



MELVIS CELESTE VILANCULOS COSSA

**CRESCIMENTO *in vitro* DE PLÂNTULAS E ACÚMULO DE
ARBUTINA EM *Origanum majorana* L. SOB DIFERENTES
INTENSIDADES, ESPECTROS DE LUZ, SISTEMA DE
VENTILAÇÃO NATURAL E DOSES DE SACAROSE**

**LAVRAS – MG
2023**

MELVIS CELESTE VILANCULOS COSSA

**CRESCIMENTO *in vitro* DE PLÂNTULAS E ACÚMULO DE ARBUTINA EM
Origanum majorana L. SOB DIFERENTES INTENSIDADES, ESPECTROS DE LUZ,
SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL E DOSES DE SACAROSE**

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

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2023**

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

Cossa, Melvis Celeste Vilanculos.

Crescimento *in vitro* de plântulas e acúmulo de arbutina em
Origanum majorana L. sob diferentes intensidades, espectros de
luz, sistema de ventilação natural e doses de sacarose / Melvis
Celeste Vilanculos Cossa. - 2022.

112 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientadora: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. *Origanum majorana* L. 2. Crescimento *in vitro*. 3. Arbutina.
I. Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. II. Bertolucci, Suzan Kelly
Vilela. III. Título.

MELVIS CELESTE VILANCULOS COSSA

**CRESCIMENTO *in vitro* DE PLÂNTULAS E ACÚMULO DE ARBUTINA EM
Origanum majorana L. SOB DIFERENTES INTENSIDADES, ESPECTROS DE LUZ,
SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL E DOSES DE SACAROSE**

***In vitro* SEEDLING GROWTH AND ARBUTIN ACCUMULATION IN
Origanum majorana L. UNDER DIFFERENT INTENSITIES, LIGHT SPECTRUM,
NATURAL VENTILATION SYSTEM AND SUCROSE DOSES**

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


APROVADA em 02 de dezembro de 2022.

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci UFLA

Dr. Filipe Almendagna Rodrigues UFLA

Dr. Alexandre Alves de Carvalho UFLA

Dra. Flávia Dionísio Pereira EPAMIG

Documento assinado digitalmente
 JOSE EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO
Data: 06/02/2023 09:32:03-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

**LAVRAS-MG
2023**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Agricultura (DAG), ao Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, aos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Fotoquímica de Plantas Medicinais da UFLA, por possibilitarem a realização do Doutorado.

Aos professores, José Eduardo Brasil e Suzan Kelly Vilela Bertolucci, pela orientação, disponibilidade, atenção, paciência, dedicação, profissionalismo e pelos conhecimentos transmitidos. Serei eternamente grata.

Ao Dr. Alexandre, por toda atenção, auxílio, esclarecimentos e ensinamentos.

Aos meus pais José Jorge Cossa e Cesaltina Amós Vilanculos Cossa, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, e por todo esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui.

A minha mãe de coração Fernanda Lucas e ao meu tio de coração Carmito (*em memória*) que sempre apoiaram e acreditaram que eu conseguiria, e pelos bons momentos proporcionados e vividos.

Ao meu esposo Tony pelo suporte e apoio na realização dessa etapa da minha vida. As minhas filhas Lana Kyanga e Luny Kiyane pela motivação e inspiração, pela força e pelo carinho nos momentos em que faltei, serei eternamente grata pelos momentos vividos nesta jornada.

Aos meus irmãos Edson, Mauro e Júnior e minhas irmãs de coração Marisa, Márcia e Cynthia a minha eterna gratidão pelo apoio.

Aos funcionários Evaldo, Dico, Giulia e Anette, exemplos de organização e planejamento.

Agradeço também aos amigos João Pedro, Júlia, Thainá, Marlon, Adriane, alguns pela ajuda durante as pesquisas, e outros pelo tempo vivido.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, pela bolsa concedida.

Muito OBRIGADA!!!!

