6 Análise estatística dos dados	61
3 RESULTADOS	61
4 DISCUSSÕES	74
5 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	81
CAPÍTULO 4 - CULTURA <i>in vitro</i> DE <i>Phyla betulifolia</i> (Kunth) Greene: INTENSIDADE E QUALIDADE DA LUZ NO CRESCIMENTO, DEFESA ANTIOXIDANTE E PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS	86
1 INTRODUÇÃO.....	88
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1 Local dos experimentos e identidade do material vegetal.....	89
2.2 Condições gerais dos experimentos	89
2.2.1 Origem do explante	89
2.2.2 Cultivo sob diferentes intensidades de luz	90
2.2.3 Cultivo sob diferentes qualidades de luz.....	90
2.3 Análise de crescimento.....	92
2.4 Análise de pigmentos fotossintéticos	92
2.5 Quantificação de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes	92
2.6 Análise de fração volátil.....	92
2.7 Análise estatística dos dados	93

3 RESULTADOS	94
3.1 Intensidade de luz.....	94
3.2 Qualidade de luz.....	100
4 DISCUSSÕES	106
4.1 Intensidade de luz.....	106
4.2 Qualidade de luz.....	109
5 CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS	113
CONSIDERAÇÕES GERAIS	117

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

O reino vegetal abrange um grande número de espécies produtoras de moléculas bioativas (voláteis e não voláteis) com diferentes estruturas químicas, as quais possuem uma diversidade de aplicações terapêuticas, tornando-as parte importante da vida cotidiana de muitas pessoas, independente do progresso ou acesso à medicamentos industrializados. (GHORBANPOUR et al., 2017).

A família Verbenaceae compreende espécies com potencial uso industrial e terapêutico devido à sua composição aromática (CASTILHO et al., 2019). De acordo com Pinto et al. (2006) *Lippia* e *Lantana* estão entre os gêneros de Verbenaceae que se destacam pelo uso medicinal e potencial fitoquímico. *Phyla* é um pequeno gênero de Verbenaceae que por muito tempo foi tratado como *Lippia*, no entanto, muitos autores os aceitam como distintos (O'LEARY; MÚLGURA, 2011).

Phyla betulifolia (Kunth) Greene é uma espécie de hábito herbáceo, com folhas fortemente aromáticas, seus ramos são lançados sob o solo e espalham-se formando pequenas moitas fartamente enraizadas (LEAL, 2010). Trata-se de uma planta com potencial uso medicinal, entretanto com poucos estudos quanto ao seu cultivo *in vitro*. Sua propagação pode ser por sementes, seus ramos podem ser multiplicados por estaquia e por micropropagação, entretanto, observações de campo demonstraram que as sementes apresentam dificuldades de germinação, tornando-as inviáveis.

A micropropagação é uma alternativa para a produção vegetal, no entanto, sabe-se que o cultivo *in vitro* de plantas necessita de um ambiente controlado, sendo necessário ajustes de luminosidade, temperatura, fotoperíodo e diminuição dos problemas encontrados no microambiente formado nos recipientes de cultivo (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; SOUZA; RESCAROLLI; NUNEZ, 2018). Nesse sentido, várias pesquisas propõem algumas técnicas e ferramentas que podem ser utilizadas para contornar essas limitações.

A implementação de sistemas de ventilação natural (SNV) tem sido uma excelente alternativa para melhor as condições *in vitro*. Com o uso de SVN é possível facilitar o processo de trocas gasosas, aumentar a concentração de CO₂, e diminuir a umidade relativa e a concentração de etileno no ambiente de cultivo (SALDANHA et al., 2012). Além disso, o uso de sacarose pode ser reduzido ou eliminado da composição do meio nutritivo, possibilitando que as plântulas desenvolvam características anatômicas adaptadas ao processo de aclimatização *ex vitro* (XIAO; KOZAI, 2005). O controle de luminosidade é uma outra

maneira de aprimorar o ambiente *in vitro*, a substituição de lâmpadas fluorescente por Diodos de Emissão de Luz (*LEDs*) nas salas de crescimento, tem apontado respostas positivas em plântulas micropropagadas. O uso de *LEDs* permite determinar comprimentos de onda específicos, possibilitando ajustes na composição espectral e densidade de fluxo de fótons (LAZZARINI et al., 2017; YEH; CHUNG; 2009).

Os vegetais surgiram na terra há mais de 500 milhões de anos e durante todo esse tempo desenvolveram uma série de mecanismos para enfrentar os diversos tipos de estresse abióticos aos quais foram submetidas (VERMA; NIZAM; VERMA, 2013; TAIZ, et al. 2017). A exposição ao estresse pode levar as plantas a apresentarem anormalidades morfológicas e fisiológicas, como o mau funcionamento dos estômatos, camadas do tecido paliçádico e mesofilo finos e desorganizados, além de pouca ou nenhuma deposição de cera na superfície da folha (AFREEN, 2005; EVERT; EICHHORN, 2014; TAIZ et al., 2017). Outra implicação importante é o acúmulo de potenciais espécies reativas de oxigênio (EROs) nos tecidos vegetais, sendo este um dos efeitos mais deletérios ocasionados pelo ambiente (REDDY; RAGHAVENDRA, 2006). Para lidar com as EROs, as plantas desenvolveram vários mecanismos de defesa antioxidante que são ativados para regular os níveis tóxicos de EROs. Esse sistema envolve moléculas como ascorbato, glutatona, vitamina E e carotenoides, e enzimas, como superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase (CAVERZAN; CASASSOLA; BRAMMER, 2016; ČAMAGAJEVAC; PFEIFFER; MARONIĆ, 2018).

Diante do exposto e da carência de informações na literatura quanto ao cultivo *in vitro* de *Phyla betulifolia*, torna-se de fundamental importância a realização de estudos que investiguem a influência dos fatores ambientais sob a morfologia de plântulas, permitindo que haja uma melhor compreensão sobre a relação existente entre a organização dos tecidos vegetais, a produção de diferentes metabólitos, e obtenção de plântulas viáveis para a fase de aclimatização.

Objetivou-se avaliar os efeitos do sistema de ventilação natural (SNV) e de intensidades e qualidades espectrais de luz no cultivo *in vitro* de *Phyla betulifolia* quanto ao seu crescimento vegetativo, anatomia, defesa antioxidante, acúmulo de pigmentos fotossintéticos e compostos fenólicos e, por fim, composição química volátil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização geral da espécie

A família Verbenaceae J.St.-Hil. compreende 2600 espécies agrupadas em 100 gêneros com distribuição pantropical, sendo a América Latina a região de maior ocorrência (ZAMORA; TORRES E NUÑEZ, 2018). No Brasil há 16 gêneros e 281 espécies, das quais 206 são consideradas endêmicas (VERBENACEAE, 2019). Verbenaceae agrega plantas do tipo herbáceas, arbustivas, lianas e árvores (MARX et al., 2010). Essa família possui uma versatilidade de usos: na medicina popular é conhecida devido suas propriedades digestivas, carminativas, antipiréticas, antitússica, antisséptica e curativa (ZAMORA; TORRES; NUÑEZ, 2018); é empregada nas indústrias farmacêutica e cosmética; e aproveitada em paisagismo (MELO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et. al., 2015).

Entre os gêneros de Verbenaceae, encontra-se o pequeno gênero *Phyla* Lour., pertencente à tribo Lantaneae e representado por cinco espécies e três variedades: *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene; *Phyla cuneifolia* (Torr.) Greene; *Phyla lanceolata* (Michx.) Greene; *Phyla linearis* (Kunth) Tronc. & Lo'pez-Pal. e *Phyla nodiflora* (L.) Greene (FRANÇA; O'LEARY; SALIMENA, 2015; O'LEARY, 2019), amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, com exceção de *P. nodiflora*, que é encontrada em todos os continentes (O'LEARY, 2019). De acordo com Salimena et. al. (2013) e O'Leary (2019) no Brasil foram registradas a ocorrência de *P. nodiflora* e *P. betulifolia*, sendo *P. nodiflora* a espécie mais estudada, principalmente quanto a sua composição química e cultivo *in vitro*.

Phyla betulifolia, possui como sinônimos: *Lippia betulifolia* Kunth, *Cryptocalyx nepetifolia* Benth., *Lippia betulaefolia* Kunth (O'LEARY, 2019; TROPICOS, 2018). As plantas de *P. betulifolia*, (FIGURA 1A), são ervas perenes que variam de 15 a 60 cm de comprimento, com pecíolos de 1 a 2 cm, lâmina oval, com venação proeminente na região abaxial, margens serrilhadas e presença de tricomas em ambas as superfícies; suas inflorescências são do tipo ovoide, com flores formando linhas verticais na espiga e brácteas florais elípticas, seus ramos são decumbentes com enraizamento nodal; possuem frutos secos, marrons a amarelados, ovóide, e ápice alongado (O'LEARY; MÚLGURA, 2011; O'LEARY, 2019). Observações de campo, indicaram que *P. betulifolia* possui habitat trepadeira e/ou repitante, e suas folhas e flores são fortemente aromáticas (FIGURA 1B).

Figura 1 - Imagem de *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene (Verbenaceae).



Fonte: Da autora (2019).

Essa espécie normalmente habita terras baixas, margens de rios e florestas abertas, savanas, pastagens e lugares ruderais, sendo frequentemente localizada em solo arenoso ou argiloso (O'LEARY; MÚLGURA, 2011). É encontrada na Costa Rica, Guatemala, Honduras, Panamá, Cuba, Trinidad nas Índias Ocidentais, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Paraguai e Venezuela (ATKINS, 2004; O'LEARY; MÚLGURA, 2011). No Brasil, *Phyla betulifolia*, possui ocorrência confirmada nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia), Nordeste (Bahia, Pernambuco), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso do Sul), e Sudeste (Minas Gerais). Pertence aos domínios geográficos da Amazônia e Mata Atlântica, sendo encontrada em áreas de campo de várzea, floresta ciliar ou galeria de várzea e restinga (O'LEARY, 2019).

Na literatura consultada, estudos registraram *Phyla betulifolia* na região pertencente ao Vale do Rio Doce, Minas Gerais, (PIVARI et al., 2011); no Rio Grande do Sul (GUGLIERI-CAPORAL; CAPORAL; POTT, 2010); e na região do médio e baixo rio Solimões, Amazonas (LEAL, 2010). Na região amazônica ela é conhecida como “capim-doce”, nome vernacular utilizado pela população de Santarém, oeste do estado do Pará, onde suas folhas são utilizadas e indicadas, pela população local, em forma de infusão, para o controle de glicemia e como calmante.

2.2 Composição química volátil do gênero *Phyla*

A família Verbenaceae possui uma multiplicidade de compostos químicos, em especial carvacrol, timol, citral, geraniol, sesquiterpenóides e terpenóides (COSTA et al., 2017). Para o gênero *Phyla*, foram identificados em *Phyla nodiflora* flavonóides, alcalóides, resina, açúcares, hispidulina, esteróis, saponinas, taninos e cumarinas (SHARMA; SINGH, 2013; OMBITO et al., 2014).

2.3 Cultivo *in vitro* de plantas medicinais

As plantas medicinais e aromáticas pertencem a um grande grupo de plantas de interesse devido aos seus valores nutricionais, cosméticos e farmacêuticos (RASOOL HASSAN, 2012), elas mantem sua importância na busca de novas e valiosas fontes de drogas e compostos bioativos, fazendo com que a demanda por estas espécies aumente, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (GHORBANPOUR et al., 2017).

A utilização de técnicas de cultura de tecidos vegetais, em especial a propagação *in vitro* ou micropropagação, é uma forma de cultivo sustentável que garante a produção e multiplicação rápida do material vegetal em condições assépticas, a partir de células, órgãos, tecidos ou mesmo da planta inteira, sob condições controladas de fatores ambientais e nutricionais (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Estas condições incluem a composição do meio de cultivo (combinação de macros e micronutrientes essenciais, uma fonte de carbono e o pH), e a condição ambiental das salas de crescimento (temperatura, fotoperíodo e intensidade de luz) (SOUZA; RESCAROLLI; NUNEZ, 2018).

Dentre as vantagens da utilização de cultura de tecidos vegetais para a produção de plantas medicinais, pode-se citar: produção de material de alta qualidade para a indústria farmacêutica (MORAIS et al., 2012); obtenção de compostos medicinais de interesse (MURTHY; LEE; PAEK, 2014); além de ser uma ferramenta com alto potencial para a preservação de fontes vegetais, pois evita a coleta de espécies selvagens ameaçadas de extinção (PIERIK, 1997). A cultura de tecidos permite ainda o estudo dos mecanismos de defesa antioxidante das plantas, permitindo a triagem de plantas cultivadas sob condições controladas através da observação das alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (SHAHZAD et al., 2017).

Neste contexto, a micropropagação é uma alternativa para produção de plantas medicinais, pois permite a obtenção de um material vegetal de alta qualidade, livre de patógenos, e em escala comercial (CID, 2015; MORAIS et al., 2012). Além disso, essa produção é independente de condições climáticas e sazonais. Entretanto, essa técnica apresenta alguns fatores que podem comprometer ou melhorar o ambiente de cultivo, possibilitando melhores condições de crescimento e desenvolvimento das plântulas. Dentre essas condições podemos destacar o emprego de sistemas de ventilação natural (SVN) e o controle da qualidade e intensidade de luz.

2.4 Sistema de ventilação natural (SVN)

No cultivo *in vitro* convencional utiliza-se recipientes vedados, que impossibilitam as trocas gasosas com o ambiente externo. Tal condição previne a desidratação das plantas e do meio de cultivo. Nesse microambiente há redução de gás carbônico (CO₂), acúmulo de etileno e alta umidade relativa (SCHUELTER et al., 2015). Esses fatores podem causar prejuízo às características morfoanatômicas e fisiológicas, como descompasso no aparato fotossintético, hiperhidricidade, presença de estômatos anormais, e assim comprometer o crescimento e dificultar o processo de aclimatização das plantas (HAZARIKA, 2006; ISAH, 2015; SCHUELTER et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2012).

No sistema convencional de cultivo *in vitro* uma fonte exógena de carbono (sacarose) é empregada no meio de cultura como fonte de energia, podendo favorecer a contaminação do meio de cultivo por microrganismo (XIAO; KOZAI, 2005). Além disso, Hazarika (2006) e Kozai (1991), relatam que a presença da sacarose no meio de cultura dificulta a recuperação das características autotróficas, dificultando o processo de aclimatização das plantas. A implementação do sistema alternativo de ventilação natural tem sido uma alternativa para reduzir os problemas encontrados na micropropagação convencional. Esse sistema é caracterizado pela facilitação das trocas gasosas no frasco de cultivo através de uma vedação especial do recipiente com material que evita a contaminação e o ressecamento do explante (SALDANHA et al., 2012).

O sistema de ventilação natural favorece o processo de trocas gasosas, dessa forma, aumenta a concentração de CO₂, mantendo em condições adequadas para a realização da fotossíntese, além de promover um sistema radicular mais desenvolvido, redução da umidade relativa e do acúmulo de etileno (KOZAI; XIAO, 2008; SALDANHA et al., 2012; HOANG et al., 2017). Além disso, a quantidade de sacarose (fonte de carbono) pode ser reduzida, diminuindo o risco de contaminação do meio de cultivo e reduzindo os custos de produção, além de aumentar a sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização (XIAO; KOZAI, 2005).

Vários trabalhos apresentam resultados positivos quanto ao uso do sistema de ventilação natural na micropropagação de plantas medicinais. Silva et al. (2017) estudando os efeitos do sistema de ventilação natural sob o cultivo *in vitro* de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae); Lazzarini et al. (2019) em plântulas de *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae); e Silva et al. (2014), em plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae).

2.5 Influência da luz no cultivo *in vitro* de plantas

A luz é fonte primária de energia e por isso é considerada um importante fator ambiental na regulação da fotossíntese e fotomorfogênese das plantas, sobretudo para àquelas cultivadas em ambientes controlados (JOHKAN et al., 2012). Segundo Costa et al. (2009), os diferentes comprimentos de ondas e a intensidade luminosa podem afetar a morfoanatomia e a fisiologia das plantas. Em ambiente *in vitro*, as plantas necessitam de condições ótimas de luminosidade, portanto, é necessário controlar a duração da exposição à luz (fotoperíodo), o comprimento de onda e a densidade de fluxo fótons, pois essas são as grandezas físicas da luz que mais influenciam o crescimento e a morfogênese das plantas (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Nas salas de crescimento, normalmente são utilizadas a luz branca fria emitida por lâmpadas fluorescentes (ROCHA; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2015). Essas lâmpadas dispõem de um espectro amplo e heterogêneo, que podem interferir no crescimento e desenvolvimento das plantas, além de consumirem muita energia elétrica enquanto geram calor (YEH; CHUNG, 2009). No entanto, o emprego de Diodos de Emissão de Luz (*LEDs*) tem sido proposto como fonte de luz promissora para o cultivo *in vitro* de plantas, por apresentarem várias vantagens e afetarem positivamente o crescimento de explantes (LAZZARINI et al., 2017; ROCHA et al., 2017).

De acordo com Yeh e Chung (2009), as lâmpadas *LEDs* possuem alta eficiência no processo de geração de luz com baixa produção de calor, o que pode refletir no menor consumo de energia elétrica; longo período de vida útil; comprimento de onda específico, possibilitando que a composição espectral e a densidade de fluxo de fótons sejam ajustadas. Além disso, o uso de *LEDs* possibilita produção de mudas com melhor qualidade, incrementando o crescimento das brotações e concentração de pigmentos fotossintetizantes, conseqüentemente, apresentando maior eficiência no processo produtivo (ROCHA; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2015; TARAKANOV et al., 2012).

Vários pesquisadores têm investigado os efeitos de diferentes *LEDs* na micropropagação de plantas. No estudo realizada por Cioć et al. (2017), com a espécie *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) cultivada sob diferentes espectros de lâmpadas *LEDs*, observou-se um efeito estimulante da luz vermelha na taxa de multiplicação, maior aumento no comprimento da parte aérea e nas concentrações de polifenóis antioxidantes. Li; Xu; Tang (2010) notaram que plântulas de *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae) cultivadas *in vitro* sob *LED* azul obtiveram maior teor de clorofila, e melhor desenvolvimento da espessura foliar, do tecido paliçádico, da área foliar e dos estômatos. Segundo Lazzarini et al. (2018), a espécie

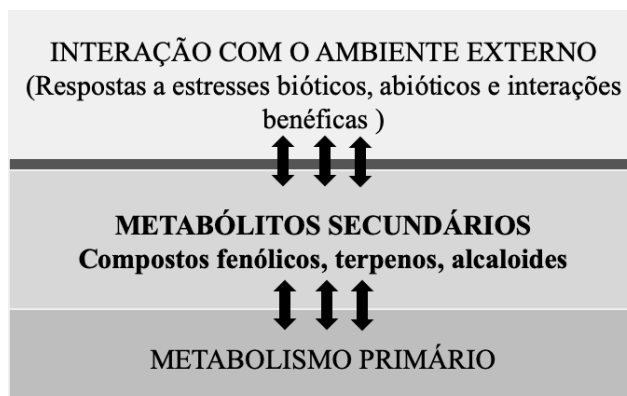
Lippia gracilis quando cultivada *in vitro* sob LED vermelho apresentou melhor crescimento e sob LED azul, otimizou a produção de pigmentos fotossintéticos e de carvacrol.

A intensidade de luz é um fator indispensável no processo fotossintético das plantas. Geralmente, a baixa densidade de fluxo luminoso nas salas de crescimento pode limitar o desenvolvimento eficiente de mecanismos fotossintéticos e fotoprotetores (SÁEZ et al., 2012; SÁEZ et al., 2013). Em estudo realizado por Singh et al. (2017), os autores observaram que intensidades mais elevadas favoreceram a produção de matéria fresca e seca de plântulas de *Acer saccharum* Marsh. (Sapindaceae) cultivadas *in vitro*. Lazzarini et al. (2018) investigando o efeito de diferentes intensidades luminosas na propagação *in vitro* de *Lippia gracillis*, concluíram que a luz afeta o crescimento, a produção de pigmentos fotossintéticos e compostos voláteis.

2.6 Metabolismo secundário, compostos fenólicos e defesa antioxidante

A diversidade de produtos químicos produzidos pelos vegetais pode ser classificada como metabólitos primários ou secundários, estes metabólitos são encontrados em uma ou várias partes da planta, e são responsáveis por múltiplas atividades biológicas, entre elas os mecanismos de defesa antioxidante dos vegetais (WAIZEL-BCUAY; WAIZEL-HAIAT, 2016; TAIZ et al., 2017). Os metabólitos primários ou basais, são compostos produzidos por todas as plantas e estão envolvidos no crescimento e no desenvolvimento vegetal, já os metabólitos secundários ou especiais, são espécie-específicos e sua produção encontra-se na interface entre o metabolismo primário e as interações ambientais (FIGURA 2), muitas vezes são formados em fases muito específicas do desenvolvimento das plantas, contribuindo com a modulação de respostas ao estresse abiótico (AHMED et al, 2017; KREIS; MUNKERT; DE PÁDUA, 2017).

Figura 2 - Interface da produção de metabólitos secundários.



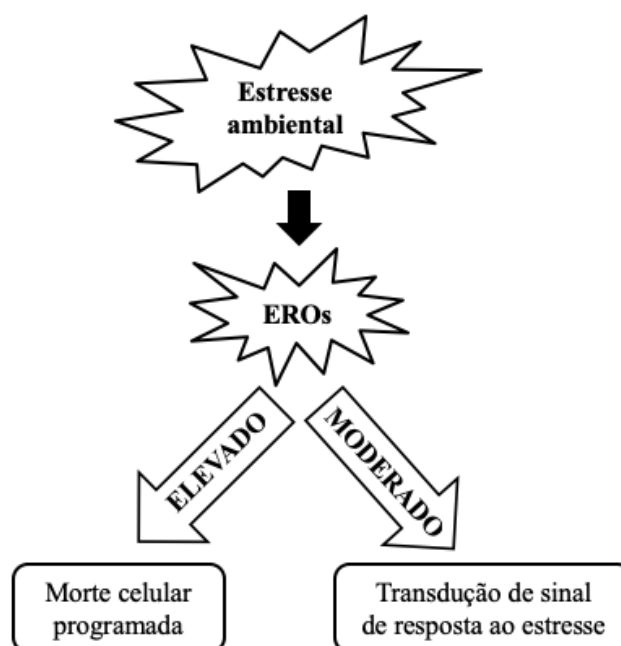
Fonte: Adaptado de Taiz et al. (2017).

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma variedade de estruturas simples e complexas, abrangem os fenóis, ácidos fenólicos e flavonoides, sendo ressaltada sua participação na defesa das plantas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010; LI et al., 2014; AHMED, et al, 2017).

Naturalmente as plantas encontram-se expostas a uma variedade de fatores ambientais que podem afetar as suas condições ideais de crescimento, fazendo com que esses vegetais aumentem a produção das chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) na tentativa de garantir sua sobrevivência e reprodução (TAIZ, et al., 2017). Além disso, as EROs são um subproduto do metabolismo normal, sendo geradas a partir de reações metabólicas celulares como a fotossíntese, respiração, fotorrespiração e oxidação lipídica (DAKAH et al., 2014; DIETZ et al. 2016).

As EROs são formas de oxigênio altamente reativas que possuem ao menos 1 elétron não pareado em seus orbitais, sendo o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o oxigênio singlete (1O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\bullet$), as formas mais comuns encontradas em células vegetais (SHARMA et al., 2012). As EROs são necessárias para muitas reações importantes de sinalização, mas também são subprodutos tóxicos do metabolismo aeróbico, podendo ter um efeito positivo através da sinalização para a indução de respostas ao estresse, ou negativo quando ocasiona morte celular (FIGURA 3) (MITTLER, 2017; TAIZ, et al., 2017).

Figura 3 - Papel das espécies reativas de oxigênio (EROs).



Os níveis de EROs são controlados por mecanismos de defesa antioxidantes, os quais são divididos em duas classes: com e sem atividade enzimática. Os que possuem atividade enzimática atuam através da remoção das EROs bloqueando o início da oxidação, já os não enzimáticos operam a partir da interação com as espécies radicalares, sendo consumidos no decorrer da reação (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). Diante desta classificação, dentre os enzimáticos temos superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase, e não enzimáticos, ascorbato, glutatona, vitamina E e carotenoides (SOUSA et al., 2013).

Na literatura são descritos diversos ensaios utilizados na investigação da defesa antioxidante conforme os diferentes mecanismos de ação, dentre eles: a quantificação de compostos fenólicos totais (CFT), um ensaio baseado na detecção da presença de todas as substâncias reduzidas pelo reagente Folin-Ciocalteu (BOROSKI et al., 2015); a capacidade antioxidante total (CAT), um teste que consiste na redução de Md^{+6} a Md^{+5} , com a formação de fosfato de molibdênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999); a captura do radical livre DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazila), avaliado a partir de uma reação de oxidação e redução entre o DPPH e a espécie antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995); o poder quelante, quantificado a partir da porcentagem de inibição de formação do íon $[Fe^{2+}(ferrozina)_3]^{2+}$ (LOPES; SCHULMAN; HERMES-LIMA, 1999); o poder redutor ou método FRAP, ensaio que determina a força de redução de uma amostra, utilizando o reagente ferricianeto de potássio, através da formação inicial de um complexo oxidativo de Fe^{3+} , após reação com cloreto férrico (VASCONCELOS et al., 2007); e a capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC), teste que avalia a atividade antioxidante de uma amostra, a partir da degradação da fluoresceína (BOROSKI et al., 2015).

2.7 Anatomia vegetal

Diversos fatores podem causar desordens estruturais em plântulas cultivadas *in vitro*, e estas desordens podem ser o motivo de baixas taxas de sobrevivência das plantas, quando transferidas para condições *ex vitro*. Por ser um ótimo indicador de adaptação ambiental, as análises anatômicas permitem avaliar quais são as características que contribuem para a tolerância das plântulas a diferentes condições de cultivo (SANTIAGO, 2001).

A intensidade luminosa pode afetar o desenvolvimento foliar através de modificações na espessura e diferenciação do mesófilo, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (LEE et al., 1988). Assim como a intensidade de luz, mudanças na qualidade espectral da luz também podem afetar a estrutura anatômica das folhas, parecendo exercer maiores efeitos na

fase de expansão foliar (SAEBO; KREKLING; APPELGREN, 1995; SCHUERGER; BROWN; STRYJEWSKI, 1997; SIMS; PEARCY, 1992).

Apesar da folha ser o órgão vegetativo que exibe maior capacidade de adaptação frente as mudanças ambientais (GUERRA; SCREMIN-DIAS, 2017), modificações no caule e raiz também são muito importantes.

Diversos estudos tem demonstrando as modificações anatômicas de plântulas submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. Silva Júnior et al., 2012 estudaram as variações anatômicas de *Laelia purpurata* var. *cárnea* (Orchidaceae) cultivada sob diferentes intensidades e qualidade de luz. Silva et al., 2014 avaliaram o efeito da luz e do sistema de ventilação natural em plântulas de *Ananas comosus* L. cv Imperial (Bromeliaceae) micropropagadas. E Rogova et al., 2015 avaliaram a morfoanatomia de *Achillea thracica* velen. (Compositae) cultivada *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- AFREEN, F. Physiological and anatomical characteristics of *in vitro* photoautotrophic plants. In: KOZAI T.; AFREEN F.; ZOBAYED S. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Dordrecht: Springer, 2005.
- AHMED, E.; ARSHAD, M.; KHAN, M. Z.; AMJAD, M. S.; SADAF, H. M.; RIAZ, I.; SABIR, S.; AHMAD, N.; SABAOON. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. **Journal of Pharmacology and Phytochemistry**, v.6, n. 2, p. 205-2014, 2017.
- ATKINS, S. Verbenaceae. In: **The Families and Genera of Flowering Plants**, v. 7, Lamiales. Berlin: Springer, 2004.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. de. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. Curitiba: Appris, 141p, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- ČAMAGAJEVAC, I. Š.; PFEIFFER T. Ž.; MARONIĆ D. Š. (2018) Abiotic stress response in plants: the relevance of tocopherols. In: GUPTA D., PALMA J., CORPAS F. **Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants**. Springer, Cham, 2018. p. 233-251.
- CARVALHO, J. S. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2010. cap. 20, 1104p.
- CASTILHO, C. V.V.; LEITÃO, S. G.; SILVA, V. D.; MIRANDA, C. de O.; SANTOS, M. C. da S.; BIZZO, H. R.; NINA C. B. SILVA da. *In vitro* propagation of a carvacrol-producing type of *Lippia organoides* Kunth: A promising oregano-like herb. **Industrial Crops & Products**, v. 130, p. 491-498, 2019.
- CAVERZAN, A.; CASASSOLA, A.; BRAMMER, S. P. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes Involved in Plant Tolerance to Stress. In: SHANKER, A. K.; Shanker, C. **Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives**. Publisher: InTech, Capters published, 2016. cap. 20, p. 463-480.
- CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4. ed. Brasília: Embrapa, 2015.
- CIOĆ, M.; SZEWCZYK, A.; ŻUPNIK, M.; KALISZ, A.; PAWŁOWSKA, B. LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 3, p. 433-447, 2017.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; CASTRO, E. M. Anatomical and physiological modifications of micropropagated 'Caipira' banana plants under natural light. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 323-330, 2009.

COSTA, P. S.; SOUZA, E. B. DE; BRITO, E. H. S. DE; FONTENELLE, R. O. dos S. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia sensu lato* (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 158-171, 2017.

DAKAH, A.; ZAID, S.; SULEIMAN, M.; ABBAS, S.; WINK, M. *In vitro* propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 317-323, 2014.

DIETZ, K. J.; MITTLER, R.; NOCTOR, G. Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. **Plant Physiol**, v. 171, n. 3, p. 1535–1539, 2016.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Raven|Biologia vegetal**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2014. 1.637 p.

FRANÇA, F., O'LEARY, N., SALIMENA, F.R.G. 2015. Phyla in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GHORBANPOUR, M.; HADIAN, J.; NIKABADI, S.; VARMA, A. Importance of Medicinal and Aromatic Plants in Human Life. Chapter 1. *In*: GHORBANPOUR, M.; VARMA, A. (eds.), **Medicinal Plants and Environmental Challenges**. 2017. 409 p.

GUERRA, A.; SCREMIN-DIAS, E. Leaf traits, sclerophylly and growth habitats in plant species of a semiarid environment. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 1, p.

GUGLIERI-CAPORAL, A.; CAPORAL, F. J. M.; POTT, A. Phytosociology of sown pasture weeds under two levels of degradation in Brazilian savanna areas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 312-321, 2010.

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

HOANG, N. N.; KITAYA, Y.; MORISHITA, T.; ENDO, R.; SHIBUYA, T. A comparative study on growth and morphology of wasabi plantlets under the influence of the micro-environment in shoot and root zones during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, n. 2, p. 255-263, 2017.

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

JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HAHIDA, S.; YOSHIHARA, T. Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 75, p. 128-133, 2012.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 27, p. 47-51, 1991.

KOZAI, T.; XIAO, Y. A commercialized photoautotrophic micropropagation system. In: In: GUPTA, S.D., IBARAKI, Y. **Plan Tissue Culture Engineering**. Springer, Dordrecht, vol 6. p. 355-371. 2008.

KREIS, W.; MUNKERF, J.; DE PÁDUA, R. M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre. Artmed, 2017. cap. 11, 486p.

LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; COELHO, A. D.; MEDEIROS, A. P. R.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; SOARES, J. D. R. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137-144, 2017.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V.; SANTOS, J. dos; SILVA, S. T.; CARVALHO, A. A. de; PINTO, J. E. B. P. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, n. 3, p. 367-379, 2018.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CARVALHO, A. A. de; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; YUCESAN, B.; PINTO, J. E. B. Explant type and natural ventilation systems influence growth and content of carvacrol and thymol of *Lippia gracilis* Schauer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, n. 1, p. 33-43, 2019.

LEAL, R. H. **Prospecção de plantas aromáticas na região do Médio e Baixo Solimões**. 2010. 175 f. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração Química Orgânica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*- and *in vivo* developed Sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.1, p.167-171, Jan. 1988.

LI, H.; XU, Z.; TANG, C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 103, n. 2, p. 155-163, 2010.

LI, A. N.; LI, S.; ZHANG, Y.; XU, X.; CHEN, Y.; LI, H. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020-6047, 2014.

LOPES, G. K.B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

- MARX, H. E.; O'LEARY, N.; YUAN, Y.-W.; LU-IRVING, P.; TANK, D. C.; MÚLGURA, M. E.; OLMSTEAD, R. G. Molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 10, p. 1647-1663, 2010.
- MELO, J. I. M. de; ALVES, I. de M.; SOUSA, R. T. M. de; BARBOSA, L. M. M. A.; ANDRADE, W. M. de. Verbenaceae sensu lato em um trecho da ESEC Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 41-47, 2010.
- MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends Plant Science**, n. 22, v. 1, p. 11-19, 2017.
- MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.
- MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.
- MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1-16, 2014.
- O'LEARY, N. *Phyla in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível. Acesso em: 15 Fev. 2019.
- O'LEARY, N.; MÚLGURA, M. E. A Taxonomic Revision of the Genus *Phyla* (Verbenaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 98, n. 4, p. 578-596, 2011.
- OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; FERNANDES, P. D.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 206-214, 2014.
- OMBITO, J. O.; SALANO, E. N.; YEGON, P. K.; NGETICH, W. K.; MWANGI, E. M. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, n. 4, p. 460-466, 2014.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Springer Science & Business Media, 1997.
- PINTO, E.P.P., AMOROZO, M.C.M., FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n4, p. 751-762. 2006.
- PIVARI, O. M.; OLIVEIRA, V. B. de; COSTA, F. M.; FERREIRA, R. M.; SALINO, A. Macrófitas aquáticas do sistema lacustre do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 4, p. 759-770, 2011.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

RASOOL HASSAN, B. A. Medicinal Plants (Importance and Uses). **Pharmaceut Anal Acta**, n. 3, v. 10. 2012.

REDDY, A. R. AND RAGHAVENDRA, A. S. Photooxidative stress. In: MADHAVA RAO, K.V.; RAGHAVENDRA, A.S.; JANARDHAN REDDY, K. **Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants**. Springer. Printed in the Netherlands. 2006, cap. 6, p. 157-186.

ROCHA, P. S. G. da; OLIVEIRA, R. P.de; SCIVITTARO, W. B.; MOSELE, S. H. Uso de LEDs na multiplicação *in vitro* de três cultivares de bananeira. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 11, n. 2, p. 247252, 2017.

ROCHA, P. S. G. da; OLIVEIRA, R. P.de; SCIVITTARO, W. B. New light sources for *in vitro* potato micropropagation. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 5, p. 1312-1318, 2015.

ROGOVA, M.; GANEVA, TS.; STEFANOVA, M.; KOLEVA, D.; TOTEVA, V. K. Morphoanatomical study of *in vitro* propagated and *ex vitro* adapted *Achillea thracica* velen. Plants. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 21, n. 5, p. 947-950, 2015.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.41, n.2, p.177-185, 1995.

SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; LATSAGUE, M. I.; TONEATTI, M. J.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. G. Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant Science**, v. 201-202, n. 1, p. 12–24, 2013.

SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; SÁEZ, K. L.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; LATSAGUE, M. I.; RÍOS, D. G. Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of *Castanea sativa*: A comparison between *in vitro* and nursery plants. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 1, p. 15-24, 2012.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G; AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng .) Pedersen]. **Plant Cell, Tiss Organ Cult**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.

SALIMENA, F. R. G.; KUTSCHENKO, D. C.; MONTEIRO, N. P.; MYNSSEN, C. Verbenaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da Flora do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.

SANTOS, A. C. B.; NUNES, T. S.; COUTINHO, T. S.; SILVA, M. A. P. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 980-991, 2015.

SANTIAGO, E. J. A. DE; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M. DE; LAMEIRA, O. A.; CONCEIÇÃO, H. E. O. DA; GAVILANES, M. L. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia** v.25, n.5, p.1035-1042, 2001.

- SCHUERGER, A.C.; BROWN, C.; STRYJEWSKI, E.C. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, London, v.79, n.3, p.273-282, 1997.
- SCHUELTER, A. R.; LUZ, C. L.; SCHERER, A. M.; SOUZA, C. S.; STEFANELLO, S. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial *in vitro* de plântulas de Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 183-190, 2015.
- SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; PARVEEN, S.; SAEED, T.; SHAHEEN, A.; AKHTAR, R.; YADAV, V.; UPADHYAY, A.; AHMAD, Z. Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture. Chapter 1. **Plant Biotechnology: Principles and Applications**. Springer, Singapore, 2017.
- SHARMA, R.A.; SINGH, R. A Review on *Phyllanthus nodiflora* Linn.: A Wild Wetland Medicinal Herb. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, n. 20, v. 1, p. 57-63, 2013.
- SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p.1-26, 2012.
- SILVA, A. B. da; CORREA, V. R. S.; TOGORO, A. H.; SILVA, J. A. dos S. Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) MICROPROPAGADO. **Ciência Rural**, v.42, n.3, p. 380-386, 2014.
- SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. In vitro growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, v. 61, n. 6, p. 883-890, 2014.
- SILVA JÚNIOR, M. DA S.; CASTRO, E. M. DE; RODRIGUES, M.; PASQUAL, M.; BERTOLUCCI, S. K. V. Variações anatômicas de *Laelia purpurata* var. *cárnea* cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades e qualidade espectral de luz. **Ciência Rural**, v. 42 n. 3, 2012.
- SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CUNHA, S. H. B.; LAZZARINI, L. E. S.; TAVARES, M. C.; PINTO, J. E. B. P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017.
- SIMS, D.A.; PEARCY, R.W. Response of leaf anatomy and photosynthetic capacity in *Alocasia macrorrhiza* (Araceae) to a transfer from low to high light. **American Journal of Botany**, Columbus, v.79, n.4, p.449-455, 1992.
- SINGH, A. S.; JONES, A. M. P.; SHUKLA, M. R.; SAXENA, P. K. High light intensity stress as the limiting factor in micropropagation of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 2, p. 209-221, 2017.
- SOUZA, E. O.; ROCHA, J. B. T.; BARROS, L. M.; BARROS, A. R.C.; COSTA, J. G.M. Phytochemical characterization and *in vitro* antioxidant properties of *Lantana camara* L. and *Lantana montevidensis* Briq. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 517-522, 2013.

SOUZA, J. C. de; RESCAROLLI, C. L. de S.; NUNEZ, C. V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, v. 12, n. 3, p. 269-280, 2018.

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

TARAKANOV, I.; YAKOVLEVA, O.; KONOVALOVA, I.; PALIUTINA, G.; ANISIMOV, A. Light-emitting diodes: On the way to combinatorial lighting technologies for basic research and crop production. In: VII International Symposium on Light in Horticultural Systems. **Acta Horticulturae**, v. 956, p. 171-178, 2012.

TROPICOS. org. Missouri Botanical Garden. 19 May 2018. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/33700979>. Acesso em: 19 mai. 2018.

VASCONCELOS, A. G. V. de; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 837-844, 2012.

VASCONCELOS, S. M. L., GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. DE F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. DA S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 2007.

VERBENACEAE. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Acesso em: 10 abr. 2019.

VERMA S.; NIZAM, S.; VERMA, P. K. Biotic and abiotic stress signaling in plants. In: SARWAT, M.; AHMAD, A.; ABDIN, M. Z. **Stress signaling in plants: genomics and proteomics perspective**. New York, USA: Springer, 2013. V. 2, p. 25-49.

WAIZEL-BUCAY, J.; WAIZEL-HAIAT, S. Las especias o condimentos vegetales. ¿Sólo saborizantes o también remedios medicinales? **An Orl Mex**. v. 61, n. 3, p. 208-230, 2016.

XIAO, Y.; KOZAI, T. A commercialized photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer, 2005.

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

ZAMORA, C. M. P.; TORRES, C. A.; NUÑEZ, M. B. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing South America. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 544, 2018.

CAPÍTULO 2 - CONCENTRAÇÕES DE SAIS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Phyla betulifolia* (KUNTH) GREENE

RESUMO

Phyla betulifolia (Kunth) Greene (Verbenaceae) é uma espécie que apresenta potencial uso medicinal, sendo utilizada como calmante e no controle do diabetes na região do oeste do Pará. Visando o estabelecimento e manutenção *in vitro* desta espécie, segmentos apicais e nodais foram inoculados em meio MS contendo três concentrações de sais: MS completo, MS com metade da concentração de sais (MS/2) e MS com um quarto das concentrações de sais (MS/4). Após 60 dias de cultivo *in vitro*, as plântulas cultivadas em meio MS e MS/2 foram transferidas para casa de vegetação, passando pela fase de aclimatização. Os segmentos nodais cultivados em meio MS completo apresentaram maior porcentagem de sobrevivência e melhor desenvolvimento. Quanto ao processo de aclimatização, tanto as plantas oriundas do cultivo *in vitro* em meio MS quanto as do MS/2 apresentaram-se bem vigorosas.

Palavras-chave: Manutenção *in vitro*. Segmentos apicais. Segmentos nodais. Verbenaceae. Aclimatização.

CHAPTER 2 - CONCENTRATIONS OF SALTS ON *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF *Phyla betulifolia* (KUNTH) GREENE

ABSTRACT

Phyla betulifolia (Kunth) Greene (Verbenaceae) is a species that presents a potential medicinal use, being used for diabetes control and as tranquilizer in the western region of Pará. Aiming the establishment and maintenance of this species *in vitro*, apical and nodal segments were inoculated in MS medium containing three concentrations of salts: MS complete, MS with half of the concentration of salts (MS/2) and MS with one fourth of the concentrations of salts (MS/4). After 60 days of *in vitro* cultivation, the cultivated plantlets in MS and MS/2 medium were transferred to greenhouse, passing through an acclimatization phase. Nodal segments cultured in complete MS medium showed a higher percentage of survival and better development. Regarding the acclimatization process, both plants from *in vitro* culture in MS medium and MS/2 medium were vigorous.

Keywords: *In vitro* maintenance. Apical segments. Nodal segments. Verbenaceae. Acclimatization.

1 INTRODUÇÃO

A micropropagação é uma técnica utilizada para melhorar a qualidade dos produtos agrícolas, dentre eles as plantas medicinais. Nessa perspectiva, os meios nutritivos e sua composição são fatores determinantes para a conversão dos explantes em plântulas e das plântulas em mudas (CID, 2015), sendo a definição do meio de cultura a base para o estabelecimento de protocolos de cultivo *in vitro* (ARARUNA et al., 2017).

O meio de cultivo é a fonte de substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento do explante (PINHAL et al., 2017). Em sistemas de cultivos *in vitro* o suprimento dos nutrientes minerais no meio de cultura é essencial, apresentando variações conforme a espécie vegetal e o processo de cultivo (COSTA et al., 2007; GREENWAY et al., 2012; MARTINS et al., 2015).

Os sais inorgânicos fornecem os macronutrientes (cálcio, magnésio, enxofre, potássio, fósforo e nitrogênio) e os micronutrientes (zinco, ferro, cobre, manganês, cloro, molibdênio e boro), esses elementos são considerados essenciais para o desenvolvimento da planta (CID, 2015). Apesar de não haver uma formulação padrão, diversas espécies, desde arbóreas até medicinais, tem apresentado bons resultados quando cultivadas em meio MS (Murashige; Skoog, 1962), podendo haver modificações e diluições, de acordo com a necessidade nutricional de cada espécie (MONFORT et al., 2015).

O uso de plantas medicinais com fins farmacêuticos pode ser prejudicado por muitos fatores, como por exemplo, a heterogeneidade dos indivíduos devido a variabilidade genética e bioquímica, além da dificuldade de multiplicação, sendo importante a realização de estudos que viabilizem o cultivo em larga escala e a conservação das espécies (MORAIS, 2012; GHORBANPOUR et al., 2017). Muitos trabalhos tem sido realizados quanto aos princípios ativos das plantas medicinais, entretanto, ainda há carência de estudos sobre o cultivo, multiplicação e conservação *in vitro* dessas espécies.

Phyla betulifolia (Kunth) Greene - Verbenaceae, conhecida popularmente como “capim-doce”, é uma espécie aromática que tem suas folhas utilizadas na forma de infusão para o controle do diabetes e como calmante. Na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos sobre a micropropagação de *P. betulifolia*.

Diante deste contexto, objetivou-se determinar a melhor concentração de sais em meio MS e do tipo de explante (apical ou nodal) para o estabelecimento e manutenção *in vitro* de *Phyla betulifolia*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos e identidade do material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura - DAG da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Minas Gerais. O material botânico encontra-se depositado nos Herbários da ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil) e no PANG (Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), correspondendo aos números de registro ESAL 30314 e PAMG 57966.

2.2 Estabelecimento da cultura *in vitro*

2.2.1 Processo de assepsia

Os explantes foram retirados de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação. O primeiro e segundo segmentos nodais de ramos de *Phyla betulifolia* (± 1 cm) foram lavados em água corrente e sabão neutro por 15 min, em seguida, transferidos para câmara de fluxo laminar asséptico, onde foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 50% + Tween 20[®] sob agitação por 15 min e, por fim, lavados três vezes em água destilada e autoclavada.

2.2.2 Estabelecimento de segmentos *in vitro*

Após a desinfestação, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (20 x 150 mm), contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), em três concentrações de sais: MS completo, MS com metade da concentração de sais (MS/2) e MS com 1/4 da concentração de sais (MS/4). Os meios foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 0,6 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®], tipo I) e o pH 5,7 \pm 0,1 ajustado com NaOH e HCL antes da autoclavagem (120 °C e 1 atm por 20 minutos). Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h de luz, temperatura de 25 \pm 1 °C e irradiância de 32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpada fluorescente branca fria).

Passados 15 dias do estabelecimento do segmento primário em meio MS, MS/2 e MS/4, o comprimento da brotação e a porcentagem de sobrevivência foram avaliados, sem que as plântulas fossem retiradas do tubo de ensaio. Em seguida, as plântulas inoculadas em meio MS e MS/2, por apresentarem melhor crescimento, foram repicadas e transferidas para os respectivos meios de cultura.

O estudo do crescimento *in vitro*, ocorreu após 45 dias, a partir da análise dos seguintes parâmetros: comprimento de broto (CB) e de raiz (CR); matéria seca de folha (MSF), caule (MSC), raiz (MSR) e total (MST); e área foliar total (AFT).

AFT foi mensurada por meio do software WinFOLIA™ e do scanner EPSON PERFECTION V700 PHOTO, e a partir dos dados obtidos para AFT e acúmulo de matérias secas, foram calculados os índices fisiológicos de crescimento: razão de área foliar (RAF = AFT/MS_{total}), área foliar específica (AFE = AFT/MS_{folhas}), e razão de peso das folhas (RPF = MS_{folha}/MS_{total}), seguindo as recomendações descritas em Benicasa (2003).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), 3x7, composto por 3 concentrações de sais: MS, MS/2 e MS/4 e 7 repetições (com 5 tubos), com 1 explante por tubo, totalizando 105 plântulas.

2.2.3 Aclimatização das plantas em casa de vegetação

Após 60 dias de cultivo *in vitro*, foram retiradas 10 plântulas de cada tratamento (MS e MS/2) as quais foram transferidas para bandejas de poliestireno e substrato comercial, e mantidas em casa de vegetação sob sistema de fertirrigação por 40 dias. Ao final, foram calculados a porcentagem de sobrevivência (%), e o comprimento de caule (CC) e raiz (CR).

2.2.4 Taxa de crescimento absoluto (TCA) ou velocidade média de crescimento

Após o estabelecimento *in vitro* de *Phyla betulifolia*, segmentos apicais e nodais cultivados em meio MS foram utilizados para calcular a taxa de crescimento absoluto (TCA) conforme descrito em Benicasa (2003). Um total de 140 plântulas oriundas de cada segmento (totalizando 280) foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura MS, mantendo as mesmas condições *in vitro* das plântulas pré-estabelecidas.

O material vegetal foi avaliado a cada 5 dias, com início no dia zero (dia da inoculação) até completar 30 dias, totalizando 7 avaliações. A cada avaliação, foram mensurados os valores de peso fresco e seco utilizados para a construção de uma curva de crescimento e, foi calculada a taxa de crescimento absoluto (TCA) (Benicasa, 2003).

$$TCA = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1}$$

Onde: P₁ e P₂ são o peso da matéria seca em duas amostragens sucessivas; e t₁ e t₂ correspondem ao intervalo de tempo entre as duas amostragens.

2.2.5 Taxa de multiplicação

A taxa de multiplicação *in vitro* foi avaliada a partir da multiplicação de segmentos apicais e nodais pré-estabelecidos, como descrito anteriormente.

Foram realizados quatro subcultivos (4 cultivos seguidos) das plântulas, com intervalos de 30 dias entre cada um. Ao final de cada subcultivo as plântulas obtidas serviram como fonte de explante para o próximo, e foi utilizado o meio de cultura MS sem a adição de regulador de crescimento.

Ao final de seis subcultivos, foi estimado por inferência, o número de plântulas obtidas a partir de um único explante. Esta inferência, foi realizada considerando que a partir do segundo subcultivo, manteve-se a produção de plântulas com quatro nós, sendo assim fonte de quatro explantes para o próximo subcultivo.

2.3 Análise estatística

Os parâmetros de crescimento foram submetidos a análise de variância e, quando significativo, foram comparados pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento e aclimatização

Aos 15 dias, os segmentos nodais cultivados em meio MS completo apresentaram maior crescimento e sobrevivência, quando comparados aos segmentos mantidos em MS/2 e MS/4 (TABELA 1), sendo observado um incremento de 50% no comprimento do broto e 21% na sobrevivência dos explantes.

Tabela 1 - Comprimento de brotação (cm) e sobrevivência (%) de plântulas de *Phyla betulifolia*, aos 15 dias de cultivo *in vitro*.

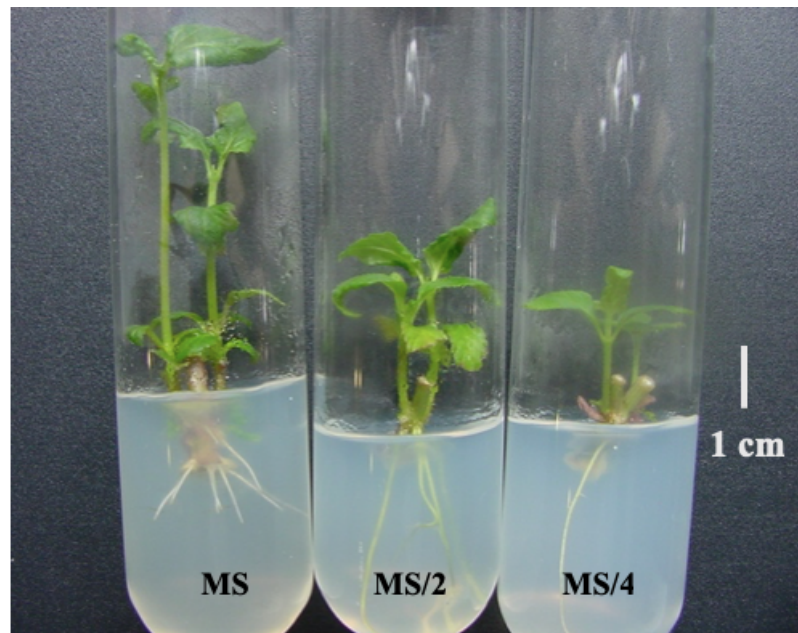
Concentrações de sais	CB (cm)	Sobrevivência (%)
MS	2,09a	68,57a
MS/2	1,22b	54,28b
MS/4	1,03b	54,28b

Legenda: CB - Comprimento de broto; MS - meio de cultura completo, MS/2 - MS com metade da concentração de sais, e MS/4 - MS com 1/4 da concentração de sais. As médias seguidas de mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

As diferentes concentrações de sais não inibiram o crescimento de raízes, sendo a porcentagem de enraizamento das plântulas igual a 100%. Entretanto, na figura 1 é possível observar que as diluições de meio comprometeram tanto o comprimento quanto o número de raízes. De acordo com Taiz et al. (2017), a supressão do crescimento e da reprodução vegetal causadas pelo estresse nutricional está relacionada a função essencial dos nutrientes minerais que são componentes de enzimas e constituintes estruturais das células.

Figura 1 - Crescimento e enraizamento de plântulas de *Phyla betulifolia*, aos 15 dias de cultivo *in vitro*.



Legenda: MS - meio de cultura completo, MS/2 - MS com metade da concentração de sais, e MS/4 - MS com 1/4 da concentração de sais.

Fonte: Da autora (2019).

Passados 45 dias da repicagem das plântulas, os tratamentos MS e MS/2 foram avaliados. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para os parâmetros comprimento de broto (CB), e matéria seca de caule (MSC) e total (MST), bem como para a área foliar específica (AFE) (TABELA 2). O número de folhas (NF), matéria seca de folhas (MSF) e a área foliar total (AFT) variaram em função da concentração de sais.

Apesar do tratamento MS apresentar maior acúmulo de matéria seca de folha e área foliar, o índice fisiológico de crescimento área foliar específica (AFE) demonstra que não houve diferença na espessura da folha entre os tratamentos. A razão de área foliar (RAF) expressa o investimento da planta na produção fotossintética (PINTO et al., 2016), e os resultados obtidos para RAF sugerem que as plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas em MS apresentaram maior área foliar útil para a realização da fotossíntese. De acordo com Benicasa (2003), as folhas são o centro de produção de fotossintatos (matéria seca) e o resto da planta depende da exportação desse material pelas folhas. Os resultados encontrados para a razão de peso da folha (RPF) indicam que as plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas em meio MS exportaram menos fotoassimilados para os outros órgãos.

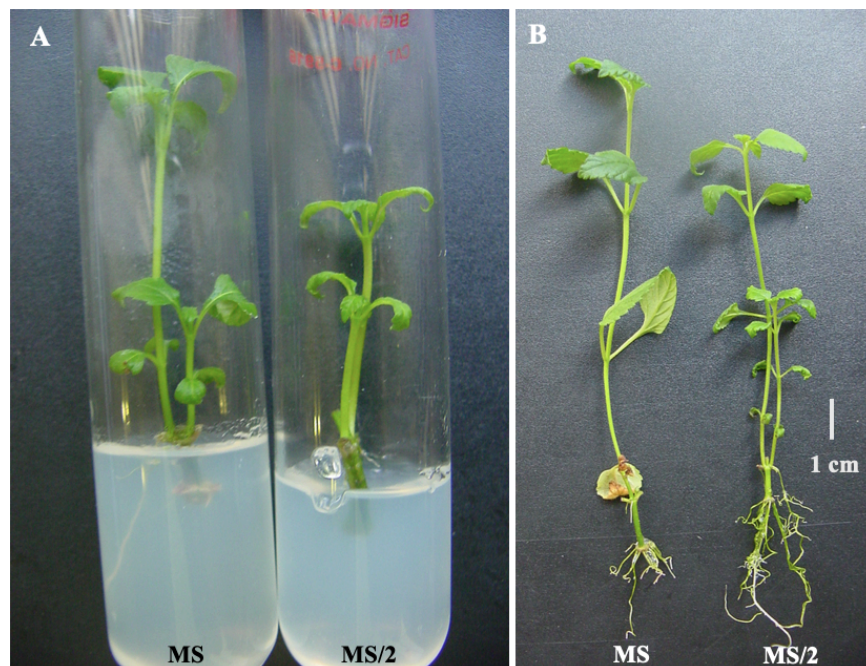
Tabela 2 - Parâmetros de crescimento de plântulas de *Phyla betulifolia*, aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

Parâmetros de crescimento	Concentrações de sais	
	MS	MS/2
Comprimento de broto - CB (cm)	7,20 a	6,46 a
Comprimento de raiz - CR (cm)	3,92 b	5,26 a
Matéria Seca de Folha - MSF (mg)	61,14 a	51,63 b
Matéria Seca de Caule - MSC (mg)	43,24 a	43,15 a
Matéria Seca de Raiz - MSR (mg)	16,07 b	23,92 a
Matéria Seca Total - MST (mg)	120,45 a	118,70 a
Área foliar total - AFT (cm ²)	1,711 a	1,064 b
Razão de área foliar - RAF (cm ² mg ⁻¹)	0,014 a	0,009 b
Área foliar específica - AFE (cm ² mg ⁻¹)	0,029 a	0,021 a
Razão de peso da folha - RPF (mg mg ⁻¹)	0,586 a	0,543 b

Legenda: MS - meio de cultura completo, e MS/2 - MS com metade da concentração de sais. As médias seguidas das mesmas letras na linha, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).
Fonte: Da autora (2019).

Em resposta a menor concentração de sais, as plântulas de *Phyla betulifolia* produziram raízes mais compridas e com um incremento de 32% no acúmulo de matéria seca. Esses resultados demonstram que a concentração de sais foi determinante para a formação de raízes (FIGURA 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Monfort et al. (2015) e, segundo os autores, a diferença na concentração de sais no meio de cultura é um fator importante na indução de raízes, normalmente, altas concentrações levam a inibição e, baixas concentrações induzem o enraizamento.

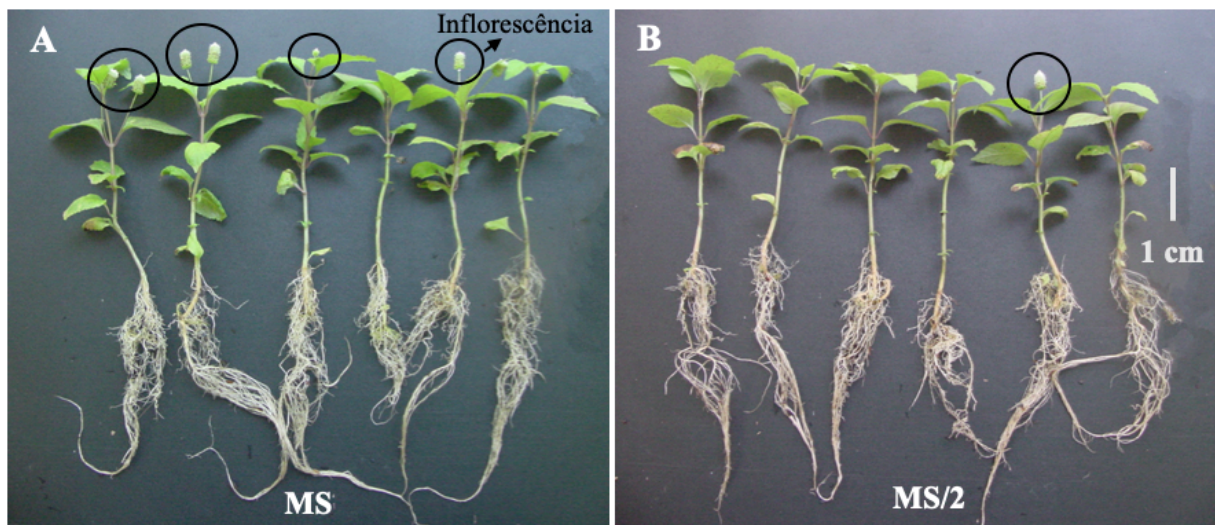
Figura 2 - Crescimento de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas em meio MS e MS/2. A - Aos 15 dias de cultivo *in vitro*; B - Aos 40 dias de cultivo *in vitro*.