RESUMO

A manjerona (*Origanum majorana* L.) é uma erva aromática sendo cultivada, sobretudo, em hortas e jardins. Rica em fitoquímicos, como timol, carvacrol, taninos, hidroquinona e arbutina, os quais possuem aplicações terapêutica e cosméticas. A micropropagação tem sido muito utilizada na multiplicação de várias espécies de interesse econômico, entre as quais as medicinais com valor farmacológico reconhecido. Objetivou-se avaliar a influência de diferentes reguladores de crescimento, espectros de luz, sistema de ventilação natural e doses de sacarose no crescimento *in vitro* de *Origanum majorana* L. e acúmulo de arbutina. No primeiro experimento diferentes concentrações de sais de crescimento (meio de cultivo Murashige e Skoog, 1962) de citocininas (6-benzilaminopurina e metatopolim) em combinação com auxinas foram avaliadas. Com base nos resultados obtidos plântulas cultivadas em meio MS e explante apical proporcionaram maior crescimento. Meio de cultivo suplementado 6-benzilaminopurina ou metatopolim a 2,0 mg/L proporcionou maior brotação, no entanto o acúmulo de arbutina foi inibido pelo 6-benzilaminopurina. A combinação de AIB e meio MS/2 promoveu maior percentual de enraizamento. A manipulação da intensidade e qualidade luminosa no cultivo *in vitro* afetou diretamente tanto na produção de biomassa, quanto no conteúdo de pigmentos fotossintéticos e no acúmulo de arbutina. Menores intensidade luminosas, 26 e 51 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, proporcionaram maior crescimento e conteúdo de pigmentos fotossintéticos. No entanto aumento das intensidades proporcionou maior acúmulo de biomassa e da arbutina. Quanto a qualidade de luz, espectro de luz branca, verde e vermelho e azul combinados estimularam maior acúmulo de biomassa e conteúdo de clorofila total, todavia apenas espectro monocromático vermelho que promoveu maior teor de arbutina. O sistema de ventilação com quatro membranas porosas e com a concentração de sacarose de 15 g L⁻¹ se mostrou-se o melhor tratamento. No entanto maior acúmulo de arbutina foi favorecido em cultivo fotomixotrófico em meio suplementado com 30g de sacarose. Sistema de ventilação e espectros de luz afetaram a crescimento, concentração de pigmentos fotossintéticos e acúmulo de arbutina *in vitro*, sendo maiores valores observados no cultivo luz monocromática vermelha. A presente pesquisa permitiu maior conhecimento da espécie sobre o seu cultivo e produção de metabolitos secundários *in vitro*.

Palavras-chave: Manjerona. Glicosídeo fenólico. Sais mineiras. Regulador de crescimento. Qualidade de luz.

ABSTRACT

Marjoram (*Origanum majorana* L.) is an aromatic herb grown mainly in vegetable gardens. Rich in phytochemicals, such as thymol, carvacrol, tannins, hydroquinone and arbutin, which have therapeutic and cosmetic applications. Micropropagation has been widely used in the multiplication of various species of economic interest, including medicinal ones with recognized pharmacological value. The objective was to evaluate the influence of different growth regulators, light spectra, natural ventilation system and sucrose doses on the in vitro growth of *Origanum majorana* L. and arbutin accumulation. In the first experiment different concentrations of growth salts (Murashige and Skoog culture medium, 1962) of cytokinins (6-benzylaminopurine and metatopolym) in combination with auxins were evaluated. Based on the results obtained, seedlings grown in MS medium and apical explant provided greater growth. Culture medium supplemented with 6-benzylaminopurine or metatopolym at 2.0 mg/L provided greater sprouting, however arbutin accumulation was inhibited by 6-benzylaminopurine. The combination of AIB and MS/2 medium promoted a higher percentage of rooting. The manipulation of light intensity and quality in in vitro cultivation directly affected both biomass production, photosynthetic pigment content and arbutin accumulation. Lower light intensity, 26 and 51 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, provided greater growth and photosynthetic pigment content. However, increasing intensities provided greater accumulation of biomass and arbutin. As for light quality, white, green and red and blue light spectrum combined stimulated greater accumulation of biomass and total chlorophyll content, but only the red monochromatic spectrum promoted higher arbutin content. The ventilation system with four porous membranes and with a sucrose concentration of 15 g L⁻¹ proved to be the best treatment. However, greater accumulation of arbutin was favored in photomyxotrophic cultivation in medium supplemented with 30g L⁻¹ of sucrose. Ventilation system and light spectra affected growth, concentration of photosynthetic pigments and arbutin accumulation in vitro, with higher values observed in red monochromatic light cultivation. The present research allowed greater knowledge of the species about its cultivation and production of secondary metabolites in vitro.