Legenda: MS - meio de cultura completo e MS/2 - MS com metade da concentração de sais.
Fonte: Da autora (2019).

Para as plântulas aclimatizadas, não houve influência dos tratamentos sobre a taxa de sobrevivência, sendo 100% para as duas concentrações de sais. O comprimento do caule (8,36 MS e 7,55 MS/2) e o comprimento da raiz (17,25 MS e 14,35 MS/2), também não foram influenciados (FIGURA 3). Ainda na figura 3, é possível observar (círculos pretos), que as plantas provenientes do meio MS, apresentaram mais flores que as de MS/2.

Figura 3 - Plantas de *Phyla betulifolia* após 40 dias de aclimatização em casa de vegetação.



Legenda: MS - meio de cultura completo, e MS/2 - MS com metade da concentração de sais.

Fonte: Da autora (2019).

3.2 Taxa de crescimento absoluto (TCA)

A taxa de crescimento absoluto (TCA) é uma variável utilizada para se ter ideia da velocidade média de crescimento vegetal, ao longo de um período de observação (BENINCASA, 1988). Para as plântulas de *Phyla betulifolia* a TCA variou entre os tipos de segmentos (TABELA 3), sendo superior para as plântulas provenientes de segmentos nodais.

Tabela 3 - Taxa de crescimento absoluto (TCA) de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas in vitro.

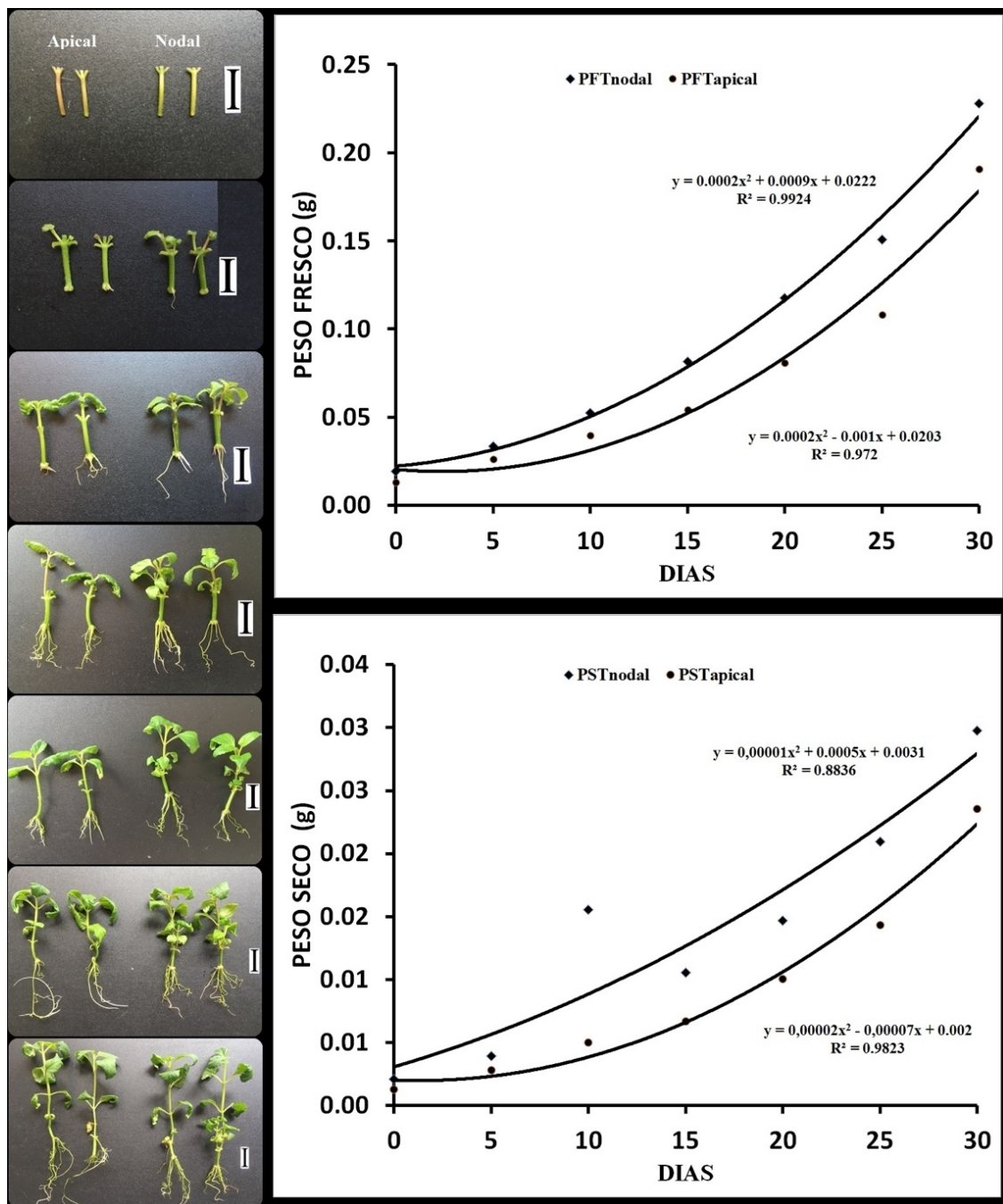
Nº de dias	TCA (g dia ⁻¹)	
	Apical	Nodal
5°	0,0001 a	0,0002 a
10°	0,0005 b	0,0023 a
15°	0,0003 a	-0,0016 b
20°	0,0007 a	0,0008 a
25°	0,0012 b	0,0018 a
30°	0,0013 b	0,0015 a

As médias seguidas das mesmas letras na linha, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

A curva de crescimento (FIGURA 4), construída a partir do peso fresco e seco das plântulas ao longo de 30 dias, evidencia que o crescimento aconteceu de forma linear, entretanto, as plântulas ainda não haviam atingido o máximo de seu crescimento. Observa-se ainda que as plântulas obtidas a partir de segmentos nodais apresentaram maior crescimento, corroborando com os dados da tabela 3.

Figura 4 - Análise de peso fresco e seco de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* durante 30 dias.



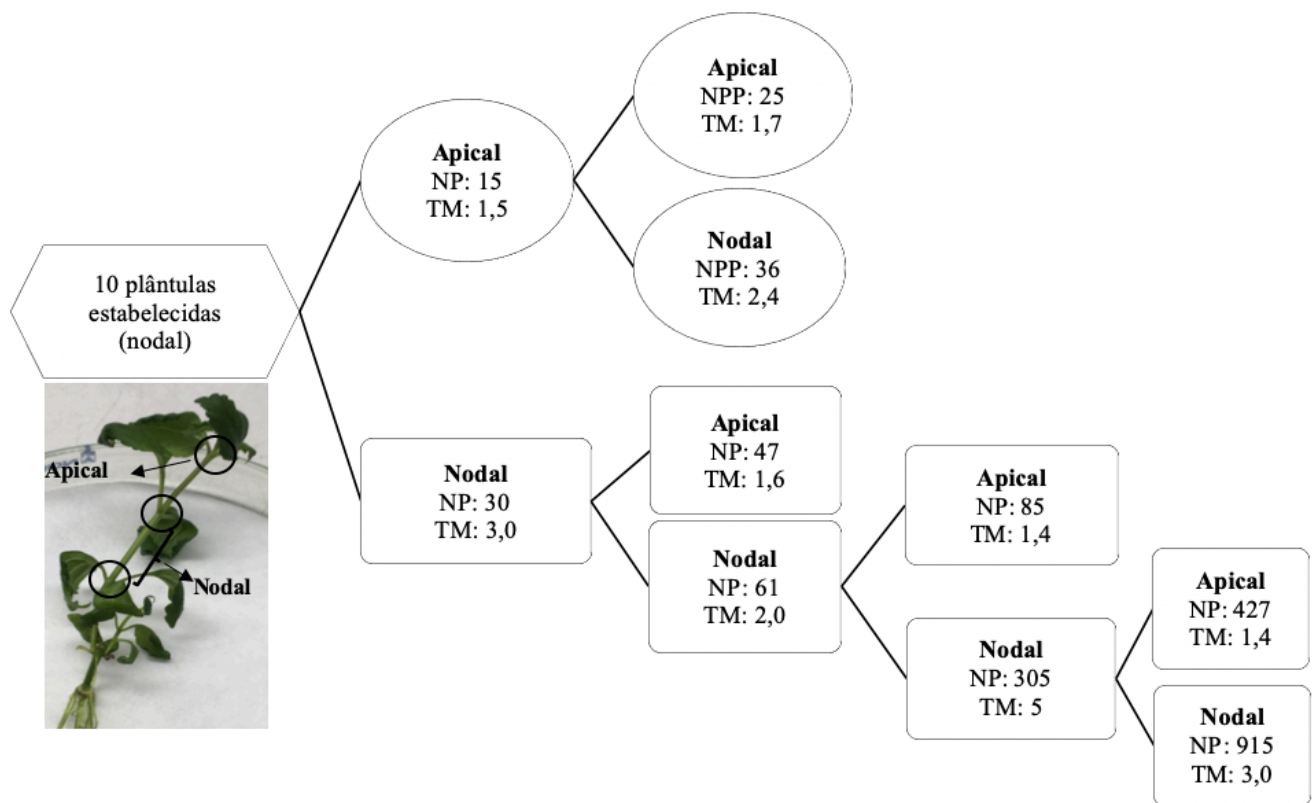
Legenda: PFT - peso fresco total; PST - peso seco total.

Fonte: Da autora (2019).

3.3 Taxa de multiplicação

A fonte de explante, ou seja, o tipo de segmento (apical ou nodal) afetou significativamente a taxa de multiplicação (FIGURA 5). Os resultados apontam que para *Phyla betulifolia*, a taxa de multiplicação é cerca de 2 vezes maior para plântulas subcultivadas a partir de segmentos nodais. Segundo Gratapaglia; Machado (1998), apesar da fase de multiplicação ter como objetivo a produção de um maior número de plântulas em um curto espaço de tempo, é importante levar em consideração outros fatores, ou seja, o ideal é a combinação de uma taxa de multiplicação satisfatória com o mínimo de variação entre os explantes.

Figura 5 - Taxa de multiplicação de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro*.



Legenda: NP - número de plântulas; TM - taxa de multiplicação.

Fonte: Da autora (2019).

4 CONCLUSÃO

A melhor concentração de sais para o estabelecimento e manutenção de explantes *in vitro* de *Phyla betulifolia* é o meio MS completo, o qual produziu plântulas com características funcionais mais adaptadas a fase de aclimatização. Vale ressaltar que não foi necessário suplementar o meio de cultivo com reguladores de crescimento para o estabelecimento *in vitro* de *P. betulifolia*, pois as plântulas cresceram e enraizaram

normalmente. Quanto à fonte de explante, tanto a taxa de crescimento relativo quanto a taxa de multiplicação demonstraram que os segmentos nodais são mais indicados para a obtenção de plântulas *in vitro* de *P. betulifolia*.

REFERÊNCIAS

- ARARUNA, E. da C.; RIBEIRO-OLIVEIR, J. P.; PEREIRA, V. J.; ASMAR, S. A.; MELO, B. de. Salt concentrations in culture media for the development of *Dipteryx alata in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 12, p. 1295-1300, 2017.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 41p.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003, 42p.
- CID, L.P.B. **Cultivo in vitro de plantas**. 4. Ed. - Brasília, DF: Embrapa, 2015.
- COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; MENDONÇA, A.B.; AMANCIO, V.F.; LEDO, A.S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**. v. 25, p. 068-072. 2007.
- GHORBANPOUR, M.; HADIAN, J.; NIKABADI, S.; VARMA, A. Importance of Medicinal and Aromatic Plants in Human Life. Chapter 1. *In*: GHORBANPOUR, M.; VARMA, A. (eds.), **Medicinal Plants and Environmental Challenges**. 2017. 409 p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ. 1998. P, 183-260.
- GREENWAY M. B.; PHILLIPS, I. C.; LLOYD, M. N.; HUBSTENBERGER, J. F.; PHILLIPS, G. C. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 48, n. 4, p. 403-410, 2012.
- MARTINS, J. P. R.; PASQUAL, M.; MARTINS, A. D.; RIBEIRA, S. F. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 1, p. 85, 2015.
- MONFORT, L. E. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T. T.; LIMA, A. F.; SILVA, S. T.; SILVA, G. M. da. Micropropagação e germinação de sementes *in vitro* de atoveran. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n. 2, p. 215-223, 2015.
- MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. p. 110-121, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid Growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.
- PINHAL, H. F.; ARARUNA, E. da C.; CARNEIRO, P. A. P.; ASMAR, S. A.; de MELO, B.; LUZ, J. M. Q. Concentration of ms medium and cutting of seeds on *in vitro* establishment of baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). **Bioscience Journal**, v. 33, n. 2, 2017.

PINTO, J. R. DE S.; DOMBROSKI, J. L. D.; FREITAS, R. M. O. DE; SOUZA, G. O. DE; SANTOS JUNIOR, J. H. DOS. Crescimento e índices fisiológicos de *Tabebuia aurea*, sob sombreamento no semiárido. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 46, n. 4, p. 465 - 472, 2016.

CAPÍTULO 3 - CRESCIMENTO, ANATOMIA E DEFESA ANTIOXIDANTE DE *Phyla betulifolia* (KUNTH) CULTIVADA *IN VITRO* COM SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL

RESUMO

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos vegetais muito utilizada na produção de plantas medicinais. *Phyla betulifolia* é uma espécie aromática que possui potencial uso terapêutico. Objetivou-se avaliar os efeitos do sistema de ventilação natural (SVN) no crescimento vegetativo, nas características anatômicas, produção de pigmentos fotossintéticos e na defesa antioxidante de plântulas de *P. betulifolia* cultivadas *in vitro*. Segmentos nodais pré-estabelecidos *in vitro* foram inoculados em frascos com 50 mL de meio de cultura MS e vedados com tampas com e sem furos, cobertos com membranas porosas (zero, uma, duas e quatro membranas), correspondendo aos tratamentos SM (sem membranas), SVN 1, 2 e 4, respectivamente. Após 45 dias, foram avaliados parâmetros de crescimento vegetativo, características anatômicas, acúmulo de pigmentos fotossintéticos e de compostos fenólicos, e respostas de defesa antioxidantes por mecanismos não enzimáticos. O tratamento SVN4 apresentou plântulas com maiores índices de crescimento, maior acúmulo de pigmentos fotossintéticos e tecidos anatomicamente mais organizados, além disso houve uma maior resposta de defesa antioxidante. Apenas o acúmulo de compostos fenólicos foi mais abundante nas plântulas cultivadas em SVN1. Conclui-se que o sistema de ventilação natural com quatro membranas ofereceu as melhores condições para o crescimento e desenvolvimento de plântulas de *P. betulifolia*.

Palavras-chave: Membranas. Trocas gasosas. Anatomia. Planta medicinal.

CHAPTER 3 - GROWTH, ANATOMY AND ANTIOXIDANT DEFENSE OF *Phyla betulifolia* (KUNTH) CULTIVATED *IN VITRO* UNDER NATURAL VENTILATION SYSTEM

ABSTRACT

Micropropagation is a technique of plant tissue culture widely used in the production of medicinal plants. *Phyla betulifolia* is an aromatic species that has a potential therapeutic use. The objective of this study was to evaluate the effects of the natural ventilation system (SVN) on vegetative growth, anatomical characteristics, photosynthetic pigment production and antioxidant defense of *P. betulifolia* plantlets grown *in vitro*. *In vitro* pre-established nodal segments were inoculated into flasks with 50 mL of MS culture medium and sealed with caps with and without holes, covered with porous membranes (zero, one, two and four membranes), corresponding to the SM treatments (without membranes), SVN 1, 2 and 4, respectively. After 45 days, parameters of vegetative growth, anatomical characteristics, accumulation of photosynthetic pigments and phenolic compounds were evaluated, as well as the antioxidant defense responses by non-enzymatic mechanisms. The SVN4 treatment provided plantlets with higher growth indices, greater accumulation of photosynthetic pigments and anatomically more organized tissues, in addition, there was a higher antioxidant defense response. Only the accumulation of phenolic compounds was more abundant in the plantlets cultured in SVN1. Therefore, the natural ventilation system with four membranes offered the best conditions for the growth and development of *P. betulifolia* plantlets.

Keywords: Membranes. Gas exchange. Anatomy. Medicinal plant.

1 INTRODUÇÃO

A propagação *in vitro* possibilita a multiplicação de espécies medicinais, garantindo a produção de mudas saudáveis, livres de patógenos e em larga escala (CARVALHO et al., 2011). Entretanto, em sistemas de cultivo *in vitro* convencionais, as plantas encontram-se em condições heterotróficas e/ou mixotróficas, sendo totalmente dependentes do açúcar e da concentração de CO₂ disponíveis no recipiente de cultivo. Essa dependência, pode fazer com que as plantas tenham dificuldades em recuperar suas condições autotróficas na etapa de aclimatização, elevando a taxa de mortalidade das plantas (ALVAREZ et al., 2012; KOZAI, 1991; XIAO; KOZAI, 2006). Essa alta taxa de mortalidade, se deve a anomalias fisiológicas e anatômicas, dentre elas: a incapacidade de realização da fotossíntese, o baixo teor de clorofila, a presença de estômatos não funcionais, a falta de camada de cutícula na folha e a formação de folhas anormais (AFREEN, 2005; ISAH, 2015; RAHMAN; ALSADON, 2007).

Como alternativa para amenizar estes problemas, pode-se utilizar o cultivo *in vitro* fotoautotrófico, onde não são adicionadas fontes de carbono (sacarose) ao meio de cultura. Neste caso o explante cresce por meio da sua própria capacidade fotossintética e da absorção dos nutrientes inorgânicos contidos no meio de cultivo (AFREEN, 2005; KOZAI, 1991). De acordo com Xiao, Niu e Kozai (2011), neste sistema, as trocas gasosas podem ser otimizadas através do uso de membranas permeáveis a gases, que reduzem a umidade relativa do ar e aumentam a transpiração, além de melhorar a absorção de água e nutrientes pela planta.

Na literatura, há vários estudos que reforçam as vantagens do emprego de sistemas de ventilação natural no cultivo *in vitro* de plantas. Silva et al. (2014), estudaram o efeito da luz e do sistema de ventilação natural em *Ananas comosus* L. (Bromeliaceae); Rodrigues et al. (2012) avaliaram os efeitos da selagem de frascos e reguladores de crescimento na propagação *in vitro* de *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae); Luna et al. (2017), analisaram as características anatômicas e histológicas de folhas de *Ilex paraguariensis* A. St.- Hil. (Aquifoliaceae) sob diferentes sistemas de cultivo *in vitro*; e Lazzarini et al. (2019), que observaram a influência do tipo de explante e dos sistemas de ventilação natural no crescimento e o teor de carvacrol e timol de *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae).

Phyla betulifolia (Kunth) Greene - Verbenaceae é uma espécie com potencial uso medicinal, conhecida como “capim-doce”, hortelã doce ou estévia, nomes vernaculares utilizados pela população de Santarém, Baixo Amazonas. Seus nomes populares devem-se ao sabor adocicado de suas folhas, as quais são utilizadas e indicadas, pela população local, em forma de infusão, para o controle da glicemia e como calmante.

Diante do exposto e da necessidade de conhecer o comportamento de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro*, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do sistema de ventilação natural no crescimento vegetativo, nas características anatômicas, e na defesa antioxidante de plântulas de *Phyla betulifolia*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos e identidade do material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. As análises de doseamento de pigmentos fotossintéticos e compostos fenólicos e os ensaios antioxidantes, foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura (DAG)/UFLA. As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Setor de Botânica estrutural do Departamento de Biologia (DBI)/UFLA, Laboratório de Anatomia e Fisiologia do Cafeeiro, Setor de Cafeicultura do DAG/UFLA e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia (DFP)/UFLA.

O material botânico foi incluído ao acervo do Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil (Herbários da ESAL) e do Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (PANG), correspondendo aos números de registro ESAL 30314 e PAMG 57966.

2.2 Cultivo *in vitro*

2.2.1 Origem e estabelecimento dos explantes

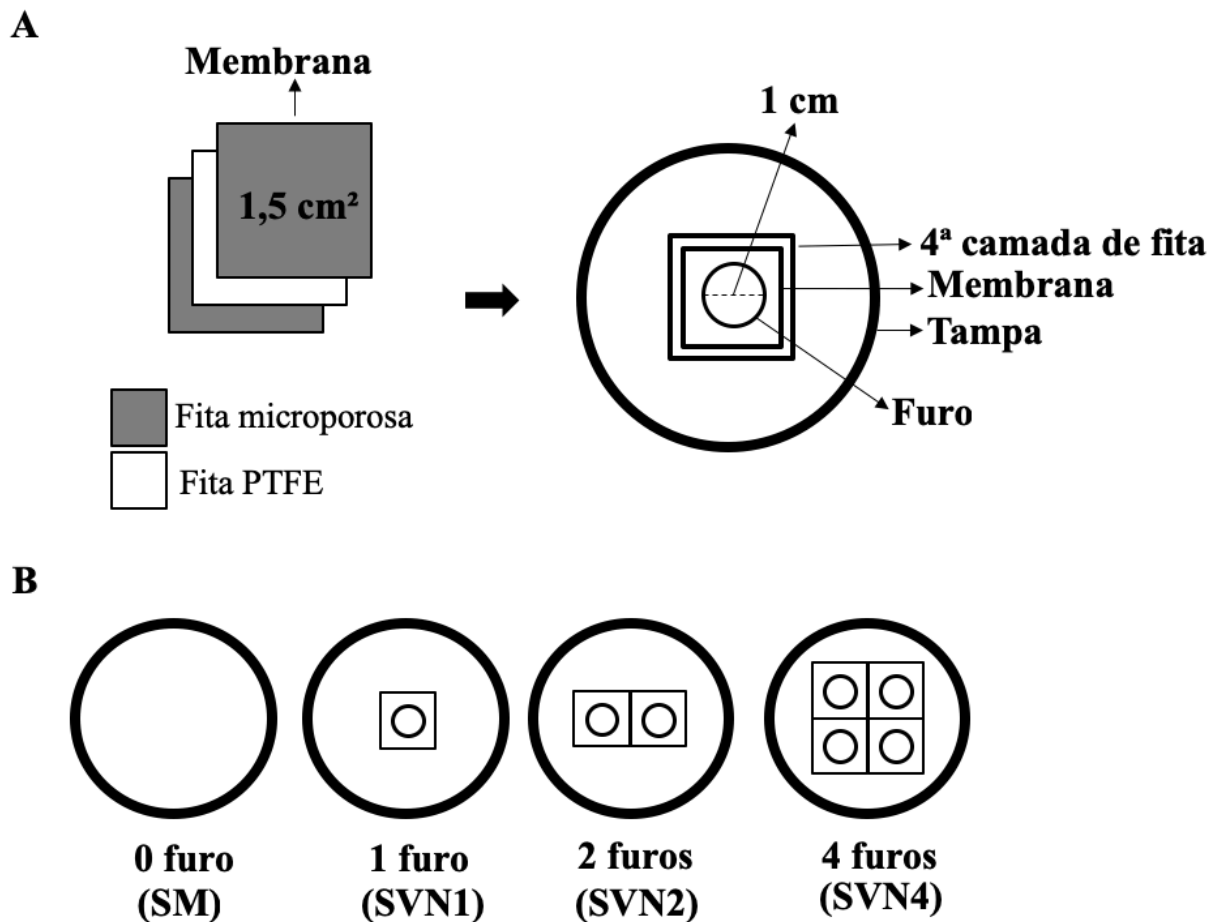
Foram utilizados segmentos nodais provenientes de plântulas de *Phyla betulifolia* pré-estabelecidas *in vitro*, conforme descrito no capítulo 2.

2.2.2 Confeção das membranas porosas

As membranas porosas foram confeccionadas de acordo com a metodologia proposta por Saldanha et al. (2012), utilizando fita microporosa bege Cremer[®] e fita de politetrafluoroetileno (PTFE) Amanco[®], conhecida como veda rosca. A membrana foi composta por 4 camadas, sendo a primeira de fita microporosa, a segunda de PTFE, e a terceira de fita microporosa (FIGURA 1A). As três camadas foram cortadas em quadrados de 1,5 cm² e distribuídas separadamente sobre a face colável da fita microporosa, totalizando

quatro camadas. Por fim, as camadas foram cortadas homogeneamente em quadrados e distribuídos sobre os furos de 1 cm de diâmetro nas tampas de polipropileno dos recipientes de cultivo. As tampas continham zero, um, dois e quatro furos (FIGURA 1B), correspondendo aos tratamentos sistema sem membranas - SM, sistemas de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas, respectivamente.

Figura 1 - Confeção da membrana porosa e distribuição dos tratamentos. A - Esquema de membrana e de tampa. B - Distribuição dos tratamentos: SM e SVN (1,2 e 4).



Legenda: PTFE - politetrafluoroetileno. Sistema sem membranas - SM; sistemas de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas.

Fonte: Da autora (2019).

2.2.3 Sistema de cultivo e ventilação natural

Segmentos nodais (± 1 cm) com um par de folhas, foram excisados de plântulas cultivadas *in vitro* e inoculadas sob fluxo laminar asséptico, em frascos de 200 mL, contendo 50 mL de meio de cultura MS completo (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sem adição de sacarose, 6 g L^{-1} Agar (Himedia[®], tipo I), e $\text{pH } 5,7 \pm 0,1$. Os frascos com os meios de cultivo foram autoclavados a 125°C por 20 min a 1,2 atm. Após a inoculação, os frascos foram

mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16h de luz, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e irradiância de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpada fluorescente branca fria).

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 4 sistemas de cultivo: sistema convencional, denominado de sem membrana (SM), e sistemas de ventilação natural com uma membrana (SVN1), duas membranas (SVN2) e com quatro membranas (SVN4). Cada tratamento foi constituído por 5 repetições (com 4 frascos), com 3 explantes por frasco, totalizando 240 plântulas.

2.2.4 Análise de crescimento

Aos 45 dias, as plântulas foram avaliadas quanto aos comprimentos do broto (CB) e de raízes (CR); número de folhas (NF) e de raízes (NR); matérias secas de folha (MSF), de caule (MSC), de raiz (MSR) e total (MST). Para a determinação das matérias secas, os materiais vegetais individualizados foram acondicionados em sacos de papel kraft e levados à estufa de circulação de ar forçado, a 35°C , até peso constante (aproximadamente 72h). Posteriormente, o material seco foi pesado em balança de precisão.

A área foliar total (AFT), foi medida no software WinFOLIA™ utilizando um scanner EPSON PERFECTION V700 PHOTO a partir de todas as folhas presentes nas 5 plântulas representativas de cada tratamento. A partir dos dados de matéria seca e área foliar, foram calculados a razão de área foliar ($\text{RAF} = \text{AFT}/\text{MST}$), a área foliar específica ($\text{AFE} = \text{AFT}/\text{MSF}$), o peso específico de folha ($\text{PEF} = \text{MSF}/\text{AFT}$) e a razão de peso das folhas ($\text{RPF} = \text{MSF}/\text{MST}_{\text{parte aérea}}$), seguindo cálculos propostos por Benincasa (2003).

2.3 Análises anatômicas

2.3.1 Microscopia de Luz

Para as análises anatômicas foram considerados segmentos de folha, provenientes do terceiro nó, bem como fragmentos do caule e segmentos de raiz na sua porção mediana, de plântula com 45 dias de cultivo *in vitro*. As amostras foram fixadas e estocadas em etanol 70% (JENSEN, 1962). Após desidratação em série etílica (70, 80, 90 e 100%), os fragmentos foram incluídos em metacrilato (Historesina, Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo recomendações dos fabricantes, e os blocos cortados em micrótomo rotativo (modelo MRP 2015, Lupetec Tecnologia Aplicada). Secções transversais, com $8 \mu\text{m}$ de espessura, foram coradas com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e, montadas em Permunt®, obtendo-se lâminas permanentes utilizadas para a caracterização estrutural. O estudo de microscopia de luz e a obtenção das imagens foram realizadas em microscópio de

luz (Olympus modelo CX31, Olympus Optical), acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Eurekam 3.0, Bel Engineering) e microcomputador com o programa de captura de imagens Bel View.

A partir das imagens capturadas, foram mensurados os seguintes parâmetros:

- Altura do mesofilo (AM); limbo foliar (LF); parênquima paliçádico (PP); e parênquima lacunoso (PL).

- Caule: área total (AT); área do cilindro central (ACC); área do feixe vascular (AFV); área do parênquima cortical (APC); área do parênquima medular (APM); e espessura do parênquima cortical (EPC).

- Raiz: área total (AT); área do cilindro vascular (ACV); área do parênquima cortical (APC); área do parênquima medular (APM) e espessura do parênquima cortical (EPC).

2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização micromorfológica da folha, fragmentos da lâmina foliar (incluindo a nervura mediana), foram fixadas em Karnovsky's modificado - Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2; e, CaCl_2 0,001 M. Para o preparo das amostras, seguiu-se a metodologia utilizada por Alves et al. (2008). As amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio por três vezes, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2h, e lavadas duas vezes, durante 15 minutos em água destilada. Em seguida, foram desidratadas em gradientes progressivo de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%) por 10 minutos cada, e submetidas à secagem ao ponto crítico (BAL-TEC, modelo CPD-030, Principality of Liechtenstein), montadas em *stubs* de alumínio com fita adesiva dupla-face, para então, receber cobertura metalizada em evaporador de ouro Sputtering (BAL-TEC, modelo SCD-050, Principality of Liechtenstein). As análises de todas as secções foram efetuadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo EVO 40 XVP, Cambridge-UK), onde foram obtidas imagens das faces adaxial e abaxial da folha. A partir das imagens obtidas, foram mensurados os seguintes parâmetros: número de estômatos abertos (EA) e fechados (EF); diâmetro polar dos estômatos (DP) e equatorial (DE); relação diâmetro polar e equatorial (DP/DE); número de tricomas tectores (TT); número de tricomas capitados menores (TCMe) e maiores (TCM).

2.4 Análise de pigmentos fotossintéticos

O conteúdo de fotossintatos foi extraído e analisado de acordo com o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979). Folhas frescas (50 mg) foram pesadas diretamente em tubos de Falcon cobertos com papel alumínio e incubadas com 10 mL de

dimetilsulfóxido (DMSO) e, mantidos em estufa a 65 °C por 24 h. As amostras foram preparadas em triplicatas.

Em seguida, três alíquotas de 3 mL de cada réplica foram transferidas para uma cubeta de quartzo, e os valores de densidade óptica em 480, 649 e 665 nm foram lidos em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control® (versão 3.37), contra DMSO em branco. O valor de densidade óptica específica de cada amostra foi calculada pela média das leituras das três alíquotas.

Os comprimentos de onda e as equações utilizadas para os cálculos foram baseados na metodologia de Wellburn (1994), sendo:

$$\text{Clorofila } a_{649} = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$\text{Clorofila } b_{665} = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

$$\text{Carotenoides}_{480}: (1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b)/220.$$

A clorofila total ($a + b$) foi calculada pelo somatório dos resultados encontrados das equações para clorofila a e b , sendo todos os resultados expressos em mg g^{-1} matéria fresca.

2.5 Quantificação de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes

A quantificação de compostos fenólicos e os ensaios antioxidantes foram realizados empregando análises espectrofotométricas. As leituras das absorbâncias foram registradas em leitora de microplacas TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control® (versão 3.37). Todas as leituras foram realizadas em triplicatas em microplacas de poliestireno transparente com 96 pocos, com exceção do ensaio ORAC.

2.5.1 Preparo do extrato

Os extratos foram preparados por meio de sonicação, a partir de 20 mg de folhas secas de *Phyla betulifolia* em 400 μL da mistura trinária de: 33,3% água + 33,3% etanol + 33,3% metanol, selecionada previamente por ensaio de otimização extrativa. A sonicação foi realizada a temperatura ambiente, com um ciclo de 45 min. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi recuperado e armazenado em microtubos, mantidos em geladeira a 4°C, até as análises químicas.

2.5.2 Quantificação dos compostos fenólicos totais (TPC)

A quantificação dos compostos fenólicos totais (TPC) foi determinada pelo método do Folin-Ciocalteu, segundo Singleton e Rossi (1965), com modificações. Uma alíquota de 20 μL do extrato, a uma concentração final de 16,66 mg mL^{-1} , foi adicionada a 120 μL de

solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu (10% v/v), após 5 minutos de reação, acrescentou-se 120 μL de Na_2CO_3 (7% p/v). As amostras foram incubadas no escuro à temperatura ambiente, e após 2 horas, as absorvâncias foram mensuradas a 760 nm.

Para expressar os resultados, uma curva de calibração ($y = 4,871x + 0,1287$, $R^2 = 0,9968$) com faixa de trabalho de 0,64 a 0,02 mg mL^{-1} de uma solução etanólica de ácido gálico foi construída. Os teores de compostos fenólicos totais foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de folhas secas (mg EAG/ g).

2.5.3 Capacidade antioxidante total (CAT) pelo método de redução do molibdato de amônio

A capacidade antioxidante total (CAT) foi avaliada utilizando a metodologia de redução do molibdato descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), com modificações. As reações foram realizadas em microtubos de 2 mL. Aos extratos (50 μL), a uma concentração final de 16,66 mg mL^{-1} , foi adicionado 250 μL da solução reagente (fosfato de sódio monobásico 28 mM, molibdato de amônio 4 mM e ácido sulfúrico 0,6 M). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria por 90 minutos a 95°C. Após resfriamento em temperatura ambiente, 250 μL das amostras foram transferidas para microplacas e as absorvâncias mensuradas a 695nm.

A concentração da curva de calibração ($y = 5,6621x - 0,0247$, $R^2 = 0,9979$) variou de 0,62 a 0,03 mg mL^{-1} , utilizando uma solução aquosa de ácido ascórbico como padrão. Os resultados foram expressos em miligrama equivalente de ácido ascórbico por grama de folhas secas (mg EAA/ g).

2.5.4 Atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH

O ensaio foi determinado através da captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) segundo o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações. Ao extrato (25 μL) em diferentes concentrações (8,33 a 0,13 mg mL^{-1}) foram adicionados 250 μL de solução etanólica de DPPH. As amostras foram solubilizadas em 92,8° INPM. O controle negativo foi preparado com água destilada (25 μL) mais solução de DPPH (250 μL), enquanto as amostras mais o etanol 92.8° foram utilizadas como branco. Após 60 minutos de incubação no escuro e em temperatura ambiente, as absorvâncias foram mensuradas no comprimento de onda 517 nm. Como substância antioxidante de referência foi utilizado o BHT (butil-hidroxitolueno).

A atividade sequestradora de radicais DPPH foi medida como uma diminuição na absorvância e calculada segundo a equação:

$$\% \text{ Captura} = \left[\frac{\text{Acontrole} - \text{Aamostra}}{\text{Acontrole}} \right] \times 100$$

Onde, Acontrole corresponde à absorbância do controle negativo e Aamostra corresponde à absorbância das amostras do extrato/padrão. Os resultados foram expressos em IC₅₀ (mg/mL).

2.5.5 Determinação do poder quelante

O poder quelante foi determinado através da metodologia descrita por Miguel et al. (2010), com modificações. Aos extratos (25 µL) nas concentrações (16,66 a 1,04 mg mL⁻¹) foi adicionado 125 µL de água destilada e 50 µL de FeSO₄•7H₂O (2 mM). Após 3 minutos de reação, foram adicionados 50 µL de ferrozina [3-(2- piridil)-5,5-bis-(4-ácido fenilsulfônico)-1,2,4-triazina] (5 mM). Um controle contendo água destilada e os demais reagentes, foi preparado nas mesmas condições da amostra. Após sete minutos de reação, as absorbâncias foram registradas a 562 nm.

Uma curva de calibração ($y = 2601,4x + 0,4656$, $R^2 = 0,9994$) de etilenodiaminotretacético (EDTA) na faixa de concentração de 0,02 a 0,005 mg. mL⁻¹ foi empregada para a determinação da atividade. A porcentagem de inibição da formação do complexo ferrozina - Fe²⁺ e os valores de IC₅₀ foram calculados conforme descrito para o ensaio de DPPH. Os resultados foram expressos em IC₅₀ (mg/mL).

2.5.6 Determinação do poder redutor

O teste do poder redutor seguiu a metodologia proposta por Oyaizu (1986) com adaptações. Um volume de 50 µL do extrato preparado em diluições sequencias de água destilada (8,33 a 0,13 mg mL⁻¹), 200µL de tampão fosfato pH= 6,0 (200 mM) e 200 µL de ferrocianeto foram misturados em microtubos de 2 mL e levados a banho-maria a 50°C durante 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 µL de ácido tricloroacético - TCA (10 % p/v), 600 µL de água destilada e 200 µL de FeCl₃ (0,1 % p/v). Posteriormente alíquotas de 300 µL foram transferidos para microplacas e as absorbâncias mensuradas a 700nm. A porcentagem de inibição e os valores de IC₅₀ foram calculados conforme descrito para o ensaio de DPPH. Os resultados foram expressos em IC₅₀ (mg/mL).

2.5.7 Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio - ORAC

2.5.7.1 Solubilização das amostras

Alíquotas de 200 μL do extrato (concentração final de $16,66 \text{ mg mL}^{-1}$) foram acondicionadas em microtubos, os quais permaneceram abertos por 24 h, em temperatura ambiente, até completa evaporação do solvente (mistura trinária de: 33,3% água + 33,3% etanol + 33,3% metanol). O extrato seco obtido foi ressuspenso em 400 μL de água destilada, submetido à sonicação para completa diluição, em seguida foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos.

2.5.7.2 Realização do ensaio ORAC

O ensaio foi realizado segundo o método proposto por Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001), com modificações. Um volume de 25 μL das amostras e 150 μL de floresceína foram adicionados em microplacas pretas com 96 poços e incubadas por 10 min a 37°C no leitor de microplacas. Em seguida, 30 μL do radical AAPH (dihidrocloreto de 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida)) foram adicionados.

Todos os reagentes, incluindo o TROLOX, foram solubilizados em tampão fosfato (7,4mM pH 7). A curva de calibração ($y = 3\text{E}+09x + 2\text{E}+07$) foi gerada a partir do padrão TROLOX na faixa de concentração de 0,062 a 0,002 mg.mL^{-1} de tampão fosfato. Os resultados foram expressos em mg equivalente de TROLOX por grama de folha seca (mgET g^{-1}).

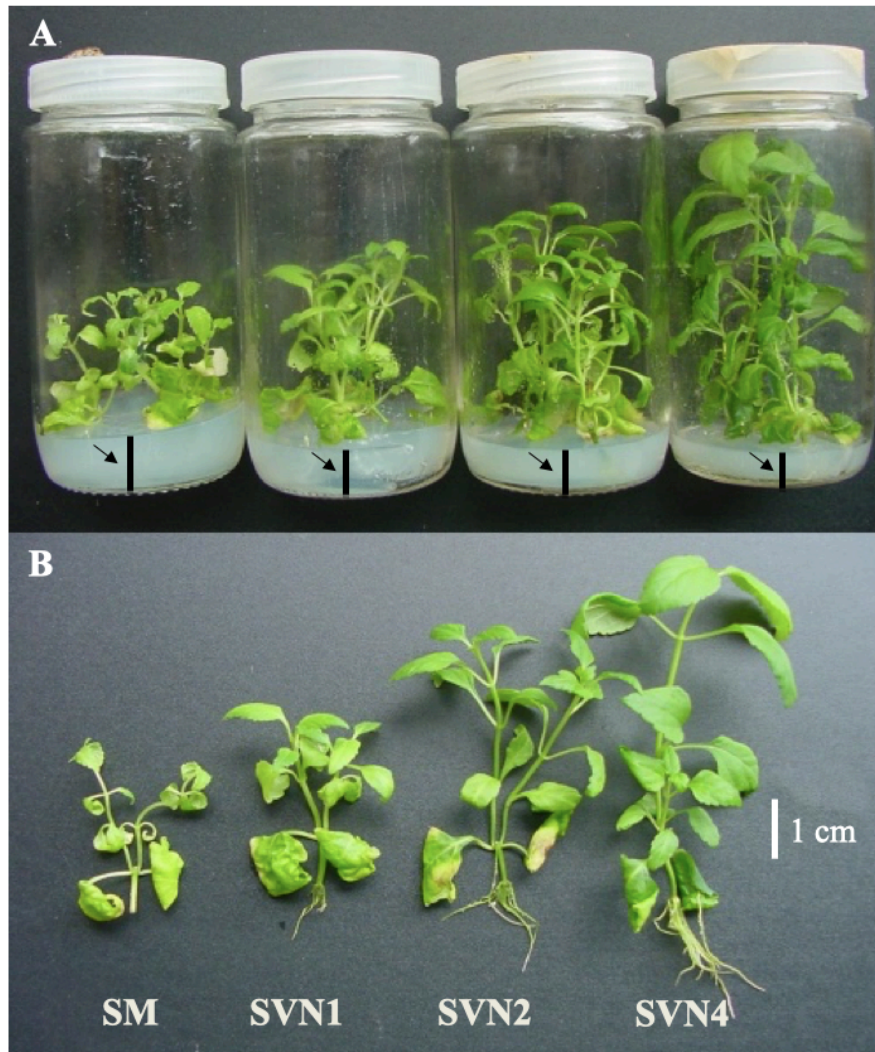
2.6 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software R.

3 RESULTADOS

O crescimento *in vitro* de plântulas de *Phylla betulifolia* e o volume do meio de cultivo foram significativamente afetados pelos sistemas de ventilação natural (FIGURA 2A-B).

Figura 2 - Plântulas de *Phyla betulifolia* aos 45 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação natural (SVN). A) Plântulas no frasco, com setas indicando a retração do meio de cultivo conforme o tipo de SVN; B) Aspecto de plântulas fora dos frascos de cultivo.



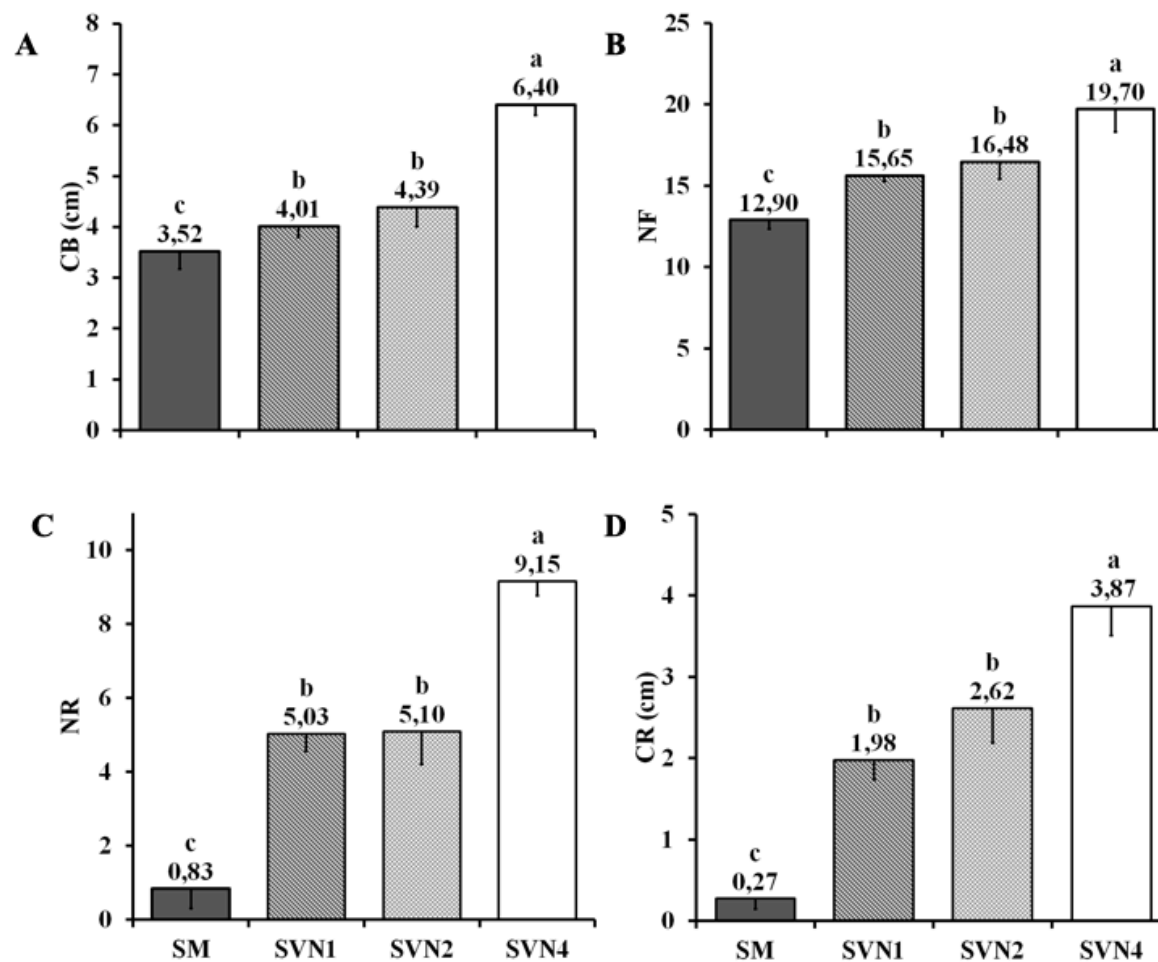
Legenda: Sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas.

Fonte: Da autora (2019).

O sistema de ventilação com quatro membranas (SVN4) proporcionou as melhores respostas de crescimento vegetativo (FIGURAS 3 e 4), quando comparado com o sistema sem membranas (SM). O tratamento SVN4 proporcionou um aumento de 45% no comprimento do broto (CB); 34,51% no número de folhas (NF); 90,92% no número de raízes (NR) e 93,02% no comprimento (CR) (FIGURA 3).

As plântulas cultivadas em SVN4 apresentaram um incremento de 79,71% no acúmulo de matéria seca de folhas (MSF), e de 77,63% em total (MST) (FIGURA 4), sendo estes resultados importantes para a avaliação dos índices fisiológicos da análise de crescimento.

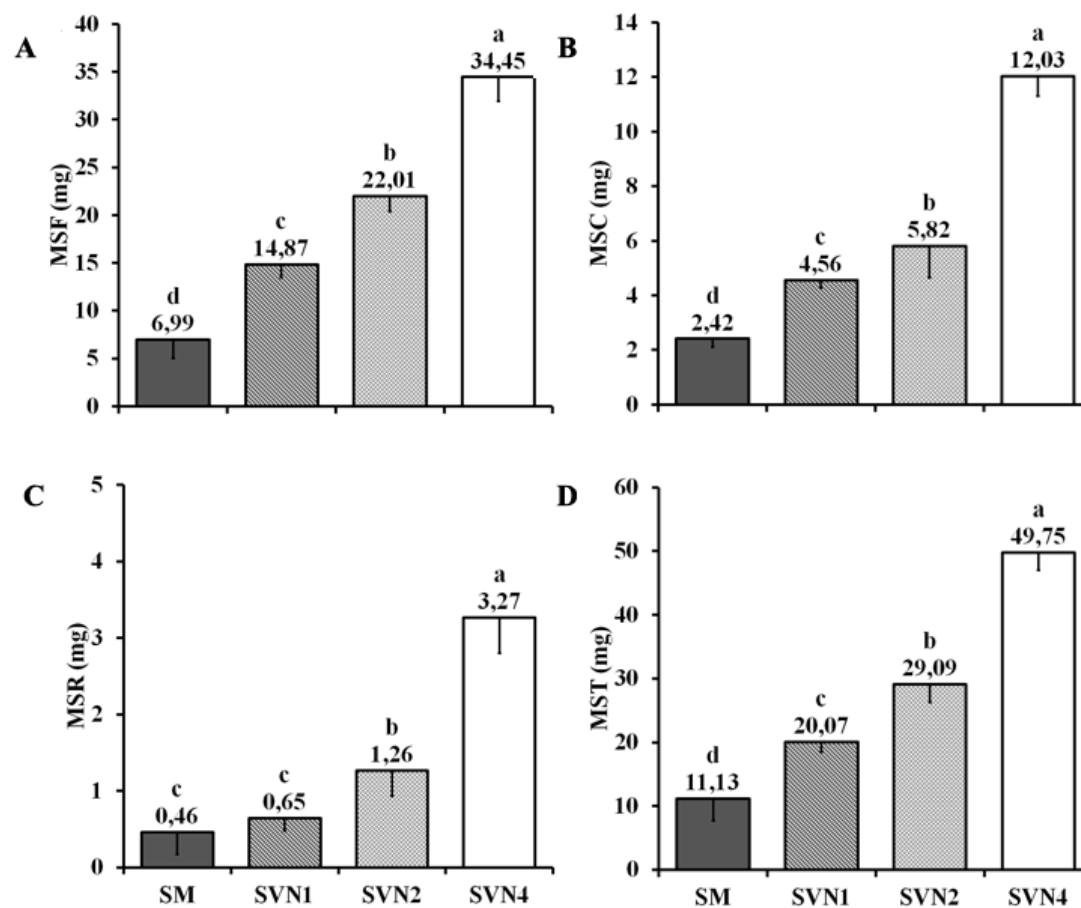
Figura 3 - Crescimento vegetativo de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação natural. A) Comprimento do broto (CB); B) Número de folhas (NF); C) Número de raízes (NR); D) Comprimento de raiz (CR).



Legenda: Sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas. As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

Figura 4 - Influência do sistema de ventilação natural no acúmulo de matérias secas em plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro*. A) Folhas (MSF); B) Caule (MSC); C) Raiz (MSR); D) Total (MST).



Legenda: Sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas. As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

A maior média de área foliar total (AFT) foi obtida no tratamento SVN4, sendo observado um acréscimo de 90,55% quando comparado à SM (TABELA 1). A razão de área foliar (RAF) e a área foliar específica (AFE) foram máximos no tratamento SVN4, entretanto, o peso específico da folha (PEF) foi superior para as plântulas cultivadas em SM. A razão de peso de folha (RPF) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 1 - Área foliar e índices fisiológicos da análise de crescimento de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação.

Sistemas de ventilação	AFT (cm ²)	RAF	AFE ----- (cm ² mg ⁻¹) -----	PEF	RPF (mg mg ⁻¹)
SM	0,31 c	0,02 c	0,04 c	22,62 a	0,76 a
SVN1	1,12 b	0,05 b	0,06 b	12,49 c	0,76 a
SVN2	1,41 b	0,05 b	0,06 b	15,38 b	0,79 a
SVN4	3,28 a	0,06 a	0,09 a	10,33 d	0,74 a

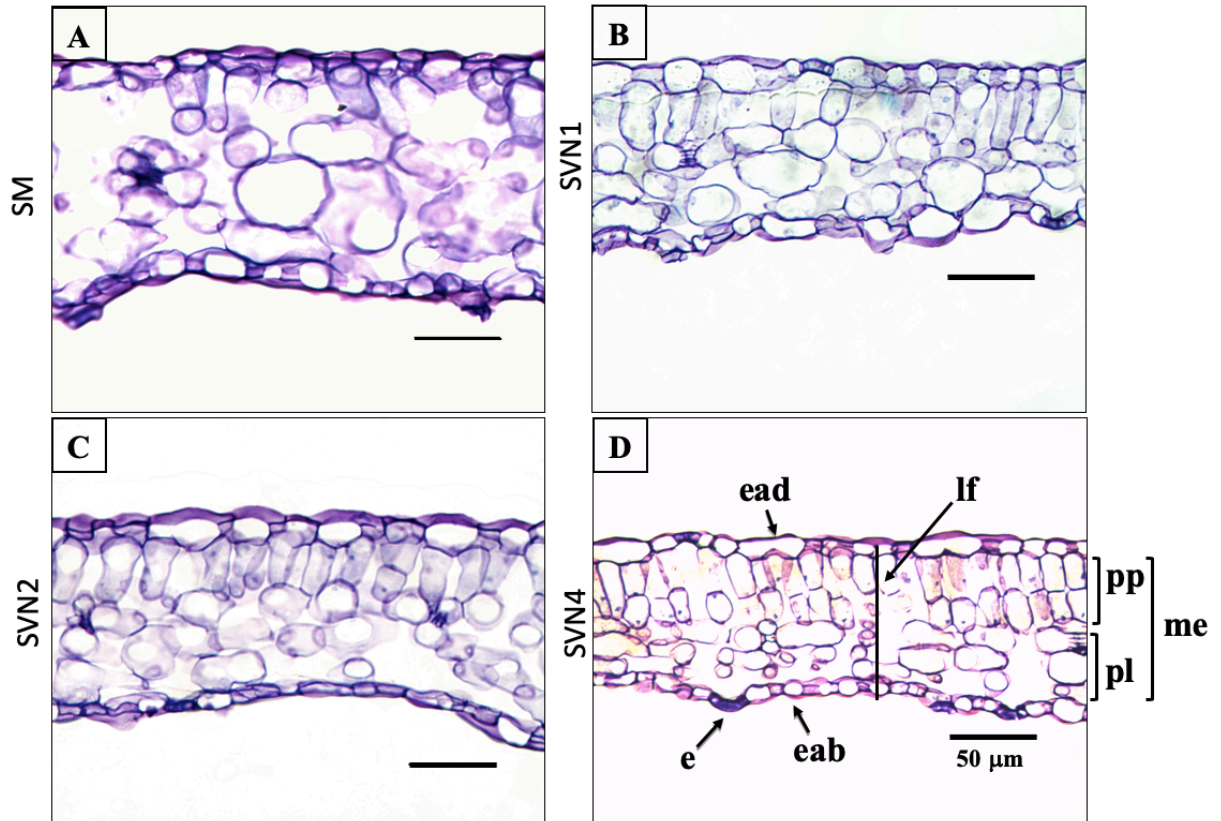
Legenda: Área foliar total (AFT), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), peso específico de folha (PEF), e razão de peso das folhas (RPF); sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas. As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

Em secção transversal, o limbo foliar de *Phyla betulifolia* apresenta epiderme uniestratificada, com células isodiamétricas (FIGURA 5). O mesofilo é dorsiventral e apresenta parênquima paliçádico composto por um a dois estratos celulares, enquanto que o parênquima lacunoso é formado por três camadas. Em resposta ao aumento no número de membranas, as células do parênquima lacunoso reduziram seu volume e desenvolveram maior espaço intercelular.

Os diferentes sistemas de ventilação provocaram diferenças significativas na altura do mesofilo (AM), limbo foliar (LF), bem como na altura dos parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL) (FIGURA 5 e TABELA 2), corroborando com os resultados encontrados para os índices fisiológicos AFE e PEF.

Figura 5 - Fotomicrografias de secções transversais de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação, evidenciando o desenvolvimento do mesofilo e a diminuição de volume das células do parênquima lacunoso. A - Sem membrana - SM; B - SVN1; C - SVN2; e D - SVN4.



Legenda: Epiderme nas faces: adaxial - ead e abaxial - eab; mesofilo - me; parênquimas: paliçádico - pp e lacunoso - pl; limbo foliar - lf; estômato - e; sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas.

Fonte: Da Autora (2019).

Tabela 2 - Análises anatômicas de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação.

Sistemas de ventilação	AM	LF PP PL		
		----- (µm) -----		
SM	117 a	146 a	37 a	77 a
SVN1	78 b	104 b	32 b	49 b
SVN2	68 c	89 c	31 b	41 c
SVN4	68 c	90 c	36 a	35 c

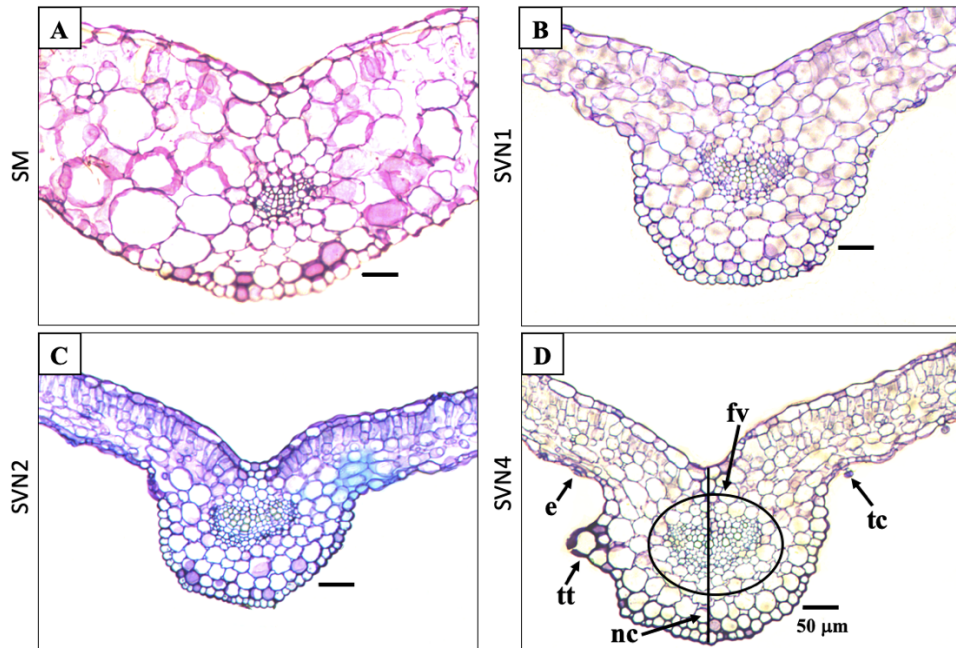
Legenda: Altura do mesofilo (AM); limbo foliar (LF); parênquima paliçádico (PP); parênquima lacunoso (PL); sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas. As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da Autora (2019).

As plântulas cultivadas em SM apresentaram um sistema vascular pouco desenvolvido (FIGURA 6A) mostrando uma organização típica de células e tecidos encontrados em plântulas cultivadas heterotroficamente. Em contrapartida, as plântulas submetidas aos

tratamentos com membranas (SVN 1, 2 e 4) apresentaram feixes vasculares mais estruturados (FIGURA 6 B, C e D).

Figura 6 - Fotomicrografias de secções transversais de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação, demonstrando o desenvolvimento do feixe vascular. A - Sem membrana - SM; B - SVN1; C - SVN2; e D - SVN4.



Legenda: Nervura central - nc; feixe vascular - fv; estômato - e; tricoma tector - tt; tricoma captado - tc; sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas.
Fonte: Da Autora (2019).

Quanto aos estômatos, *Phyla betulifolia* tem estômatos do tipo anomocítico distribuídos em ambas as faces da folha, com maior densidade na face abaxial, sendo denominada de folha anfihipostomática (TABELA 3 e FIGURA 7). O sistema de ventilação SVN2 apresentou maior número de estômatos fechados e total, enquanto a maior relação entre o diâmetro polar e equatorial (DP/DE) foi encontrado no tratamento SVN4.

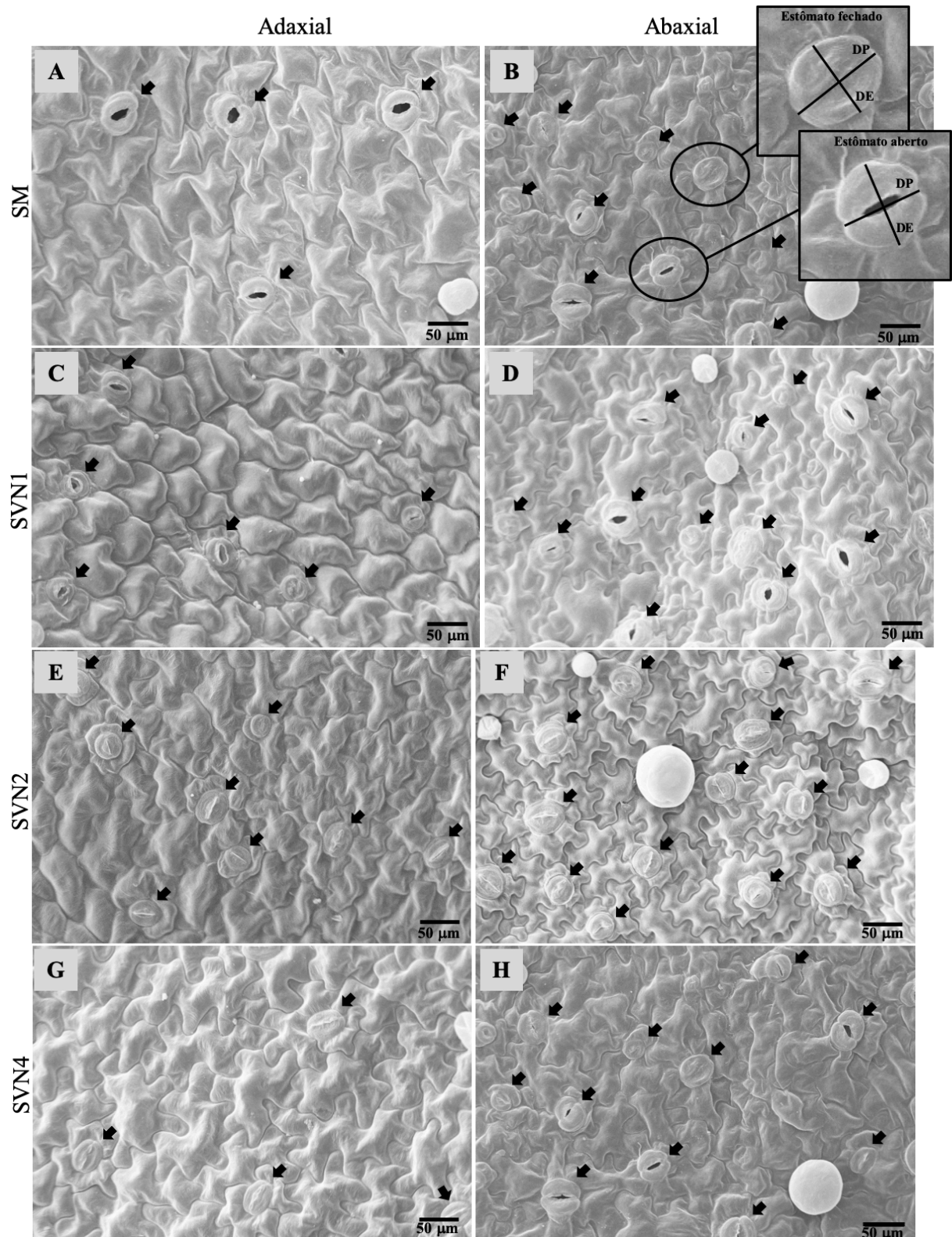
Tabela 3 - Densidade e diâmetro de estômatos de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação.

Sistemas de ventilação	EA	EF	Total	DP ----- (µm) -----	DE	DP/DE
Adaxial						
SM	97,54 a	26,98 b	124,52 b	17 a	18 a	0,94 c
SVN1	60,18 b	16,60 b	76,79 c	15 b	14 b	1,02 c
SVN2	0 c	172,25 a	172,25 a	16 a	14 b	1,15 b
SVN4	0 c	147,35 a	147,35 b	17 a	12 c	1,45 a
Abaxial						
SM	176,40 a	182,63 b	359,04 a	15 b	14 b	1,07 b
SVN1	139,05 a	228,29 b	367,34 a	17 a	16 a	1,04 b
SVN2	76,79 b	307,15 a	383,94 a	18 a	16 a	1,12 b
SVN4	47,73 b	186,78 b	234,52 b	19 a	14b	1,32 a

Legenda: número de estômatos abertos (EA) e fechados (EF); diâmetro polar dos estômatos (DP) e equatorial (DE); relação diâmetro polar e equatorial (DP/DE); sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas. As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

Figura 7 - Eletromicrografias de varredura de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação natural, mostrando a densidade estomática entre as faces adaxial e abaxial, as setas indicam os estômatos. A) e B) SM; C) e D) SVN1; E) e F) SVN2; G) e H) SVN4.



Legenda: Diâmetro polar dos estômatos (DP) e equatorial (DE); Sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas.

Fonte: Da autora (2019).

Phyla betulifolia é densamente pilosa, sendo identificados tricomas do tipo capitado com pedúnculo curto e morfologicamente denominados de maior (TTM) e menor (TCMe), e tricomas tectores (TT), todos com maior densidade na face abaxial, independente do sistema de cultivo ao qual as plântulas foram submetidas (TABELA 4).

Tabela 4 - Densidade de tricomas tectores e capitados em folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação.

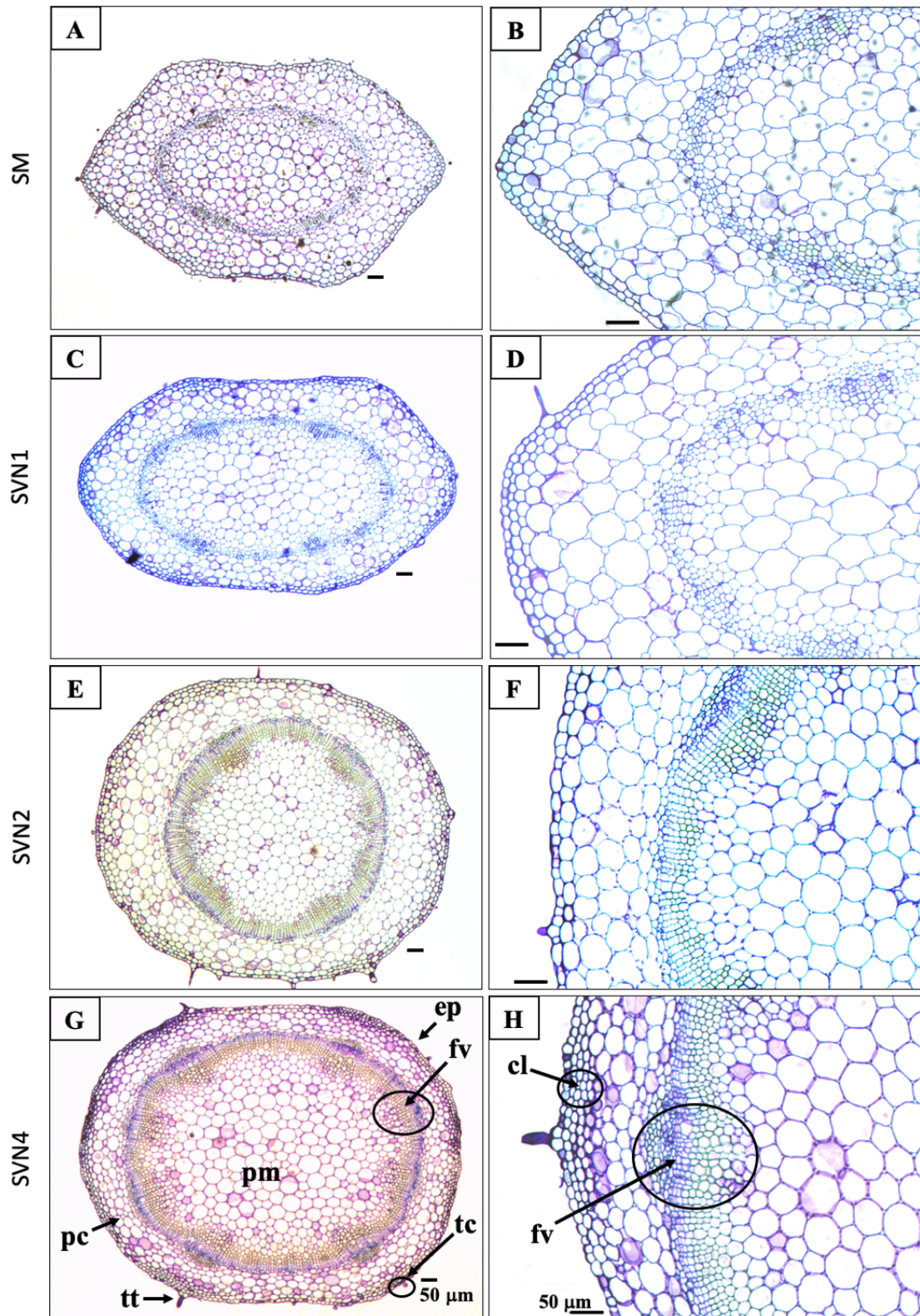
Sistemas de ventilação	TT	TCMe	TCM	TCMe + TCM
Adaxial				
SM	6 b	9,00 b	6,00 b	15,47 b
SVN1	14 a	21,33 a	7,17 b	28,80 a
SVN2	16 a	26,08 a	8,92 a	35,20 a
SVN4	7 b	5,25 b	6,58 b	12,27 b
Abaxial				
SM	11 b	55,92 a	11,75 b	67,67 a
SVN1	17 a	57,08 a	18,75 a	75,75 a
SVN2	14 a	47,42 b	11,08 b	58,67 b
SVN4	10 b	43,08 b	12,17 b	55,50 b

Legenda: número de tricomas tectores (TT); número de tricomas capitados menores (TCMe) e maiores (TCM); sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas. As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

Os cortes anatômicos realizados no terço médio da parte aérea de plântulas de *Phyla betulifolia* reforçaram a influência dos sistemas de ventilação na diferenciação dos tecidos do caule (FIGURA 8A, C, E e G). Em resposta aos diferentes sistemas de ventilação, o tratamento SVN4 desenvolveu maior área do cilindro central e feixes vasculares mais estruturados, quando comparados com SM (TABELA 5). A Figura 8 (B, D, F e H) evidencia detalhes quanto ao desenvolvimento dos feixes vasculares e do tecido de sustentação (colênquima).

Figura 8 - Fotomicrografias de secções transversais de caules de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. A e B- SM; C e D- SVN1; E e F- SVN2; G e H- SVN4.



Legenda: Epiderme - ep; parênquimas: cortical - pc e medular - pm; feixe vascular - fv; colênquima - cl; tricoma tector - tt; tricoma capitado - tc; sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas.

Fonte: Da Autora (2019).

Tabela 5 - Análises anatômicas de caules de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação.

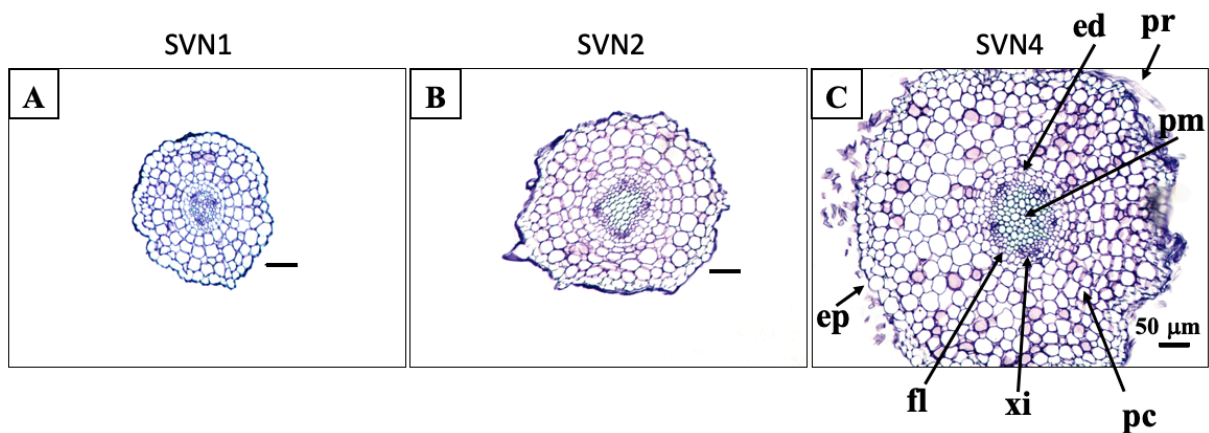
Sistemas de ventilação	AT	ACC	AFV	APC	APM	EPC
	----- (μm ²) -----					(μm)
SM	805.934 d	294.763 d	70.788 c	511.171 b	223.975 d	172 b
SVN1	865.182 c	385.802 c	85.148 c	479.380 b	300.654 c	153 c
SVN2	1.121.299 b	500.762 b	175.117 b	620.537 a	325.645 b	191 a
SVN4	1.351.571 a	848.481a	297.640 a	503.091 b	550.840 a	120 d

Legenda: Área total - AT; área do cilindro central - ACC; área do feixe vascular - AFV; área do parênquima cortical - APC; área do parênquima medular - APM; espessura do parênquima cortical - EPC; sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas. As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da Autora (2019).

Quanto às raízes, não houve formação de raízes suficientes para as análises anatômicas do tratamento SM. As plântulas cultivadas em SVN4 apresentaram melhor desenvolvimento radicular (FIGURA 9 e TABELA 6). O parênquima cortical foi mais volumoso e com maior número de camadas, e a área do cilindro vascular apresentou maior número de pólos de xilema e floema (cinco).

Figura 9 - Fotomicrografias de secções transversais de raízes de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação. A- SVN1; B- SVN2; C- SVN4.



Legenda: Epiderme - ep; parênquima cortical - pc; xilema - xi; folema - fl; pêlo radicular - pr; endoderme - ed; sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas.

Fonte: Da autora (2019).

Tabela 6 - Análises anatômicas de raízes de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação.

Sistemas de ventilação	AT	ACV	APC	APM	EPC
	----- (µm ²) -----				(µm)
SVN1	43.708 c	2.326 c	41.382 c	1.220 c	82 c
SVN2	79.076 b	6.384 b	72.692 b	3.459 b	109 b
SVN4	217.696 a	11.727 a	205.969 a	7.112 a	195 a

Legenda: Área total - AT; área do cilindro vascular (ACV); área do parênquima cortical - APC; área do parênquima medular - APM; espessura do parênquima cortical - EPC; sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas. As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da Autora (2019).

O Sistema de ventilação natural com quatro membranas apresentou os maiores acúmulos de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides, não havendo diferença estatística significativa para clorofila *b* e carotenoides entre os tratamentos SVN4 e SM (TABELA 7).

Tabela 7 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas em diferentes sistemas de ventilação.

Sistemas de ventilação	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenoides
	----- (mg g ⁻¹ MF) -----			
SM	0,854 b	0,247 a	1,101 b	0,194 a
SVN1	0,640 c	0,173 b	0,814 c	0,144 b
SVN2	0,676 c	0,184 b	0,860 c	0,151 b
SVN4	1,080 a	0,277 a	1,357 a	0,220 a

Legenda: Sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas. As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

Tanto o doseamento de compostos fenólicos, quanto os ensaios de defesa antioxidante apresentaram valores máximos no tratamento SVN4, com exceção do ensaio de capacidade de absorção do radical oxigênio - ORAC, o qual foi maior no tratamento SM.

Tabela 8 - Quantificação de compostos fenólicos, e atividade antioxidante de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação.

Sistemas de ventilação	CFT	CAT	DPPH	PQ	PR	ORAC
	(mg EAG g ⁻¹)	(mg EAA g ⁻¹)	----- IC ₅₀ (mg ml) -----			(mg ET g ⁻¹)
SM	6,55 d	5,56 c	0,83 c	2,21 b	50,59 d	45,63 a
SVN1	9,53 c	5,70 c	0,32 b	3,61 c	35,62 c	2,60 c
SVN2	10,22 b	9,22 b	0,30 b	4,52 d	31,06 b	7,73 b
SVN4	11,33 a	9,73 a	0,16 a	2,00 a	29,43 a	2,52 c

Legenda: Quantificação dos compostos fenólicos totais - CFT; capacidade antioxidante total - CAT, capacidade de eliminação de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - DPPH; poder quelante - PQ; poder redutor - PR; capacidade de absorção do radical oxigênio - ORAC. Sistema sem membranas - SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas. As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

4 DISCUSSÕES

Nas condições empregadas no presente estudo, o aumento do número de membranas proporcionou melhor crescimento e desenvolvimento das plântulas de *Phyla betulifolia*. Essa melhoria nos parâmetros de crescimento pode ser resultado da ausência de açúcar no meio de cultivo associado ao uso de membranas permeáveis, essa associação proveu a formação de um ambiente fotoautotrófico, permitindo ao tratamento SVN4 proporcionar melhores condições para o crescimento das plântulas de *P. betulifolia*. De acordo com Isah (2015), o acúmulo de biomassa no cultivo *in vitro*, resulta da interação entre as plântulas, composição do meio de cultivo, metabolismo de carboidratos e meio ambiente.

A retração observada no meio de cultivo está diretamente relacionada ao uso de membranas porosas, pois o aumento no número de membranas elevou a evapotranspiração dos frascos, ocasionando maior perda de água no ambiente de cultivo. Resultados semelhantes foram observados por Saldanha et al. (2012) em seu estudo sobre sistema alternativo de membranas na cultura de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae; e por Lazzarini et al. (2019) no cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis* em diferentes sistemas de ventilação natural. Estes autores observaram que houve perda de água no meio de cultivo, sendo esta perda influenciada pelos tipos de vedação dos frascos. De acordo com Pérez-Jimenez et al. (2015), essas condições aumentariam a taxa fotossintética das plântulas, proporcionando melhores respostas de crescimento.

O tratamento SM foi o que mais afetou negativamente o crescimento das plântulas de *Phyla betulifolia*, principalmente a formação de raízes, reforçando a importância da eficiência nas trocas gasosas para a morfogênese *in vitro* da espécie. De acordo com Chandra et al. (2010), o melhor desenvolvimento de raízes em plântulas cultivadas *in vitro* levam a aclimatização mais rápida e uma melhor taxa de sobrevivência quando transferidas para condições de campo.

A dimensão relativa do aparelho fotossintético é expressa pela razão de área foliar (RAF), um componente morfofisiológico que demonstra a área foliar útil para a fotossíntese Benincasa (1988), um parâmetro importante para a avaliação dos efeitos ambientais sobre o vegetal (PAIVA; OLIVEIRA, 2014). A RAF pode ser desmembrada em dois componentes (AFE e RPF), e sua variação ocorrerá em função de um ou dos dois (BENINCASA, 2003). Provavelmente, a maior disponibilidade de CO₂ nos frascos favoreceu o processo de divisão celular, a maturação de cloroplastos e a expansão celular das folhas de *Phyla betulifolia*. As diferenças encontradas para a AFE seguem o mesmo padrão observado tanto para a área foliar total (AFT), quanto para a RAF, o aumento nos valores é decorrente do crescimento

individual das folhas, esses resultados permitem inferir que, em diferentes sistemas de ventilação natural, a RAF foi um parâmetro bastante influenciado pela área foliar específica.

Por tratar-se de um componente morfológico e anatômico, os valores obtidos para a AFE estão relacionados com a composição interna (número e/ou tamanho) das células do mesofilo (BENINCASA, 2003; COSTA, et al., 2014). Desta forma, quando o peso é considerado uma expressão de volume, tem-se o inverso da AFE (peso específico de folha - PEF) refletindo a espessura foliar. Para *Phyla betulifolia*, os maiores valores de PEF foram observados em SM corroborando com os parâmetros anatômicos, onde os maiores valores para altura do mesofilo (AM) e limbo foliar (LM) foram alcançados no tratamento SM.

A RPF é uma variável muito importante para espécies cujo interesse econômico concentra-se nas folhas (ARMOND et al., 2016), ela representa a fração de matéria seca que não é exportada das folhas para as outras partes da planta (BENINCASA, 2003; COSTA, et al., 2014). No presente estudo, não houve diferença significativa para a RPF, provavelmente, este resultado é reflexo da relação existente entre a matéria seca de folha (MSF) e a matéria seca total (MST), por exemplo, o tratamento SM apresentou menores valores de MSF e MST, enquanto que SVN4 proporcionou maiores valores de MSF e MST, este comportamento foi observado para todos os sistemas de cultivo, fazendo com que os valores obtidos para RPF fossem muito próximos.

Tanto a morfologia quanto a fisiologia dos vegetais são altamente dependentes das condições ambientais, sendo a folha o órgão vegetativo que apresenta maior plasticidade, ou seja, maior capacidade de adaptação frente a mudanças (GUERRA; SCREMIN-DIAS, 2018). As plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas em SVN4 apresentaram maior espessura do parênquima paliçádico, principal tecido relacionado ao processo fotossintético (ESAU, 1974), e mais espaço intercelular. Espaços intercelulares bem desenvolvidos nas camadas do mesofilo (parênquima paliçádico e esponjoso) facilitam as trocas gasosas, contribuindo para maior eficiência fotossintética devido a maior retenção de gases nesses espaços, proporcionando maior fixação de CO₂ (AFREEN, 2005; EVERT; EICHHORN, 2014; TAIZ et al., 2017).

Os resultados anatômicos e os valores obtidos através dos cálculos dos índices fisiológicos de crescimento (RAF, AFE, RPF) corroboram com os resultados encontrados para a quantificação do teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides em plântulas de *Phyla betulifolia*. Esses parâmetros indicam que houve maior produção de fotossintatos em SVN4 decorrente da maior fixação de carbono pelas plântulas presentes neste tratamento.

Quanto ao sistema vascular das folhas, as plântulas procedentes do tratamento SM apresentaram menor desenvolvimento, com organização característica de plântulas que foram submetidas a sistema de cultivo heterotrófico. Iarema et al. (2012) observaram que no cultivo *in vitro* de *Pfaffia glomerata*, as plântulas cultivadas sem a adição de sacarose, independente do sistema de membranas, apresentaram um sistema vascular pouco desenvolvido, no entanto, as plântulas cultivadas com duas membranas tiveram um feixe vascular menos comprometido que o sistema sem membranas.

Phyla betulifolia é uma espécie que apresenta folhas hipoanfiestomáticas com estômatos do tipo anomocíticos. De acordo com ESAU (1976) os estômatos são estruturas encontradas em qualquer parte da planta, sendo mais comuns e abundantes em folhas. Os estômatos são uma adaptação crucial tanto para evitar a dessecação durante o processo de transpiração, quanto para a realização da fotossíntese, pois é através dos ostíolos que ocorre a entrada de CO₂ que será fixado no processo fotossintético (TAIZ et al, 2017), além disso, o tamanho do poro estomático pode ser influenciado por vários sinais endógenos e ambientais (EVERT; EICHHORN, 2014).

Apesar de *Phyla betulifolia* apresentar maior número de estômatos no tratamento SVN2 (555 estômatos), a relação existente entre o diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) deu indícios de que SVN4 foi responsável pelo maior número de estômatos considerados funcionais, isto porque, quanto maior o valor encontrado para DP/DE mais elipsoides são os estômatos, quanto mais elipsoides, mais funcionalidade ele apresenta (MARTINS et al., 2009). De acordo com Khan et al. (2003) e Afreen (2005), os estômatos que apresentam forma arredondada são geralmente considerados associados à função estomática anormal no cultivo *in vitro*, sendo que a anormalidade anatômica e a não funcionalidade dos estômatos são mais recorrentes, em meio heterotrófico ou fotomixotrófico. Taiz et al. (2017), relataram que sob níveis aumentados de CO₂ as folhas tendem a manter seus estômatos mais fechados. Além disso, quanto mais funcionais os estômatos, maior é o acúmulo de matéria seca. Os resultados encontrados para DP/DE corroboram com os valores encontrados para o doseamento de fotossintatos, onde a maior produção de pigmentos fotossintéticos ocorreu no tratamento SVN4.

A face abaxial da folha de *Phyla betulifolia* também apresentou maior quantidade de tricomas, tanto do tipo capitado (provavelmente glandulares), quanto tectores. Esses tipos de tricomas são compatíveis com os descritos por Metcalfe e Chalk (1950) para a família Verbenaceae. Os tricomas são anexos epidérmicos que possuem diferentes formas e funções, e são muito importantes no auxílio da identificação de plantas com potenciais propriedades

medicinais (OLIVEIRA; AKISSUE, 2009). Ainda segundo os autores, os tricomas classificados como tectores, desempenham uma importante função de proteção, evitando que haja transpiração excessiva, e protegendo enzimas e outros compostos celulares.

As respostas anatômicas do caule de *Phylla betulifolia* reforçam a influência dos sistemas de ventilação sobre a diferenciação tecidual, a limitação das trocas gasosas no ambiente de cultivo, provoca aumento da umidade interna e limitação da concentração de CO₂, que irá contribuir para a redução da diferenciação dos tecidos vasculares de plântulas propagadas *in vitro* (MOHAMED; ALSADON, 2010). Segundo CASTRO; PEREIRA; PAIVA (2009) o parênquima cortical é um importante indicador de respostas adaptativas podendo aumentar ou diminuir a sua espessura conforme as pressões ambientais. Ainda segundo os autores, caules em estrutura primária precisam resolver problemas relacionados a sustentação evitando que ocorra a curvatura de suas estruturas através da formação de reforços de fibras ou de colênquima.

Em vista transversal, a anatomia radicular apresentou maior diferenciação entre os tecidos para as plântulas cultivadas em SVN4, confirmando que o sistema de ventilação natural com quatro membranas promoveu melhor diferenciação morfológica de *Phylla betulifolia* cultivada *in vitro*, produzindo plântulas mais vigorosas e adaptadas para a fase de aclimatização. De acordo com Afreen (2005) e Chandra et al. (2010), um sistema radicular bem formado é essencial para o crescimento das plântulas cultivadas *in vitro*, pois estas estruturas são importantes na absorção de água e nutrientes.

O presente estudo reforça a teoria de que o aumento no número de membranas, assim como a facilitação das trocas gasosas favorecem os ganhos de massa seca e melhoram a eficiência fotossintética das plântulas cultivadas *in vitro*, tal como demonstrado por Batista et al. (2017) para *Capsicum annuum* L. - Solanaceae e Saldanha et al. (2012, 2014) para *Pfaffia glomerata*. De acordo com Barbosa (2016) e Taiz et al. (2017) concentrações mais elevadas de CO₂ sustentam taxas fotossintéticas mais altas, além disso, as oscilações na taxa fotossintética líquida de explantes cultivados *in vitro*, não são atribuídas à baixa fotossíntese, mas sim à baixa concentração de CO₂ dentro do recipiente de cultivo, devido à reduzida troca gasosa com a atmosfera. De acordo com Shin; Park; Paek (2014), mudanças nas condições de cultivo *in vitro* favorecem a sobrevivência e o crescimento das plântulas na fase *ex vitro*.

Por tratar-se de um subproduto do metabolismo vegetal, as espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas a partir de reações metabólicas celulares como a fotossíntese e a respiração (DAKAH et al., 2013; DIETZ; MITTLER; NOCTOR, 2016).

Nas condições empregadas na presente pesquisa, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenhou um papel positivo no crescimento e desenvolvimento das plântulas cultivadas em SVN4, indicando que houve equilíbrio entre a formação e a eliminação das EROs. De acordo com a “Síndrome da Adaptação Geral” do estresse proposta em 1936, há três fases de respostas ao estresse oxidativo: a primeira delas é denominada de ‘alarme’, onde há uma sinalização que resulta na aclimatação do organismo; após a adaptação, vem a ‘resistência’ onde os mecanismos de proteção e reparo são aprimorados; quando a exposição ao estresse ultrapassa essas duas fases, os limites de tolerância são ‘esgotados’ originando desordens e danos irreparáveis (ROACH et al., 2018).

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Estudos demonstram que há correlação entre as características fenólicas e morfológicas, as quais são mais desenvolvidas em ambientes compostos por altas taxas de CO₂, corroborando com os resultados encontrados para *Phyla betulifolia*, onde o tratamento SVN4 apresentou maiores teores para o doseamento de compostos fenólicos, e plântulas com melhores características morfológicas. Os compostos fenólicos são substâncias que possuem uma forte ligação com a defesa antioxidante, eles conferem proteção a planta contra o estresse oxidativo ocasionados pela exposição à fatores abióticos, e atuam tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo através da neutralização ou sequestro dos radicais livres, e realizando a quelatação de metais de transição (HASLAM, 1996; DALMAGRO et al., 2018). De acordo com Booker (2000), a concentração de compostos fenólicos varia entre órgãos, tecidos e estágio de desenvolvimento, e é influenciada por fatores ambientais, dentre eles a disponibilidade de água e a concentração de CO₂.

A capacidade antioxidante total (CAT) é um ensaio que avalia a capacidade antioxidante total de uma mistura, e é baseado na redução do Md⁺⁶ a Md⁺⁵ (Prieto; Pineda; Aguilar, 1999; Oliveira et al., 2016). A medida em que ocorre o processo de redução por substâncias antioxidantes, a mistura perde a coloração amarela, tornando-se verde. Para o presente estudo, o tratamento SVN4 foi responsável pela maior capacidade de redução de molibdato de amônio.

Na reação de oxidação e redução entre o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e a espécie antioxidante, o elétron desemparelhado do nitrogênio se emparelha com o elétron cedido por um radical hidrogênio fornecido pelo composto antioxidante (BOROSKI et al., 2015). Ao considerar que o valor de IC₅₀ significa a concentração de um antioxidante que causa 50% de redução na absorvância do DPPH, temos que os menores valores refletem a maior capacidade de defesa antioxidante de uma amostra. Com isso, foi observado para este

ensaio que, as plântulas cultivadas em SVN4 apresentaram maior capacidade de defesa para o ensaio DPPH.

Quanto ao poder quelante, na tentativa de impedir a oxidação de íons metálicos, substâncias que imobilizam o íon Fe^{2+} através da formação de quelatos podem ser utilizados, atuando na defesa antioxidante (LOPES; SCHULMAN; HERMES-LIMA, 1999). Neste ensaio a ferrozina se une ao íon Fe^{2+} formando um complexo de cor rosa. No entanto, quando a amostra contém substâncias que também formam complexos estáveis com o íon Fe^{2+} , é gerada uma competição com a ferrosina, provocando a diminuição da absorvância do complexo $[\text{Fe}^{2+}(\text{ferrozina})_3]^{2+}$, este é um indicativo de que a amostra analisada apresenta atividade de defesa antioxidante (SENEVIRATHNE et al., 2006). Para *Phyla betulifolia*, as plântulas oriundas do tratamento SVN4, também foram responsáveis pela maior atividade de defesa antioxidante, determinado pelo teste poder quelante.

No ensaio para a determinação do poder redutor, a determinação da força de redução de uma amostra utilizando o reagente ferricianeto de potássio, é realizado pela formação inicial de um complexo oxidado de Fe^{3+} , após reação com cloreto férrico. Dependendo do poder de redução de cada amostra, a cor amarela da solução de teste muda para vários tons de verde e azul, dependendo do poder de redução das amostras (MIGUEL, 2010). *Phyla betulifolia* teve maior poder de redução para o tratamento SVN4.

O ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio) é um ensaio que verifica a atividade de eliminação de antioxidantes contra uma fonte radicalar (peroxil) biologicamente relevante induzida usando AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)) (PRIOR; CAO, 1999). Para *Phyla betulifolia*, este foi o único ensaio com maior resultado observado para o tratamento SVN1.

Os resultados obtidos para os diferentes ensaios de defesa antioxidante, indicaram que o sistema de ventilação natural com 4 membranas (SVN4) foi o tratamento que proporcionou maior produção de compostos envolvidos nos mecanismos de defesa antioxidante de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivada em diferentes sistemas de ventilação natural. Esses resultados demonstram a importância da utilização de mais de um método para avaliação da capacidade de defesa antioxidante de uma amostra (Cömert; Gökmen 2018).

5 CONCLUSÃO

O sistema de ventilação natural com quatro membranas (SVN4) proporcionou maior crescimento vegetativo das plântulas de *Phyla betulifolia*, as quais foram

morfoanatomicamente mais estruturadas, apresentaram maior teor de fotossintatos e compostos fenólicos, e maior produção de compostos de defesa antioxidante.

Diante do que foi exposto, considera-se o sistema de ventilação natural com quatro membranas, o tratamento mais eficiente para a produção de mudas *Phyla betulifolia*.

REFERÊNCIAS

- AFREEN, F. Physiological and anatomical characteristics of *in vitro* photoautotrophic plants. In: KOZAI T.; AFREEN F.; ZOBAYED S. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Dordrecht: Springer, 2005.
- ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 93-101, 2012.
- ALVES, E.; LEITE, B.; MARUCCI, R. C.; PASCHOLATI, S. F.; LOPES, J. R.; ANDERSEN, P. C. Retention sites for *Xylella fastidiosa* in four sharpshooter vectors (Hemiptera: Cicadellidae) analyzed by scanning electron microscopy. **Current Microbiology**, New York, v. 56, n. 5, p. 531-538, 2008.
- ARMOND, C.; OLIVEIRA, V. C. de; GONZALES, S. D. P.; OLIVEIRA, F. É. R. de; SILVA, R. M. da; LEAL, T. T.; REIS, A. S. dos; SILVA, F. da. Desenvolvimento inicial de plantas de abobrinha italiana cultivada com húmus de minhoca. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 34, n. 3, 2016.
- BARBOSA, R. R. do N. **Cultivo *in vitro* de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas**. 2016. 65 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2016.
- BATISTA, D. S.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M. do; SALDANHA, C. W.; OTONI, W. C. Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, 2017.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 41p.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003.
- BOOKER, F.L. Influence of carbon dioxide enrichment, ozone and nitrogen fertilization on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf and root composition. **Plant Cell and Environ**, v. 23, n. 6, p. 573-583, 2000.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. de. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. Curitiba: Appris, 141p, 2015.
- CASTRO, E. M. de; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: Editora UFLA, 2009. 234p.

- CARVALHO, A. C. P. P. de; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E. E. P. de; SOUZA, F. V.D.; PETERS, J. A.; WILLADINO, L., CÂMARA, T. R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant cell culture e micropropagation**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 30-60, 2011.
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, set. 2010.
- CÖMERT, E.D.; GÖKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**. v. 105, p. 76-93, 2018.
- COSTA, A. C.; ROSA, M.; MEGGUER, C. A.; SILVA, F. G.; PEREIRA, F. D.; OTONI, W. C. A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 443-454, 2014.
- DALMAGRO, A. P.; CAMARGO, A.; SILVA FILHO, H. H.; VALCANAIÁ, M. M.; JESUS, P. C.; ZENI, A. L. B. Seasonal variation in the antioxidant phytochemicals production from the *Morus nigra* leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 323-330, 2018.
- EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Raven|Biologia vegetal**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2014. 1.637 p.
- ESAU, K. Anatomia das plantas com sementes. Sao Paulo: Edgard Blucher, 1974. 293 p.
- ESAU, K. Anatomia das plantas com sementes. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. 293p.
- GUERRA, A.; SCREMIN-DIAS, E. Leaf traits, sclerophylly and growth habitats in plant species of a semiarid environment. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 1, p. 131-144, 2018.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.
- HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n.12, p. 1332-1334, 1979.
- IAREMA, Lourdes et al. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, n. 2, p. 227-238, 2012.
- ISAH, T. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. **Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica**, v. 57, n. 2, p. 9-28, 2015.
- JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman, 408 p., 1962.

- KHAN, P. S. S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.
- KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, T. H. **Micropropagation technology and application**. Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 447 - 469.
- LAZZARINI, L.E.S.; BERTOLUCCI, S.K.V.; DE CARVALHO, A.A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; YUCESAN, B.; PINTO, J. E. B. Explant type and natural ventilation systems influence growth and content of carvacrol and thymol of *Lippia gracilis* Schauer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 136, n. 1, p. 1-11, 2019.
- LOPES, G. K.; SCHULMAN, H.M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochim Biophys Acta**, v. 1472, p. 142-152, 1999.
- LUNA, C. V.; GONZALEZ, A. M.; MROGINSKI, L. A.; SANSBERRO, P. A. Anatomical and histological features of *Ilex paraguariensis* leaves under different *in vitro* shoot culture systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 457-467, 2017.
- MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M. de; SILVA, A. P. O. da; OLIVEIRA, C.; ALVES, E. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 82- 87, 2009.
- METCALFE, C. R. E; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Claredon, Oxford. 1500p. 1950.
- MIGUEL, M. G.; NUNES, S.; DANDLEN, S. A.; CAVACO, A. M.; ANTUNES, M. D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3418-23, 2010.
- MOHAMED, MA-H.; ALSADON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 295-300, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid Growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, p.4 73-97, 1962.
- O'BRIEN T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-26, 2001.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 228p.

OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clacdad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, Dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. V. 18, p. 230-239. 2016.

OYAIZU, M. Studies on Products of Browning Reaction Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**. V. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. de. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 2. ed., revisada e ampliada. Lavras. Editora UFLA, 2014. 119 p.

PÉREZ-JIMÉNEZ, M.; LÓPEZ-PÉREZ, A. J.; OTÁLORA-ALCÓN, G.; MARÍN-NICOLÁS, D.; PIÑERO, M. C.; AMOR, F. M. del. A regime of high CO₂ concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 3, p. 547-557, 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PRIOR, R. L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p.1173-1181, 1999.

RAHMAN, M. H.; ALSADON, A. A. Photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation of three potato cultivars. **Journal of Bio-Science**, v. 15, p. 111-116, 2007.

RODRIGUES, M.; COSTA, T. H. F.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 1, p. 67-72, 2012.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.

SALDANHA, C. W.; CLEBER WITT SALDANHA; OTONI, C. G.; ROCHA, D. I.; CAVATTE, P. C.; DETMANN, K. DA S. C.; TANAKA, F. A. O.; DIAS, L. L. C.; DAMATTA F. M.; OTONI, W. C. CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 118, n. 1, p. 87-99, 2014.

SENEVIRATHNE, M.; KIM, S.; SIRIWARDHANA, N.; HA, J.; LEE, K.; YOU-JIN JEON, Y. Antioxidant Potential of *Ecklonia cava* on Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal Chelating, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition. **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 1, p. 27-38, 2006.

- SHIN, K. S.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis hybrid* cultivated in different microenvironments *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 26–33, 2014.
- SILVA, A. B.; CORREA, V. R. S.; TOGORO, A. H.; SILVA, J. A. dos S. Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) micropropagado. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 380-386, 2014.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- XIAO, Y., KOZAI, T. *In vitro* multiplication of static plantlets using sugar-free media. **Scientia Horticultural**, v. 109, p. 71-77, 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6, ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 149-158, May 2011.
- WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

CAPÍTULO 4 - CULTURA *in vitro* DE *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene: INTENSIDADE E QUALIDADE DA LUZ NO CRESCIMENTO, DEFESA ANTIOXIDANTE E PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS

RESUMO

As plantas da família Verbenaceae são bem conhecidas por apresentarem constituintes com importantes propriedades bioativas. *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene é uma espécie aromática com poucos relatos de usos na literatura. Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes intensidades e qualidades de luz na morfogênese, acúmulo de pigmentos fotossintéticos, defesa antioxidante e produção de constituintes voláteis em plântulas de *P. betulifolia* cultivadas *in vitro*. Segmentos nodais foram cultivados em meio básico MS. As plântulas foram mantidas sob cinco intensidades de luz: 20, 57, 78, 102, 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e, sob diferentes espectros luminosos: vermelho (V); azul (A); combinações de azul e vermelho A:V (1:2,5; 2,5:1; 1:1); branco LED (BR); verde (VD); e amarelo (AM), obtidos por Diodos Emissores de Luz (LEDs) e fluorescente branca fria (FL), por 45 dias. A intensidade de luz de 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionou maior acúmulo de matérias secas (MSF, MSR e MST). Entretanto, esse tratamento foi responsável pela menor produção de clorofila *a*, *b* total e carotenoides, além de menor defesa antioxidante pelo método DPPH. Foram identificados 25 compostos voláteis, sem diferenças entre os tratamentos. Quanto a qualidade de luz, as combinações dos espectros A:V (1:2,5 e 1:1) foram responsáveis pelo maior acúmulo de matéria seca. A produção de fotossintatos, clorofila *a* e carotenoides foi maior em VD, clorofila *b* e total em AM. O teor de CFT, assim como a capacidade de defesa antioxidante pelos ensaios CAT, DPPH, e poder quelante foram mais expressivos no tratamento A. O perfil cromatográfico obtido para as amostras V indicou diferenças qualitativas na composição química, sendo o que apresentou menor número de constituintes. Conclui-se que as melhores condições de cultivo *in vitro* para a espécie *P. betulifolia* são atingidas sob maior intensidade luminosa (139 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Já os espectros de luz A e as combinações de A:V (2,5:1 e 1:2,5), são os tratamentos responsáveis pela propagação de plântulas com melhores condições para a fase de aclimatização.

Palavras-chave: LEDs. Pigmentos fotossintéticos. Compostos fenólicos.

CHAPTER 4 - *In vitro* CULTURE OF *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene: INTENSITY AND QUALITY OF LIGHT ON GROWTH, ANTIOXIDANT DEFENSE AND PRODUCTION OF VOLATILE COMPOUNDS

ABSTRACT

The plants of Verbenaceae family are well known for presenting constituents with important bioactive properties. *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene is an aromatic species with few reports of uses in the literature. The objective of this study was to evaluate the effect of different intensities and light qualities on morphogenesis, accumulation of photosynthetic pigments, antioxidant defense and production of volatile compounds in *P. betulifolia* plantlets grown *in vitro*. Nodal segments were cultured in MS medium. The plantlets were kept under five light intensities: 20, 57, 78, 102, 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and, under different luminous spectra: red (V); blue (A); combinations of blue and red A: V (1:2.5; 2.5:1; 1:1); white LED (BR); green (VD); and yellow (AM), obtained by Light Emitting Diodes (LEDs) and cold white fluorescent (FL) for 45 days. The light intensity of 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided greater accumulation of dry matter (MSF, MSR and MST). However, this treatment was responsible for the lower production of chlorophyll *a*, *b* total and carotenoids, as well as lower antioxidant defense by the DPPH method. 25 volatile compounds were identified, with no differences between treatments. Regarding light quality, combinations of the A:V (1: 2.5 and 1: 1) spectra were responsible for the greater accumulation of dry matter. The production of photosynthates, chlorophyll *a* and carotenoids were higher in VD, chlorophyll *b* and total in AM. The CFT content, as well as the antioxidant defense capacity by the CAT, DPPH, and chelating power tests were more expressive in A treatment. The chromatographic profile obtained for the V samples indicated differences in the qualitative chemical composition of the samples, being the one that presented a smaller number of constituents. It is concluded that the best *in vitro* culture conditions for the species *P. betulifolia* are reached under higher light intensity (139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The light spectrum A and the combinations of A:V (2.5:1 and 1:2,5) were the treatments responsible for the propagation of plantlets with better conditions for the acclimatization phase.

Keywords: LEDs. Photosynthetic pigments. Phenolic compounds.

1 INTRODUÇÃO

A busca por plantas que possam auxiliar no tratamento de doenças, tem possibilitado a realização de estudos que visam compreender a influência dos fatores ambientais na morfogênese, síntese e acúmulo de compostos oriundos do metabolismo vegetal (BORGES et al., 2017). A luz é um dos principais sinais percebidos pelas plantas, sendo fonte de energia para a realização da fotossíntese, ativação da fotomorfogênese e outros processos fisiológicos como a produção de metabólitos secundários (KOZAI e ZHANG, 2016).

As respostas a diferentes intensidades e qualidades de luz, assim como de todos os fatores que influenciam o crescimento de uma planta, pode variar de acordo com cada espécie (SCHUERGER et al., 1997; ANTONOPOLOU et al., 2004). Os vegetais percebem os sinais luminosos por meio dos fotorreceptores que detectam comprimentos de onda específicos. De acordo com FRANKHAUSER; CHORI, 1997; TAIZ et al. (2017) os fitocromos são fotorreceptores que medeiam os efeitos da luz vermelha (620-700 nm) e vermelho-distante (710-850 nm), enquanto que os criptocromos e as fototropinas intercedem nas respostas a luz UV-A/azul (320-500 nm).

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos vegetais bastante utilizada em plantas medicinais visando a obtenção de material vegetal de alta qualidade e a otimização da produção de metabólitos secundários (BOONSNONGCHEEP et al., 2010; MURTHY et al., 2014). Entretanto, um dos desafios enfrentados pela cultura de tecidos é a manutenção de condições ideais de luz que permitam o bom desenvolvimento das plantas (DONG et al., 2014; SAMUOLIENĖ et al., 2013). Normalmente as lâmpadas fluorescentes branca fria são utilizadas como fonte de luz nas salas de crescimento (KIM et al., 2005), entretanto, esse tipo de luz possui uma composição ampla e heterogênea que pode prejudicar o crescimento do vegetal (LAZZARINI et al., 2017). Neste contexto, desde a década de 1990 as pesquisas com aplicações de *LEDs* (diodos de emissão de luz) na horticultura têm sido intensificadas (MASSA; NORRIE, 2015). Os *LEDs* surgiram como fonte de luz alternativa ao cultivo *in vitro* principalmente por permitir um maior controle quanto a intensidade de luz e distribuição espacial de energia, tornando-se uma fonte de luz mais eficiente (SILVA et al. 2014).

Muitos estudos têm investigado a influência da intensidade e qualidade espectral na morfogênese de plântulas, e na síntese de metabólitos secundários de espécies medicinais. Dentre eles podemos citar: *Rehmannia glutinosa* Libosch. (Scrophulariaceae) (MANIVANNAN et al., 2015); *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) (ALVARENGA et al., 2015); *Pectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Lamiaceae) (SILVA et al., 2017); e *Lippia gracilis* (Verbenaceae) (LAZZARINI et al., 2018).

Phyla betulifolia (Kunth) Greene, é uma espécie aromática da família Verbenacea, com potencial uso medicinal, entretanto, pouco relatada na literatura.

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar como diferentes intensidades e qualidades de luz afetam a morfogênese, acúmulo de pigmentos fotossintéticos, atividade antioxidante e produção de constituintes voláteis em plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos e identidade do material vegetal

Os experimentos foram executados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura - DAG, na Universidade Federal de Lavras - UFLA, MG. Os doseamentos de pigmentos fotossintéticos e compostos fenólicos, os ensaios antioxidantes, e o perfil da fração volátil foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura - DAG, UFLA.

O material botânico foi depositado no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil (Herbários da ESAL), e no Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (PANG), catalogados sob os números de registro ESAL 30314 e PAMG 57966.

2.2 Condições gerais dos experimentos

2.2.1 Origem do explante

Os experimentos foram realizados com segmentos nodais provenientes de plântulas de *Phyla betulifolia*, pré-estabelecidas *in vitro*, cultivadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h, sob lâmpada fluorescente com intensidade de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, conforme descrito no capítulo 2.

Segmentos nodais (± 1 cm) foram excisados de plântulas cultivadas *in vitro* e inoculadas sob fluxo laminar asséptico em tubos de ensaio (20x150 mm) contendo 15 mL de meio MS, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e com $5,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (Himedia[®], tipo I) e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$.

2.2.2 Cultivo sob diferentes intensidades de luz

Após inoculação, os explantes foram cultivados sob cinco intensidades de luz: 20, 57, 78, 102, e 139 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtidas com Diodos Emissores de Luz (*LEDs*), sob um fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. As intensidades luminosas foram mensuradas por um aparelho QSO-S Procheck + Sensor- PAR Photon Flux (Decagon Devices-Pullman-Washington-USA).

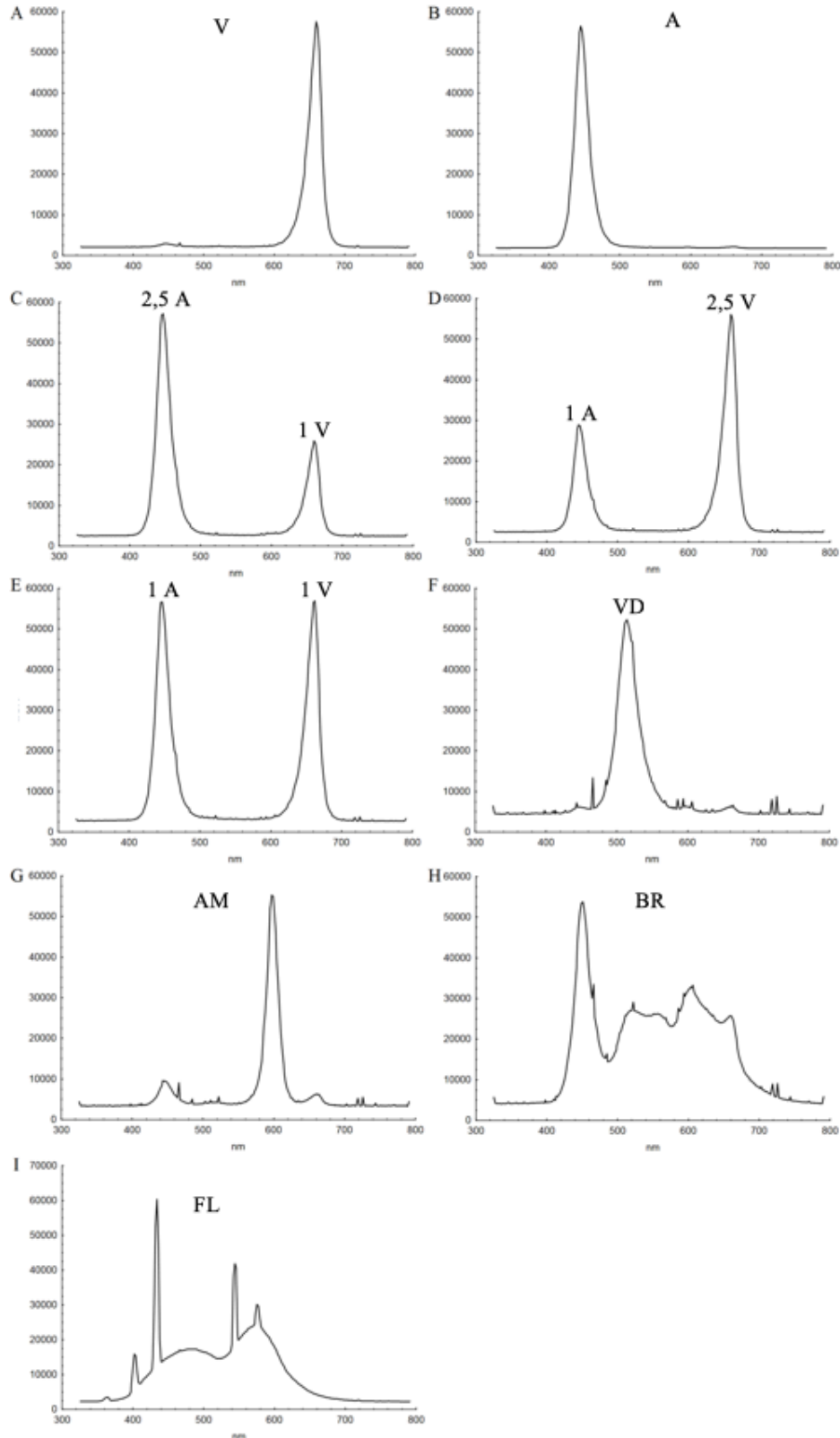
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 5 intensidades luminosas: 20, 57, 78, 102, e 139 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e cada tratamento foi constituído por 5 repetições (5 tubos) com 1 explante por tubo, totalizando 125 plântulas.

2.2.3 Cultivo sob diferentes qualidades de luz

Após inoculação, os explantes foram cultivados sob diferentes diodos emissores de luz *LEDs* (TECNAL[©] Piracicaba, Brasil), com intensidade de 42 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$: vermelho (V), azul (A), combinações de azul e vermelho: (1A:2,5V; 2,5A:1V; 1A:1V), branco *LED* (BR), verde (VD), e amarelo (AM); e sob lâmpada fluorescente branca fria (FL) com intensidade de 39 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os espectros de luz foram medidos por um espectrômetro manual SPECTRA PEN Z850 (Qubit Systems-Kingston, Ontario-Canadá) e estão representados na figura 1.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), constituído por 9 espectros luminosos: V, A, combinações de A:V (1A:2,5V; 2,5A:1V; 1A:1V), BR, FL, VD, e AM; e 5 repetições (5 tubos). Cada repetição foi representada por 1 tubo com 1 explante, totalizando 225 plântulas.

Figura 1 - Perfis espectrais das fontes de luz utilizadas no experimento, as proporções a seguir indicam a relação entre as intensidades de absorção dos diodos emissores de luz: A) Vermelho - V; B) Azul - A; C) 2,5 Azul: 1 Vermelho; D) 1 Azul: 2,5 Vermelho; E) 1 Azul: 1 Vermelho; F) Verde - VD; G) Amarelo - AM; H) Branca LED - BR; I) Fluorescente - FL.



Fonte: Da autora (2019).

2.3 Análise de crescimento

As análises de crescimento foram realizadas conforme descrito no capítulo 3, sendo avaliados os comprimentos do broto (CB) e de raiz (CR); os números de folhas (NF) e raízes (NR); matérias secas de folha (MSF), caule (MSC), raiz (MSR) e total (MST); e Área foliar total (AFT). A partir da área foliar, foram calculados a razão de área foliar ($RAF = AFT/MST$), área foliar específica ($AFE = AFT/MSF$), peso específico de folha (PEF), e razão de peso das folhas ($RPF = MSF/MST_{\text{parte aérea}}$), de acordo com o proposto por Benincasa (2003).

2.4 Análise de pigmentos fotossintéticos

O doseamento de pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenoides foram extraídos e analisados seguindo a metodologia descrita por Hiscox e Israelstam (1979) e, os comprimentos de onda e as equações de Wellburn (1994), como previamente descrito no capítulo 3.

2.5 Quantificação de compostos fenólicos e ensaios antioxidantes

Conforme descrito no capítulo 3, foram utilizadas análises espectrofotométricas para a quantificação de compostos fenólicos e os ensaios antioxidantes.

2.6 Análise de fração volátil

Para a extração da fração volátil de *Phyla betulifolia*, empregou-se a técnica de *headspace* estático, a qual foi previamente otimizada. Para isto, amostras de 90 mg de folhas secas de *P. betulifolia*, foram acondicionadas em *vials* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE e, previamente incubadas em estufa de circulação fechada a 150°C por 2h. Em seguida, os *vials* foram transferidos para o extrator *headspace* automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM (Cromatógrafo gasoso/Espectrômetro de Massa). As condições operacionais do extrator foram as seguintes: temperatura de incubação da amostra de 110°C durante 30 min, temperatura da seringa a 120°C. O volume de injeção foi de 500 µL da fase de vapor, injetados em modo *split* na razão 20:1.

As análises químicas por CG/EM foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, California, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1 scan/s, com intervalo de aquisição de matérias de 40-400 m/z.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e da linha de transferência foram mantidas em 250°C. A temperatura inicial do forno foi de 60°C, seguido por uma rampa de temperatura de 3°C/min até 160°C, seguida de uma rampa de 10°C/min até 240°C. As concentrações dos constituintes presentes na fração volátil foram calculadas através da área integral de seus respectivos picos, relacionando a área total de todos os picos.

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos a co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2017). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van den Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS; WEERASOORIYA; GAO, 2014; DAVIES, 1990).

2.7 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software R.

3 RESULTADOS

3.1 Intensidade de luz

As diferentes intensidades de luz promoveram o crescimento vegetativo de *Phyla betulifolia*, (FIGURA 2).

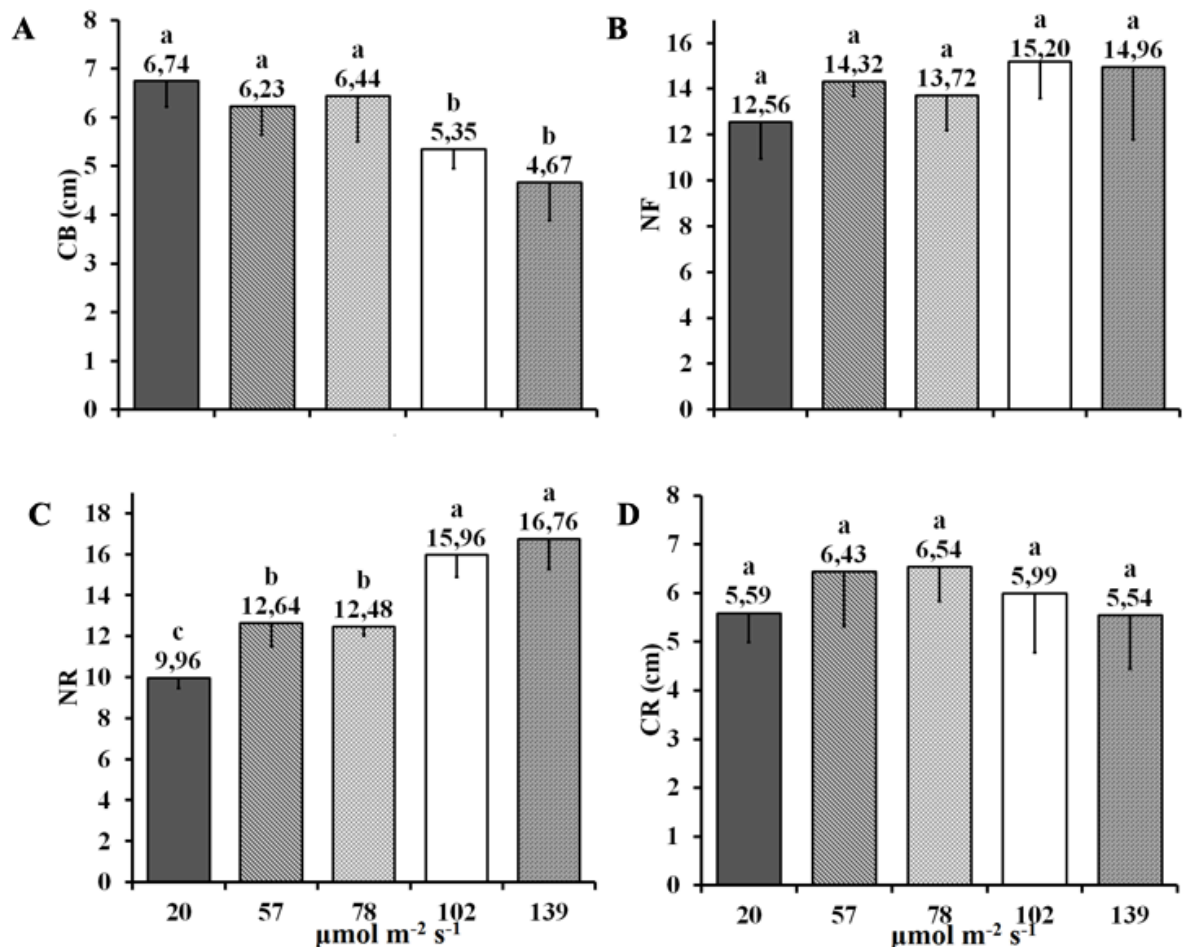
Figura 2 - Plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de luz.



Fonte: Da autora (2019).

As médias analisadas para a variável comprimento do broto (CB) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos 20, 57 e 78 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e entre 102 e 139 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (FIGURA 3). O número de folhas (NF) e o comprimento da raiz (CR), não demonstraram diferença significativa para as diferentes intensidades de luz. Apenas o número de raízes (NR) exibiu um acréscimo de 40,45% em resposta ao aumento da irradiância, sendo este, o parâmetro de crescimento mais influenciado pelas intensidades luminosas (FIGURAS 2 e 3).

Figura 3 - Crescimento vegetativo de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro* em diferentes intensidades de luz. A) Comprimento do broto (CB); B) Número de folhas (NF); C) Número de raízes (NR); D) Comprimento da raiz (CR).

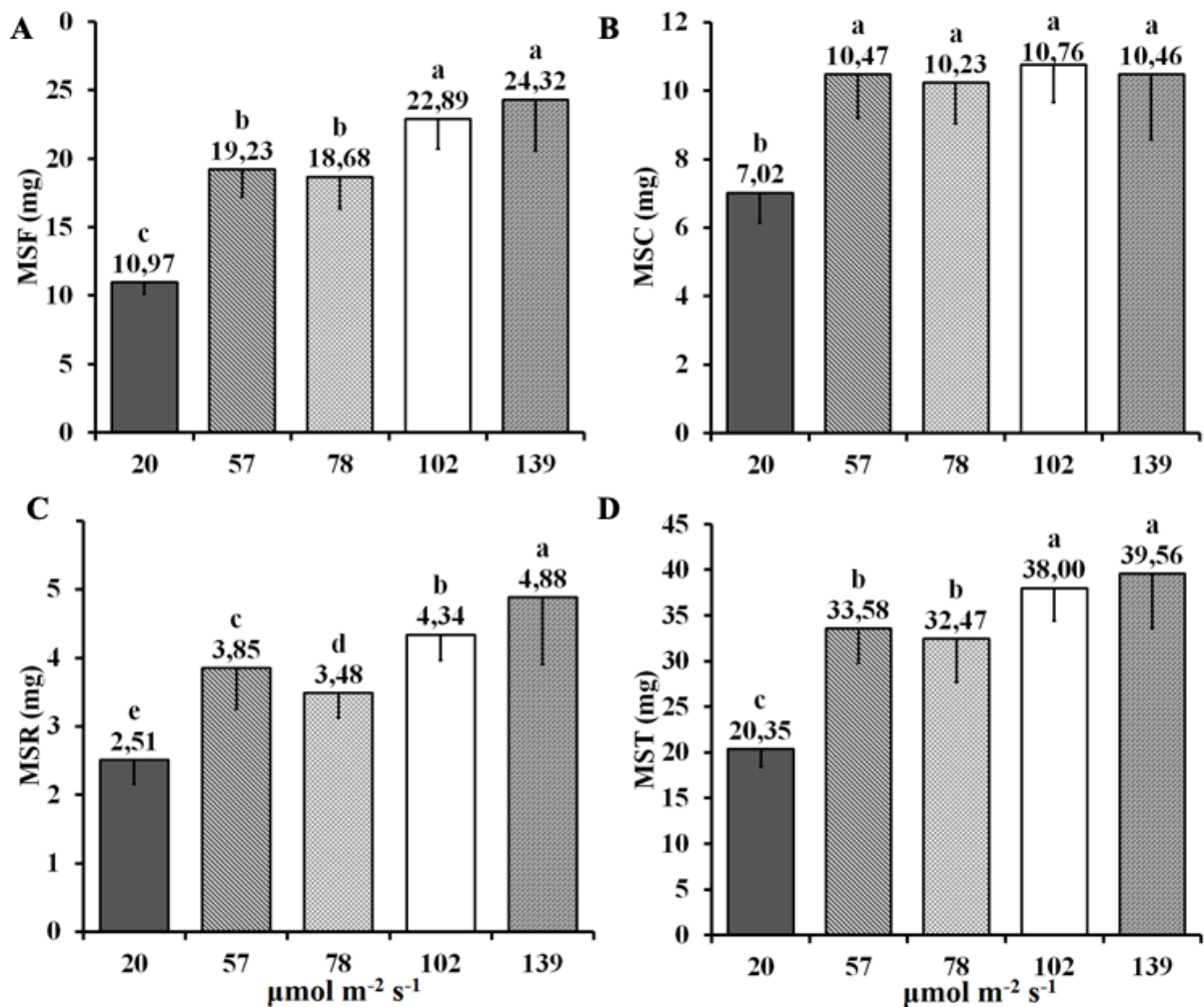


Legenda: As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

O aumento da irradiância proporcionou ganho de matéria seca de folhas (MSF) e total (MST) (FIGURA 4), um investimento de 54,89% e 48,55% respectivamente; a matéria seca de caule (MSC) das plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas sob as intensidades de luz 57, 78, 102 e 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não diferiram estatisticamente; e o maior acúmulo de matéria seca de raiz (MSR) foi observado na intensidade 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figura 4 - Influência de diferentes intensidades de luz no acúmulo de matérias secas em plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro*. A) Folhas (MSF); B) Caule (MSC); C) Raiz (MSR); D) Total (MST).



Legenda: As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

O incremento na intensidade luminosa promoveu aumento de 49,62% na área foliar total (AFT) (TABELA 1). Quanto aos índices fisiológicos razão de área foliar (RAF) e área foliar específica (AFE), não houve diferença estatística entre os tratamentos. O peso específico de folha (PEF) foi maior nos tratamentos 78 e 102 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto a razão de peso das folhas (RPF) nas intensidades de 132 e 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabela 1 - Área foliar total e índices fisiológicos de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de luz.

Intensidades de Luz ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	AFT (cm^2)	RAF -----	AFE ($\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$)	PEF -----	RPF (mg mg^{-1})
20	0,65 d	0,03 a	0,05 a	16,31 c	0,61 c
57	0,90 c	0,02 a	0,04 a	20,98 b	0,64 b
78	0,80 c	0,02 a	0,04 a	27,07 a	0,64 b
102	1,08 b	0,02 a	0,04 a	25,31 a	0,68 a
139	1,29 a	0,03 a	0,05 a	19,39 b	0,69 a

Legenda: Área foliar total (AFT), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), peso específico de folha (PEF), e razão de peso das folhas (RPF). As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

O teor de pigmentos fotossintéticos também foram influenciados pelas intensidades de luz, em resposta ao aumento da irradiância, os teores de clorofila *a* e de carotenóides decresceram (TABELA 2), os teores de clorofila *b* e total não apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos 20 e 78 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Tabela 2 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de luz.

Intensidades de Luz ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Clorofila a -----	Clorofila b -----	Clorofila total ($\text{mg g}^{-1} \text{MF}$)	Carotenoides -----
20	0,484 a	0,598 a	1,081 a	0,058 a
57	0,411 c	0,533 b	0,945 b	0,042 c
78	0,449 b	0,592 a	1,042 a	0,045 b
102	0,356 d	0,455 c	0,811 c	0,035 d
139	0,286 e	0,360 d	0,646 d	0,025 e

Legenda: As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

A produção de compostos fenólicos e a defesa antioxidante de *Phyla betulifolia* foram significativamente influenciados pelas diferentes intensidades de luz (TABELA 3). O maior teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi produzido por plântulas cultivadas na intensidade de 57 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, este tratamento também apresentou maior atividade de defesa antioxidante pelos métodos de redução do complexo do fosfomolibdênio (CAT) (22,41 mg EAA/ MSF) e ORAC (31,17 mg ET/g MSF). O ensaio de DPPH foi maior para a intensidade 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, o poder quelante em 139 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e o poder redutor não diferiu estatisticamente entre os tratamentos 20, 78 e 139 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Tabela 3 - Quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades de luz.

Intensidades de Luz ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	CFT (mg EAG g ⁻¹)	CAT (mg EAA g ⁻¹)	DPPH ----- IC ₅₀ (mg ml) -----	PQ	PR	ORAC (mg ET g ⁻¹)
20	25,07 b	20,59 b	0,062 a	1,65 d	12,89 a	21,99 c
57	31,80 a	22,41 a	0,067 b	1,74 e	13,67 b	31,17 a
78	23,40 c	16,67 d	0,076 c	0,93 b	13,20 a	17,86 e
102	25,29 b	16,41 d	0,071 b	1,20 c	13,46 b	21,13 d
139	25,17 b	18,88 c	0,082 d	0,87 a	12,87 a	25,54 b

Legenda: Quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT); capacidade antioxidante total (CAT), capacidade de eliminação de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); poder quelante (PQ); poder redutor (PR); capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

A análise dos compostos voláteis de plântulas de *Phyla betulifolia* detectou 25 constituintes químicos, entretanto, não foram observadas variações qualitativas e quantitativas (TABELA 4). As cetonas alifáticas 6-metil-5-hepten-2-ona (47,83 - 54,57%) e 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (8,13 - 11,38%), e o sesquiterpeno **hidrocarboneto** α -copaeno (9,58% - 11,75%) foram os componentes majoritários.

Tabela 4 - Composição química de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades de luz.

COMPOSTOS	**IRa	Intensidades de Luz				
		20	57	78	102	139
----- (μmol m ⁻² s ⁻¹) -----						
Furfural	829	1,72 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,11 ± 0,02	Nd	Nd
3Z-hexen-1-ol	849	Nd	0,59 ± 0,08	0,27 ± 0,08	0,26 ± 0,04	0,34 ± 0
o-xileno	866	1,16 ± 0,16	0,40 ± 0,02	0,29 ± 0,05	0,29 ± 0	0,34 ± 0,01
Benzaldeído	957	1,39 ± 0,14	0,20 ± 0,01	0,10 ± 0	Nd	0,17 ± 0
5-metil-furfural	959	1,35 ± 0,14	Nd	Nd	Nd	Nd
1-octen-3-ol	976	2,81 ± 0,10	2,48 ± 0,14	1,37 ± 0,10	1,97 ± 0,02	2,13 ± 0,13
6-metil-5-hepten-2-ona	986	47,83 ± 0,35	47,49 ± 1,03	49,43 ± 0,39	54,57 ± 0,56	53,97 ± 0,40
3-metil-2-ciclohexen-1-ona	1050	8,13 ± 0,21	9,50 ± 0,27	10,23 ± 0,03	11,38 ± 0,60	11,15 ± 0,04
Elixeno	1334	Nd	0,32 ± 0,04	0,46 ± 0,04	0,26 ± 0	0,35 ± 0,03
1,2-dihidro-1,1,6-trimetil-naftaleno	1347	0,98 ± 0,04	0,51 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,46 ± 0	0,54 ± 0,02
α-copaeno	1371	11,35 ± 0,31	11,44 ± 0,14	11,75 ± 0,07	10,42 ± 0,38	9,58 ± 0,35
Z-cariofileno	1401	4,09 ± 0,09	3,04 ± 0,13	1,52 ± 0,19	1,28 ± 0,22	0,62 ± 0,37
α-cedreno	1404	0,53 ± 0,06	0,61 ± 0,08	0,81 ± 0,04	0,68 ± 0	0,65 ± 0,01
E-cariofileno	1413	3,59 ± 0,22	6,43 ± 0,10	5,28 ± 0,38	4,65 ± 0,27	6,81 ± 0,02
α-trans-bergamoteno	1433	2,18 ± 0,08	2,09 ± 0,03	2,20 ± 0,01	1,61 ± 0,02	1,65 ± 0,05
α-humuleno	1447	Nd	0,19 ± 0,05	0,20 ± 0	Nd	Nd
allo-aromadendreno	1454	0,27 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,66 ± 0,02	0,51 ± 0	0,62 ± 0,05
(E)-β-farneseno	1457	Nd	1,13 ± 0,11	1,30 ± 0,13	1,13 ± 0,02	1,28 ± 0,03
γ-muuroleno	1472	0,60 ± 0,03	0,69 ± 0,04	0,65 ± 0,10	0,45 ± 0	0,37 ± 0,05
ar-curcumeno	1480	0,40 ± 0,03	Nd	0,14 ± 0	Nd	Nd
Viridifloreno	1489	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,05	0,62 ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,71 ± 0
α-muuroleno	1496	0,61 ± 0,02	0,70 ± 0,05	0,70 ± 0,01	0,55 ± 0	0,57 ± 0,01
Pentadecano	1500	0,44 ± 0,04	0,39 ± 0,06	0,42 ± 0,06	0,34 ± 0,02	Nd
β-bisaboleno	1506	0,84 ± 0,07	1,18 ± 0,12	1,19 ± 0,06	1,09 ± 0,11	1,14 ± 0,05
β-curcumeno	1509	0,34 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,44 ± 0,04	0,34 ± 0	0,37 ± 0,01
δ-cadineno	1519	4,58 ± 0,35	6,62 ± 0,18	6,29 ± 0,19	5,09 ± 0,03	5,73 ± 0
Número de compostos	-	22	24	25	21	21
Total identificado (%)	-	95,55	97,55	96,93	97,71	99,09

Legenda: **Índice de retenção relativo à série n-alcanos (C8-C20) em coluna HP-5 na ordem de eluição. Nd: não detectado.

Fonte: Da autora (2019).

3.2 Qualidade de luz

A qualidade espectral exerceu forte influência no crescimento vegetativo das plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* (FIGURA 5).

Figura 5 - Plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes qualidades de luz.

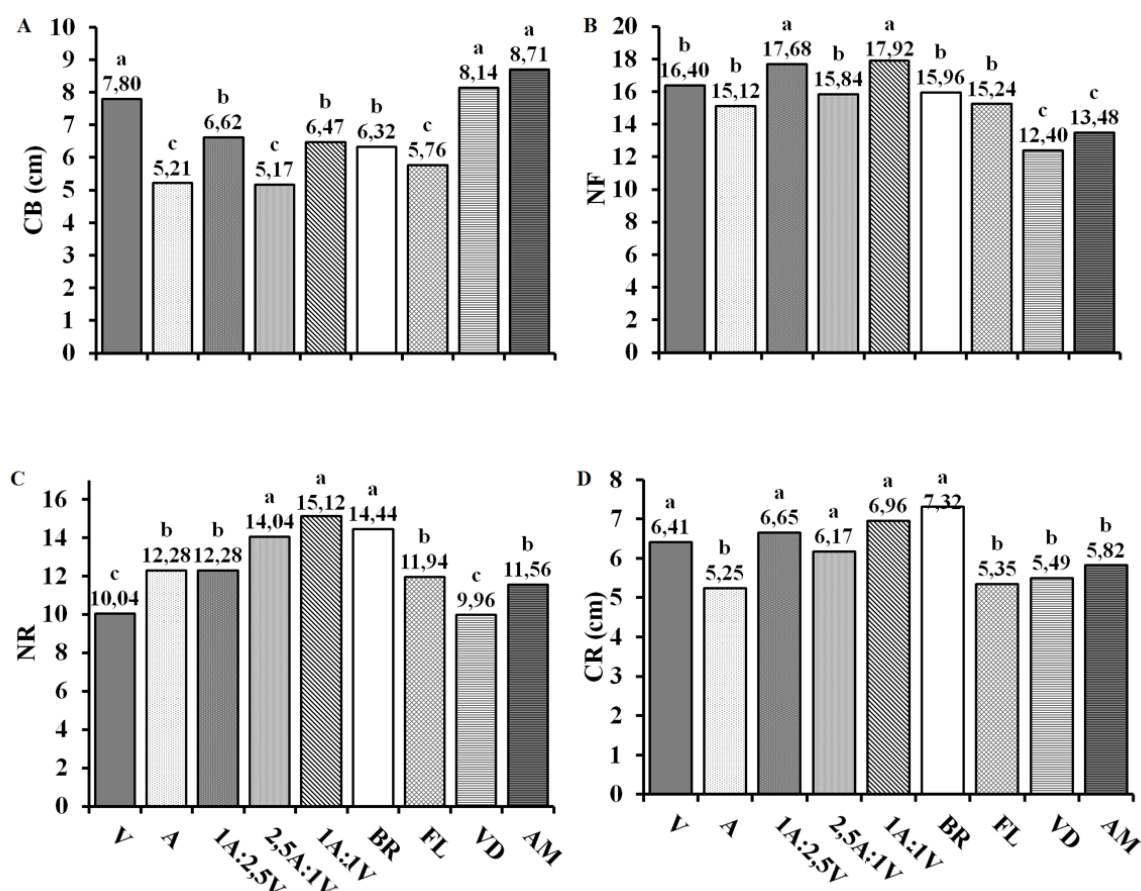


Legenda: Vermelho (V); Azul (A); Combinações de azul e vermelho: (1A:2,5V), (2,5A:1V) e (1A:1V); Branca LED (BR); Fluorescente (FL); Verde (VD); Amarelo (AM).

Fonte: Da autora (2019).

As plântulas apresentaram máximo crescimento (comprimento do broto - CB) quando cultivadas em vermelho (V), verde (VD) e amarelo (AM), seguido das combinações A:V (1:2,5 e 1:1) e BR. Entretanto, os valores observados de matéria seca do caule (MSC) e total (MST) para os espectros de luz VD e AM sugerem que houve estiolamento das plântulas nestes tratamentos (FIGURAS 6 e 7). Além disso, os tratamentos VD e AM desenvolveram outras características que indicam estiolamento: menor expansão foliar, caules menos espessos e maior espaçamento entrenó (FIGURA 5).

Figura 6 - Análise de crescimento de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro* em diferentes qualidades de luz. A) Comprimento de broto (CB); B) Número de folhas (NF); C) Número de raízes (NR); D) Comprimento da raiz (CR).

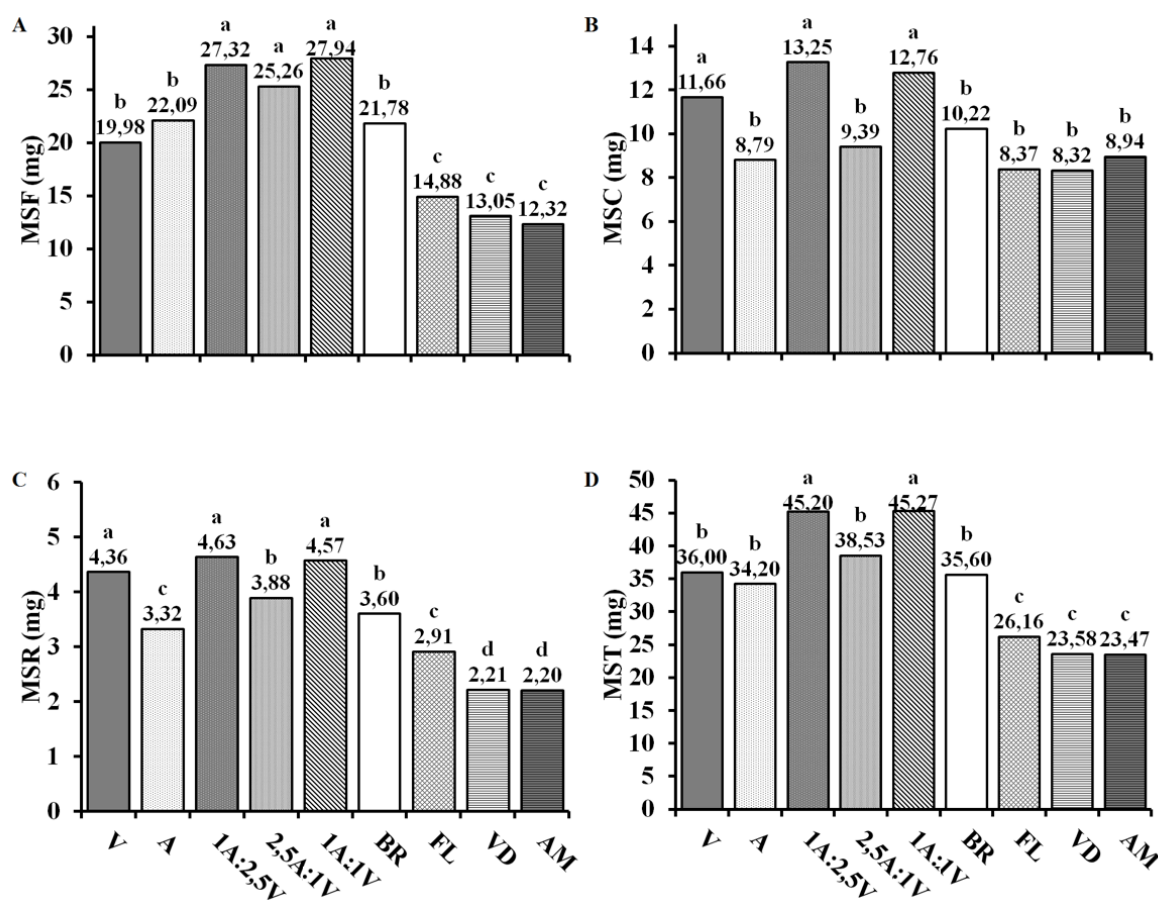


Legenda: Vermelho (V); Azul (A); Combinações de azul e vermelho: (1A:2,5V), (2,5A:1V) e (1A:1V); Branca LED (BR); Fluorescente (FL); Verde (VD); Amarelo (AM). As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

Os maiores acúmulos de matéria seca do caule (MSC) e da raiz (MSR) foram registrados nos tratamentos V, combinações A:V (1:2,5 e 1:1); as combinações A:V (1:2,5, 2,5:1 e 1:1) resultaram em maior matéria seca de folhas (MSF); enquanto a massa seca total foi alcançada com as combinações A:V (1:2,5 e 1:1). Estes resultados indicam que *Phyla betulifolia* respondeu melhor ao acúmulo de matéria seca, quando houve combinação dos espectros AZ e V (FIGURA 7).

Figura 7 - Influência de diferentes qualidades de luz no acúmulo de matérias secas de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro*. A) Folhas (MSF); B) Caule (MSC); C) Raiz (MSR); D) Total (MST).



Legenda: Vermelho (V); Azul (A); Combinações de azul e vermelho: (1A:2,5V), (2,5A:1V) e (1A:1V); Branca LED (BR); Fluorescente (FL); Verde (VD); Amarelo (AM). As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

As plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas sob a combinação de A:V (1:1) apresentaram o maior valor de área foliar, enquanto os espectros de luz FL, VD e AM exibiram as menores áreas.

Os índices fisiológicos razão de área foliar (RAF) e área foliar específica (AFE) foram maiores na luz AZ; o peso específico de folha (PEF) na luz VD; e a razão de peso das folhas (RPF) foi máximo nos tratamentos V, combinação A:V (1:2,5) e FL. Para *Phyla betulifolia* cultivadas em diferentes qualidades de luz, a variação na RAF ocorreu tanto em função das alterações na AFE quanto na RPF (TABELA 5).

Tabela 5 - Área foliar total e índices fisiológicos de folhas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes qualidades de luz.

Qualidades de Luz	AFT (cm ²)	RAF ----- (cm ² mg ⁻¹)	AFE ----- (cm ² mg ⁻¹)	PEF -----	RPF (mg mg ⁻¹)
V	1,05 c	0,03 b	0,05 b	17,81 d	0,70 a
A	1,13 c	0,04 a	0,08 a	11,55 f	0,61 c
1A:2,5V	1,31 b	0,03 b	0,05 b	19,07 c	0,72 a
2,5A:1V	1,23 c	0,02 c	0,04 c	24,83 b	0,67 b
1A:1V	1,48 a	0,03 b	0,05 b	19,12 c	0,68 b
BR	1,12 c	0,03 b	0,05 b	19,53 c	0,63 c
FL	0,91 d	0,02 c	0,04 c	25,32 b	0,71 a
VD	0,79 d	0,02 c	0,03 c	27,94 a	0,68 b
AM	0,73 d	0,03 b	0,05 b	15,53 e	0,58 d

Legenda: Vermelho (V); Azul (A); Combinações de azul e vermelho: (1A:2,5V), (2,5A:1V) e (1A:1V); Branca LED (BR); Fluorescente (FL); Verde (VD); Amarelo (AM). Área foliar total (AFT), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), peso específico de folha (PEF), e razão de peso das folhas (RPF). As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

As diferentes qualidades de luz influenciaram significativamente o teor de pigmentos fotossintéticos (TABELA 6). Apesar das plântulas submetidas ao tratamento VD e AM, possuírem características de crescimento de plântulas estioladas, elas foram responsáveis pelo maior acúmulo de clorofila *a* e carotenoides (VD), e clorofila *b* e total (AM).

Tabela 6 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes qualidades de luz.

Qualidades de Luz	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenoides
	----- (mg g ⁻¹ MF) -----			
V	0,199 c	1,719 b	1,918 b	0,058 c
A	0,166 c	1,256 c	1,422 c	0,075 c
1A:2,5V	0,910 b	0,213 d	1,124 d	0,215 b
2,5A:1V	0,960 b	0,214 d	1,174 d	0,221 b
1A:1V	0,172 c	1,448 c	1,620 c	0,057 c
BR	0,174 c	1,412 c	1,586 c	0,064 c
FL	0,240 c	1,845 b	2,085 b	0,098 c
VD	1,451 a	0,356 d	1,806 b	0,327 a
AM	0,292 c	2,233 a	2,525 a	0,088 c

Legenda: Vermelho (V); Azul (A); Combinações de azul e vermelho: (1A:2,5V), (2,5A:1V) e (1A:1V); Branco LED (BR); Fluorescente (FL); Verde (VD); Amarelo (AM). As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

As diferentes qualidades de luz apresentaram diferenças significativas quanto a concentração de compostos fenólicos totais (CFT) e a atividade antioxidante (TABELA 7). As plântulas cultivadas sob luz A investiram mais no acúmulo de compostos fenólicos totais (CFT), enquanto as cultivadas em V apresentaram menor investimento na produção destes compostos.

Tabela 7 - Quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Phyla betulifolia* cultivadas *in vitro* em diferentes qualidades de luz.

Qualidades de Luz	CFT (mg EAG g ⁻¹)	CAT (mg EAA g ⁻¹)	DPPH ----- IC ₅₀ (mg ml) -----	PQ	PR	ORAC (mg ET g ⁻¹)
V	15,40 h	14,55 e	0,13 f	2,04 d	8,01 c	8,65 g
A	27,78 a	23,34 a	0,06 a	0,86 a	7,62 c	27,78 b
1A:2,5V	23,97 c	17,65 d	0,07 b	0,91 a	6,22 a	18,08 f
2,5A:1V	25,19 b	23,31 a	0,06 a	1,47 b	6,31 a	23,96 c
1A:1V	25,49 b	22,03 b	0,06 a	0,86 a	6,25 a	19,35 e
BR	19,39 g	14,33 e	0,09 d	0,96 a	6,75 b	18,08 f
FL	21,79 e	19,06 c	0,09 d	1,47 b	15,15 f	55,22 a
VD	20,54 f	13,36 f	0,11 e	1,69 c	10,42 d	22,43 d
AM	22,43 d	12,61 g	0,08 c	1,60 c	11,94 e	19,72 e

Legenda: Quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT); capacidade antioxidante total (CAT), capacidade de eliminação de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); poder quelante (PQ); poder redutor (PR); capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). Vermelho (V); Azul (A); Combinações de azul e vermelho: (1A:2,5V), (2,5A:1V) e (1A:1V); Branca LED (BR); Fluorescente (FL); Verde (VD); Amarelo (AM). As médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2019).

A análise da fração volátil detectou 26 compostos, sendo o tratamento com o espectro vermelho (V) o que apresentou um menor número de compostos 16 (TABELA 8). Assim como observado no experimento de intensidade de luz, os compostos majoritários foram o 6-metil-5-hepten-2-ona (45 - 54,42%), 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (6,52 - 9,92%), e α -copaeno (10,28 - 13,07%).

Tabela 8 - Composição química de *Phyla betulifolia* cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades de luz.

COMPOSTOS	**IRa	Qualidade de Luz								
		V	A	1A:2,5V	2,5A:1V	1A:1V	BR	FL	VD	AM
Furfural	829	1,61 ± 0,23	0,99 ± 0,26	0,14 ± 0,03	1,12 ± 0,02	1,39 ± 0,27	0,33 ± 0,35	0,25 ± 0	2,11 ± 0,06	0,52 ± 0,01
3Z-hexen-1-ol	849	1,51 ± 0,13	1,15 ± 0,17	0,77 ± 0,07	1,09 ± 0,17	0,10 ± 0	0,70 ± 0,04	0,80 ± 0,04	2,13 ± 0,05	1,08 ± 0
o-xileno	866	1,16 ± 0,09	0,94 ± 0,09	0,31 ± 0,01	0,82 ± 0,04	0,93 ± 0	0,51 ± 0,15	0,39 ± 0,01	1,14 ± 0,10	0,39 ± 0,02
Benzaldeído	957	1,26 ± 0,26	0,66 ± 0,14	0,18 ± 0,02	0,81 ± 0	1,31 ± 0,33	0,30 ± 0,13	0,23 ± 0	1,61 ± 0,29	0,25 ± 0,01
5-metil-furfural	959	0,69 ± 0,15	0,51 ± 0,16	Nd	0,64 ± 0	0,75 ± 0	0,22 ± 0	Nd	1,59 ± 0,29	0,14 ± 0
1-octen-3-ol	976	1,91 ± 0,26	1,49 ± 0,18	1,09 ± 0,06	1,65 ± 0,07	3,12 ± 0,05	1,20 ± 0,17	1,86 ± 0,60	3,31 ± 0,14	1,67 ± 0,25
6-metil-5-hepten-2-ona	986	54,42 ± 1,90	47,91 ± 0,14	47,39 ± 0,40	49,50 ± 0,19	51,88 ± 0,44	49,54 ± 0,88	49,74 ± 1,06	46,05 ± 0,33	45,00 ± 0,97
3-metil-2-ciclohexen-1-ona	1050	8,19 ± 0,01	7,95 ± 0,21	9,60 ± 0,33	7,89 ± 0,01	6,52 ± 0,42	7,84 ± 1,12	9,21 ± 1,37	8,85 ± 0,30	9,92 ± 1,72
Elixeno	1334	Nd	0,62 ± 0,09	0,36 ± 0,02	0,38 ± 0	Nd	0,45 ± 0,14	Nd	Nd	0,23 ± 0,09
1,2-dihidro-1,1,6-trimetil-naftaleno	1347	0,82 ± 0,08	0,82 ± 0,09	0,48 ± 0,03	0,83 ± 0,05	1,09 ± 0	0,58 ± 0,07	0,50 ± 0	1,23 ± 0,12	0,46 ± 0,02
α-copaeno	1371	10,68 ± 0,22	11,54 ± 0,49	11,36 ± 0,16	11,49 ± 0,20	11,05 ± 0,01	11,81 ± 0,06	11,09 ± 0,06	10,28 ± 0,22	13,07 ± 0,58
Z-cariofileno	1401	4,55 ± 0,37	3,07 ± 1,01	1,69 ± 0,20	4,58 ± 0,11	5,44 ± 0,33	2,02 ± 0,73	1,21 ± 0,18	3,74 ± 0,19	3,33 ± 0,40
α-cedreno	1404	0,46 ± 0	0,69 ± 0,02	0,71 ± 0,07	0,56 ± 0	0,48 ± 0	0,69 ± 0,01	0,62 ± 0	0,58 ± 0,08	0,63 ± 0,06
E-cariofileno	1413	5,25 ± 0,09	6,94 ± 1,22	9,25 ± 0,40	5,67 ± 0,10	4,41 ± 0,23	7,74 ± 0,90	8,38 ± 0,17	4,53 ± 0,27	6,99 ± 0,52
α-trans-bergamoteno	1433	1,74 ± 0,09	2,20 ± 0,09	2,04 ± 0,09	1,95 ± 0,02	1,82 ± 0,09	2,30 ± 0,20	1,62 ± 0,41	1,92 ± 0,09	2,37 ± 0,20
allo-aromadendreno	1454	Nd	0,41 ± 0,09	0,74 ± 0,04	0,36 ± 0,03	0,28 ± 0	0,45 ± 0,15	0,59 ± 0,01	Nd	0,51 ± 0
(E)-β-farneseno	1457	Nd	0,77 ± 0,13	1,42 ± 0,11	0,30 ± 0	0,28 ± 0	1,02 ± 0,25	1,11 ± 0,13	Nd	1,01 ± 0,09
γ-muuroloeno	1472	Nd	0,61 ± 0,13	0,63 ± 0,08	0,67 ± 0	0,58 ± 0	0,61 ± 0,09	0,64 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,71 ± 0,10
ar-curcumeno	1480	Nd	Nd	Nd	0,24 ± 0	Nd	Nd	Nd	0,37 ± 0	Nd
Viridifloreno	1489	Nd	0,39 ± 0,02	1,26 ± 0,21	Nd	Nd	0,33 ± 0,06	0,55 ± 0,08	0,35 ± 0	0,43 ± 0,03
α-muuroloeno	1496	Nd	0,73 ± 0,01	0,76 ± 0,04	0,64 ± 0	0,53 ± 0,02	0,73 ± 0,01	0,63 ± 0,03	0,50 ± 0,05	0,73 ± 0,09
Pentadecano	1500	Nd	0,59 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,35 ± 0	0,62 ± 0,04	0,51 ± 0,04
β-bisaboleno	1506	0,66 ± 0,10	1,11 ± 0,04	1,34 ± 0,08	0,92 ± 0	0,82 ± 0,01	1,19 ± 0,10	1,21 ± 0,03	0,87 ± 0,01	1,19 ± 0,06
β-curcumeno	1509	Nd	0,42 ± 0	0,36 ± 0,01	0,34 ± 0,04	Nd	0,37 ± 0,02	0,39 ± 0	0,33 ± 0	0,38 ± 0,04
δ-cadineno	1519	4,61 ± 0,31	5,72 ± 0,47	6,81 ± 0,26	5,09 ± 0,09	4,47 ± 0,30	6,36 ± 0,49	6,51 ± 0,09	4,62 ± 0,27	7,39 ± 0,36
Número de compostos	-	16	24	23	24	21	24	22	22	24
Total identificado (%)	-	99,52	98,23	99,09	98,07	97,70	97,81	97,88	97,23	98,91

Legenda: Vermelho (V); Azul (A); Combinações de azul e vermelho: (1A:2,5V), (2,5A:1V) e (1A:1V); Branca LED (BR); Fluorescente (FL); Verde (VD); Amarelo (AM). As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). ** Índice de retenção relativo à série de n-alcenos (C8-C20) em coluna HP-5 na ordem de eluição. Nd: não detectado.

Fonte: Da autora (2019).

4 DISCUSSÕES

4.1 Intensidade de luz

Estudos indicam que cada espécie vegetal possui faixas de luz específicas que favorecem ou inibem o seu crescimento em condições de cultivo *in vitro*. Alvarenga et al. (2015) relataram que baixas intensidades ($27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) favoreceram o crescimento *in vitro* de plântulas de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). No entanto, Para *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Lamiaceae) cultivada *in vitro*, intensidades intermediárias ($69 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) são mais indicadas (SILVA et al., 2017).

As diferentes intensidades de luz influenciaram a produção de matéria seca de *Phyla betulifolia*, essas alterações podem ser um indicador da resposta das plantas à disponibilidade de luz, indicando que *Phyla betulifolia* é uma espécie adaptada a ambientes que recebem maior intensidade luminosa. Resultados semelhantes foram obtidos por Andrade et al. (2017) no cultivo *in vitro* de *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (Lamiaceae), e por Lazzarini et al. (2018), no cultivo de *Lippia gracilis* Schauer.

O incremento na área foliar total (AFT) nas maiores intensidade (102 e $139 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) sugere que baixas intensidades são um fator limitante para a expansão foliar de *Phyla betulifolia*, corroborando com os resultados obtidos no ganho de matéria seca de folha (MSF). Segundo Larcher (2004) e Taiz et al, (2017), quando as plantas crescem sob forte radiação elas tendem a desenvolver folhas mais espessas, e conseqüentemente possuem um metabolismo mais ativo proporcionando maior produção de matéria seca.

Quanto aos índices fisiológicos da análise de crescimento, no presente estudo não houve diferença significativa para a razão de área foliar (RAF) e área foliar específica (AFE), estes resultados podem ser explicados pela relação existente entre a área foliar total (AFT) e a matéria seca total (MST) variáveis utilizadas para o cálculo da RAF; e entre AFT e massa seca de folha (MSF) utilizadas para o cálculo da AFE. Todas essas variáveis apresentaram um comportamento crescente, com isso, os valores obtidos para RAF e AFE foram muito parecidos, não havendo diferença significativa entre eles.

Quanto a razão de peso das folhas (RPF), os tratamentos 102 e $139 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tiveram os maiores valores, estes resultados se devem ao melhor desenvolvimento das plântulas cultivadas sob estas intensidades, onde houve maior acúmulo tanto de MST quanto

de MSF. Isso significa que nestes tratamentos houve maior retenção de fotossintatos nas folhas, acarretando em menor exportação para os outros órgãos.

O peso específico da folha (PEF) é uma variável que indica a espessura foliar, a partir dos valores obtidos para esse índice supõe-se que, as intensidades de luz 78 e 102 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ são os tratamentos com maior espessura de lâmina foliar. O aumento da intensidade luminosa proporciona aumento na espessura da folha e células paliçádicas mais alongadas, essas características constituem um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade de luz (LEE, 2000; CASTRO; FERREIRA; PAIVA, 2009).

Além dos efeitos no crescimento, as diferentes intensidades influenciaram na concentração dos pigmentos fotossintéticos, isso porque as clorofilas são geralmente sintetizadas e foto-oxidadas na presença de luz, portanto, quando as plantas são expostas a condições inadequadas de luminosidade, a fotossíntese pode ser limitada (TAIZ et al., 2017). Assim como foi observado para plântulas de *Phyla betulifolia*, Silva et al. (2017) notaram que o aumento da intensidade de luz provocou redução nos teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides para o cultivo *in vitro* de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. - Lamiaceae.

De acordo com Zervoudakis et al. (2012), em condições de déficit de luz as plantas estabelecem uma série de mecanismos compensatórios, como um incremento na produção de pigmentos fotossintéticos, para que haja a manutenção de seus processos fisiológicos. Taiz et al. (2017) descrevem que folhas submetidas a condições de sombra tendem a aumentar a captura de luz por terem mais clorofila total por centro de reação, razão mais alta entre clorofila *b* e clorofila *a*, e lâminas geralmente mais finas do que as das folhas de sol. Esses resultados corroboram com resultados obtidos para o índice fisiológico de crescimento PEF (peso específico da folha), onde o tratamento 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ possui lâmina foliar mais fina e maiores acúmulos de fotossintatos.

Em contrapartida, a absorção de luz em demasia pode resultar em fotoinibição e até mesmo em danos ao centro de reação fotossintético (TAIZ et al., 2017), situações de estresse causadas por alta luminosidade podem levar a inibição do fotossistema I, além de inibir o reparo do fotossistema II (TAKAHASHI; MURATA, 2008). Além disso, a exposição a altas intensidades de luz pode elevar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares, devido ao aumento das taxas de fotorredução de O_2 nos cloroplastos e ao aumento do fluxo para H_2O_2 em peroxissomos via fotorrespiração (MITTLER, 2002).

As plântulas submetidas à baixa intensidade de luz ($20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) responderam melhor a produção de carotenoides, provavelmente esses resultados estão associados ao papel que tais pigmentos desempenham durante a fotossíntese em função da intensidade da luz, ou seja, quando as plantas estão submetidas a altas intensidades luminosas, os carotenoides atuam como fotoprotetores do aparato fotoquímico evitando danos oxidativos às moléculas de clorofila (EVERT; EICHHORN, 2014; TAIZ et al., 2017), enquanto que em baixas intensidades absorvem a luz nos complexos de captação de luz e atuam como pigmentos acessórios (LIMA; ZANELLA; CASTRO, 2010).

No caso de *Phyla betulifolia* a redução no teor de carotenoides pode estar associado a outros mecanismos de fotoproteção. Por se tratar de uma espécie com potencial uso medicinal, pode ser que esta planta acione seu metabolismo secundário para produção de outros metabólitos que a protegem contra danos foto-oxidativos.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) têm emergido não apenas como subprodutos citotóxicos de processos metabólicos como a respiração e a fotossíntese, mas como moléculas de sinalização que regulam respostas vegetais a diversos sinais ambientais e endógenos (TAIZ et al., 2017). O estresse oxidativo acontece quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema de defesa antioxidante (MITTLER, 2017). De acordo com GIADA (2014), diversos fatores podem influenciar na capacidade antioxidante *in vitro* de uma amostra, podendo levar a diferenças significativas nos resultados encontrados.

Sob as condições de luz que as plântulas de *Phyla betulifolia* foram submetidas, a intensidade de $57 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foi responsável pelo maior teor de compostos fenólicos totais (CFT), assim como maior atividade antioxidante identificados pelos métodos de capacidade antioxidante total (CAT) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC). Segundo Stephen (2005), quando submetidas à excesso de luminosidade, as plantas tendem a responder através do aumento na produção de CFT. O teste DPPH demonstrou maior capacidade de inibição deste radical para o tratamento com intensidade de $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. O poder quelante e o poder redutor, foram maiores no tratamento com maior intensidade luminosa. Essas diferenças encontradas para os diversos ensaios sugerem que as plântulas de *Phyla betulifolia* responderam de forma variada ao estresse luminoso, estes resultados podem ser explicados pelos diferentes mecanismos de detecção da atividade de defesa antioxidante. De acordo com ROACH et al. (2018) baixos níveis de estresse fotooxidativo proporcionam crescimento de

plântulas, devido à respostas positivas nos mecanismos de defesa antioxidantes, entretanto BRUNETTI et al. (2015) relatam que altos níveis de luminosidade causam danos irreparáveis às células devidas à exaustão da máquina de eliminação de Eros. Esses resultados corroboram com os dados de crescimento obtidos para *Phyla betulifolia*, onde as menores intensidades proporcionaram maior crescimento do caule.

A análise da fração volátil sugere que a maior concentração de 6-metil-5-hepten-2-ona e 3-metil-2-ciclohexen-1-ona observada nas intensidades de luz 102 e 139 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pode estar associada ao melhor crescimento das plântulas nestes tratamentos, além disso, estes tratamentos apresentaram menor concentração de pigmentos fotossintéticos, compostos fenólicos totais e menor atividade antioxidante, fazendo com que as plântulas pudessem gastar maior investimento na produção de outros compostos, como os identificados na fração volátil.

4.2 Qualidade de luz

As respostas morfogênicas encontradas para o comprimento de broto de *Phyla beutilifolia* foram semelhantes ao observado por Andrade et al. (2017) para o cultivo *in vitro* de *Hyptis suaveolens*, onde os espectros de luz V, VD e AM proporcionaram maior CB. Essas repostas à variação dos espectros VD e AM, podem ser um indicativo de que houve estiolamento para estes tratamentos, sendo este estiolamento resultado de menor alocação de biomassa para este órgão. Além disso, a presença de folhas pouco expandidas, assim como menor espessura do caule e maior espaçamento entrenó são outras evidências de plântulas estioladas (ZHANG; FOLTA, 2012; TAIZ et al., 2017). Quanto a luz vermelha, o aumento observado para o CB pode ser uma resposta ao fitocromo, fotorreceptor responsável pela absorção desse espectro e que exerce maior influência na fotomorfogênese (LAZZARINI et al., 2017).

A inibição do alongamento do caule e a estimulação da abertura estomática são duas respostas que estão relacionadas as propriedades do espectro de luz azul (TAIZ et al., 2017). Essa propriedade de inibição, pode explicar o menor comprimento do caule para os tratamentos de luz azul (A), fluorescente (FL) e combinação de A:V (2,5:1). Deve-se ressaltar que, estes tratamentos apresentam luz A em diferentes proporções.

As plântulas de *Phyla betulifolia* cultivadas sob a combinação de luz A:V (1:1) apresentaram maior área foliar, corroborando com os resultados encontrados para acúmulo de matéria seca de folha neste tratamento. Tanto a razão de área foliar (RAF), quanto a área foliar específica (AFE) foram maiores sob o espectro de luz azul, e apresentaram o mesmo

padrão de variação. O aumento da RAF no tratamento A indica que as plântulas necessitaram de uma maior área foliar para a produção de matéria seca, além disso, as variações encontradas para a RAF foram decorrentes das alterações em seus dois componentes (AFE e RPF). A AFE sugere que o tratamento com luz A proporcionou folhas mais finas, corroborando com os baixos valores encontrados para matéria seca de folha e área foliar para as plântulas cultivadas sob este espectro.

O peso específico da folha (PEF) é um índice que indica a espessura foliar, essa maior espessura foi observada no tratamento com luz verde (VD), tratamento que provavelmente possui tecidos do mesofilo mais desenvolvidos. Além disso, o acréscimo da PEF pode ser um indicativo da maior produção de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e carotenoides) neste tratamento.

As diferentes qualidades de luz afetaram significativamente a concentração de pigmentos fotossintéticos nas plântulas de *Phyla betulifolia*. Apesar das plântulas submetidas ao tratamento VD e AM, possuem características de crescimento de plântulas estioladas, elas foram responsáveis pelo maior teor de clorofila *a* e carotenoides (VD), e clorofila *b* e total (AM). Geralmente plântulas com essas características tendem a apresentar menor acúmulo de fotossintatos (TAIZ et al., 2017). Resultados semelhantes foram obtidos por Victório et al., 2007 para plântulas de *Phyllanthus tenellus* Roxb (Phyllanthaceae), onde o tratamento com a luz amarela favoreceu a produção de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, demonstrando que o estímulo de luz amarela contribuiu de forma positiva para a eficiência fotossintética da espécie.

Os resultados encontrados para as plântulas de *P. betulifolia* cultivadas sob luz A e V não condizem com as referências encontradas na literatura, uma vez que estes espectros são primordialmente absorvidos pelas clorofilas (TAIZ et al., 2017). Dou et al. (2017) relataram que o uso das combinações de luz azul e vermelha são mais eficientes que o uso da luz azul ou vermelha monocromáticas, esses espectros luminosos proporcionam melhor excitação dos fotorreceptores, dentre eles fitocromos, criptocromos e fototropinas, favorecendo a produção de fotossintatos. Além disso, AASAMAA e APHALO (2016) e TAIZ et al., 2017, relatam que a luz verde tem papel importante na ação da luz azul, sendo responsável pela sua inibição e/ou diminuição dos seus efeitos.

A luz é um dos fatores ambientais mais importantes para as plantas, ela é fundamental para o crescimento e desenvolvimento, no entanto, o excesso de luz pode levar ao acúmulo das chamadas EROs (espécies reativas de oxigênio) nos vegetais (MILECH et al., 2017).

Muitos estudos buscam avaliar os efeitos da qualidade de luz na produção de compostos funcionais (compostos fenólicos e atividade antioxidante) em plantas, entretanto, a maioria estuda os efeitos dos LEDs de cor azul e vermelha, não sendo muito utilizados os espectros VD e AM (SHIMIZU, 2016).

Os resultados obtidos para os ensaios CFT, CAT, DPPH e poder quelante demonstram que houve maior atividade de defesa antioxidante para os tratamentos com luz azul. Poder redutor foi mais elevado para a combinação A:V (1:2,5) e ORAC para a luz fluorescente. Esses resultados sugerem que em presença de luz azul, independente da proporção, as plântulas de *Phyla betulifolia* produziram maior quantidade de compostos que atuam na defesa antioxidante. Essas respostas para diferentes qualidades de luz podem ser causadas pelo aumento das atividades de enzimas metabólicas essenciais que conduzem o aumento da síntese de substâncias (MENG; XING; WANG, 2004). Muitas plantas podem proteger-se contra danos celulares mediante a síntese compostos fenólicos (CFT) que atuam como filtros solares e removem oxidantes nocivos e radicais livres que são induzidos pela luz (TAIZ et al., 2017).

Quanto aos compostos voláteis, o espectro de luz azul foi um dos tratamentos com maior produção de constituintes, reforçando a ideia de TIAN; LIU (2018), onde a presença de compostos aromáticos sesquiterpenos e monoterpenos contribuem positivamente para a produção de compostos que atuam na defesa antioxidante dos vegetais, corroborando com os resultados obtidos para a atividade de defesa antioxidante de *Phyla betulifolia*.

5 CONCLUSÃO

As melhores condições de luz para o cultivo *in vitro* de *Phyla betulifolia* foram alcançadas sob a maior intensidade luminosa ($139 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Onde foram observados o melhor crescimento, acúmulo de matéria seca, maior área foliar e, maior produção de 6-metil-5-hepten-2-ona e 3-metil-2-ciclohexen-1-ona.

Quanto aos espectros luminosos, as plântulas cultivadas sob as combinações de luz A:V (1:2,5 e 1:1) proporcionaram maior acúmulo de matéria seca, e a combinação de A:V (1:1) maior área foliar. O acúmulo de pigmentos fotossintéticos foi maior em plântulas cultivadas sob luz VD e AM. E a luz na faixa do A apresentou maior acúmulo de compostos fenólicos totais, assim como maior atividade antioxidante total, eliminação de radical DPPH e poder quelante. A menor produção de compostos voláteis foi observada sob a luz V. Com

isso, acredita-se que as combinações de luz A:V (1:2,5 e 1:1) produziram plântulas com melhores condições para a fase de aclimatização.

REFERÊNCIAS

- AASAMAA, K.; APHALO, P.J. Effect of vegetational shade and its components on stomatal responses to red, blue and green light in two deciduous tree species with different shade tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.121, p.94-101, 2016.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 5th ed. Gruver: Texensis Publishing, 2017.
- ADAMS, R. P.; WEERASOORIYA, A.; GAO, M. Comparison of volatile leaf terpenoids from *Lippia dulcis* (Verbenaceae) obtained by steam distillation and pentane liquid extraction. **Phytologia**, v. 96, n. 4, p. 252-259, 2014.
- ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.
- ANDRADE, H. B.; BRAGA, A. F.; BERTOLUCCI, S. K. V.; HSIE, B. S.; SILVA, S. T.; PINTO, J. E. B. P. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit *in vitro* plantlets. **Acta Horticulturae**, v. 1155, p. 277-284, 2017.
- ANTROPOLOCEU ANTONOPOLOU, C.; DIMASSI, K.; THERIOS, I.; CHATZISSAVVIDIS, C. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. **Biologia Plantarum**, v.48, p.549-553, 2004.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003.
- BOONSNONGCHEEP, P.; KORSANGRUANG, S.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHINTAPAKORN, Y.; SARALAMP, P.; PRATHANTURARUG, S. Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 103, n. 3, p. 333-342, 2010.
- BORGES, C. V.; MINATEL, I. O.; GOMEZ-GOMEZ, H. A.; LIMA, G. P. P. Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites. Chapter 15. In: Ghorbanpour, M.; Varma, A. **Medicinal Plants and Environmental**. Springer International Publishing AG, 2017.
- BRUNETTI, C.; GUIDI, L.; SEBASTIANI, F.; TATTINI, M. Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 119, p. 54–62, 2015.
- CASTRO, E. M. de; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: Editora UFLA, 2009. 234p.

DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, v. 503, p. 1-24, 1990.

DONG, C.; FU, Y.; LIU, G.; LIU, H. Low light intensity effects on the growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity, yield and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) at different growth stages in BLSS. **Advances in Space Research, Saint-Mandé**, v.53, n.11, p.1557-1566, 2014.

DOU, H. et al. Effects of Light Quality on Growth and Phytonutrient Accumulation of Herbs under Controlled Environments. **Horticulturae**, v. 3, n. 2, p. 36, 2017.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Raven|Biologia vegetal**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2014. 1.637 p.

FRANKHAUSER, C.; CHORY, J. Light control of plant development. **Annual Review Cellular Development and Biology**, Palo Alto, v.13, p.203-229, 1997.

GIADA, M. de L. R. Uma abordagem sobre a capacidade antioxidante in vitro de alimentos vegetais e bebidas. **Demetra**, n. 9, v. 1, p. 137-146, 2014.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n.12, p. 1332–1334, 1979.

KIM, H. H.; WHEELER, R. M.; SAGER, J. C.; GOINS, G. D.; NORIKANE, J. H. Evaluation of lettuce growth using supplemental green light with red and blue light-emitting diodes in a controlled environment-a review of research at Kennedy Space Center. In: **V International Symposium on Artificial Lighting in Horticulture**, 711., 2005, Lillehammer. p.111-120.

KOZAI, T.; ZHANG, G. Some Aspects of the Light Environment. Chapter 4. In: *In*: KOZAI, T.; FUJIWARA, K.; E. S. RUNKLE. **LED Lighting for Urban Agriculture**. 435p. 2016.

LAZZARINI, E. L.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T., COELHO, A. D.; MEDEIROS, A. P. R.; BERTOLUCCI, S, K. V.; PINTO, J. E. B. P.; SOARES, J. D. R. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas, **Scientia Agraria Paranaensis**, 16 (1983–1471), 137-144, (2017).

LAZZARINI, E. L.; BERTOLUCCI, S, K. V.; PACHECO, F. V.; SANTOS, J. dos; SILVA, S. T.; CARVALHO, A. de; PINTO, J. E. B. P. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Volume 135, n. 3, p 367-379, 2018.

LARCHER, Walter. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa. 531p. 2004.

LIMA, A. L. DA S.; ZANELLA, F.; CASTRO, L. D. M. DE. Crescimento de *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang. e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.)

Morong (Leguminosae) sob diferentes níveis de sombreamento. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 43-48, 2010.

LEE, D.W. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipeterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, v.87, n.4, p.447-455, 2000.

MANIVANNAN, A.; SOUNDARARAJAN, P.; HALIMAH, N.; KO, C. H.; JEONG, B. R. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 56, n. 1, 2015.

MASSA, G.; NORRIE, J. LEDs electrifying horticultural science: proceedings from the 2014. Colloquium and Workshop. **HortSci**, n. 50, v. 9, p.1272-1273, 2015.

MENG, X.; XING, T.; WANG, X. The role of light in the regulation of anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida*. **Plant Growth Regul**, n. 44, p.243-250, 2004.

MILECH, C.; LUCHO, S. R.; KLEINOWSKI, A. M.; DUTRA, D. B.; SOARES M. M.; BRAGA, E. J. B. Production of pigments in *Alternanthera sessilis* calli mediated by plant growth regulators and light. *Maringá*, v. 39, n. 3, p. 381-388, 2017.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, n., 7, v. 9, p. 405-10. 2002.

MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends Plant Science**, n. 22, v. 1, p. 11-19, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid Growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, p.4 73-97, 1962.

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

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. Topic detection and tracking evaluation. 2008. Disponível em: <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em: 22 jul. 2018.

ROACH, T. et al. Distress and eustress of reactive electrophiles and relevance to light stress acclimation via stimulation of thiol/disulphide-based redox defences. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 122, n. November 2017, p. 65-73, 2018.

SAMUOLIENĖ, G. et al. LED irradiance level affects growth and nutritional quality of Brassica microgreens. **Central European Journal of Biology**, Szczecin, v.8, n.12, p.1241-1249, 2013.

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

SILVA, A. B. da; CORREA, V. R. S.; TOGORO, A. H.; SILVA, J. A. dos S. Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) micropropagado. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 380-386, 2014.

SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B.; LAZZARINI, L. E. S.; TAVARES, M. C.; PINTO, J. E. B. P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017.

SHIMIZU, H. Effect of Light Quality on Secondary Metabolite Production in Leafy Greens and Seedlings. Chapter 18. *In*: KOZAI, T.; FUJIWARA, K.; E. S. RUNKLE. **LED Lighting for Urban Agriculture**. 435p. 2016.

STEPHEN C. G. Phenolics as antioxidants. Chapter 6. *In*: SMIRNOFF, N. **Antioxidants and reactive oxygen species in plants**. 317p. 2005.

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

TAKAHASHI S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* v. 4, n. 13, p. 178-182, 2008.

VICTÓRIO, C. P.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Qualidade de Luz e Produção de Pigmentos Fotossintéticos em Plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 213-215, jul. 2007.

ZHANG, T.; FOLTA, K. M. Green light signaling and adaptive response. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, n. 1, 2012.

ZERVOUDAKIS, G.; SALAHAS, G.; KASPIRIS, G.; KONSTANTOPOULOU, E. Influence of light intensity on growth and physiological characteristics of common sage (*Salvia officinalis* L.). *Braz. Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 55, n. 1, p. 89-95, 2012.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diante das condições de cultivo *in vitro* propostas neste estudo, as plântulas de *Phyla betulifolia* adaptaram-se melhor ao meio de cultivo MS sem redução da concentração de sais, promovendo o crescimento e enraizamento satisfatórios para a aclimatização da espécie *ex vitro*.

Os explantes provenientes de segmentos nodais pré-estabelecidos, apresentaram maior taxa de crescimento relativo e de taxa de multiplicação, indicando que estes são a melhor fonte de explante para a micropropagação.

O sistema de ventilação natural com quatro membranas (SVN4) proporcionou maior crescimento vegetativo das plântulas de *Phyla betulifolia*, morfoanatomicamente mais estruturadas, com maiores teores de pigmentos fotossintéticos e compostos fenólicos, além de maior produção de compostos de defesa antioxidante.

As maiores intensidades luminosas ofereceram melhores condições para o crescimento, acúmulo de matéria seca, área foliar, além de ter sido detectado maior quantidade de 6-metil-5-hepten-2-ona e 3-metil-2-ciclohexen-1-ona na fração volátil das plântulas cultivadas sob maior intensidade luminosa. Os resultados obtidos para o teor de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides, assim como para a eliminação de radical DPPH e poder redutor, indicam que baixas intensidades luminosas podem prejudicar a produção de plântulas de *Phyla betulifolia*.

Quanto aos espectros luminosos, as plântulas cultivadas sob os espectros vermelho, verde e amarelo apresentaram maior comprimento de broto, entretanto foram plântulas que desenvolveram características de estiolamento. As combinações de luz A:V (1:2,5 e 1:1) proporcionaram maior acúmulo de matéria seca, e a combinação de A:V (1:1) maior área foliar. O acúmulo de pigmentos fotossintéticos foi maior em plântulas cultivadas sob luz VD e AM. E a luz na faixa do A apresentou maior acúmulo de compostos fenólicos totais, assim como maior atividade antioxidante total, eliminação de radical DPPH e poder quelante. A menor produção de compostos voláteis foi observada sob a luz V.