Keywords: Marjoram. Phenolic glycoside. Mineral salts. Growth regulator. Light quality.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - *Origanum majorana* L. cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, UFLA 2022 17
- Figura 2 - Estrutura da arbutina e seus estereoisômeros 20

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 - Crescimento de segmentos apicais e nodais de *Origanum majorana* L. cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de sais do meio de cultura MS, MS/2 e MS/4 aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022..... 40
- Figura 2 - Comprimento da parte aérea (CPA), massas secas de folhas (MSF), caule (MSC) e parte aérea (MSPA) de plantas de *Origanum majorana* L. cultivadas *in vitro* a partir de segmentos nodais e apicais em meios MS, MS/2 e MS/4 aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022 42
- Figura 3 - Plantas de *O. manjerona* L. oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de BAP e meta-topolin testados isoladamente, aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022..... 43
- Figura 4 - Indução de brotações axilares em explante de *Origanum majorana* L. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de BAP e meta-topolin aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022 44
- Figura 5 - Proliferação de brotações em segmentos nodais de *O. majorona* L. em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e meta-topolin em combinação com ANA (0,25 mg L⁻¹) *in vitro*, aos 40 dias. Lavras, 2022..... 46
- Figura 6 - Avaliação de proliferação de brotações e produção de massa seca de plântulas de *O. majorana* L. cultivada *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e meta-topolin em combinação com ANA (0,25 mg L⁻¹) durante 40 dias. Lavras, UFLA 2022 48
- Figura 7 - Percentual de enraizamento de plantas de *O. majorana* L. cultivada *in vitro* em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de AIB e ANA aos 30 dias. Plantas provenientes da fase de multiplicação em meio de cultura suplementado com BAP (A) e meta-topolin (B). Lavras, UFLA 2022 49

Figura 8 - Percentual de enraizamento de plantas de <i>O. majorana</i> L. cultivada <i>in vitro</i> em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de AIB e ANA aos 30 dias. Plantas provenientes da fase de multiplicação em meio de cultura suplementado com BAP (A) e meta-topolin (B). Lavras, UFLA 2022	51
Figura 9 - Cromatógrafo CCD, (A) amostras de extrato de folhas de manjerona, (B) amostras de solução padrão de arbutina (ARB). Lavras, UFLA 2022	52
Figura 10 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD de uma amostra de extrato de folha seca de <i>Origanum majorana</i> (preto) e co-injeção da solução extrativa com solução de arbutina de referência (vermelho) no tempo de retenção de 4,2 min. Lavras, UFLA 2022.....	52
Figura 11 - Curvas analíticas e média obtidas por CLAE-FR, em dois dias consecutivos para ARB. Lavras, UFLA 2022.....	54
Figura 12 - Quantificação de ARB (mg g ⁻¹) nas folhas de plântulas de <i>O. majorana</i> L. cultivada <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e meta-topolin em combinação com ANA (0,25 mg L ⁻¹) durante 40 dias, Lavras UFLA (2022).....	56
Figura 13 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE - DAD (quantificação de arbutina em folhas secas). Tempo de Retenção (TR) ARB = 4,2 minutos. produzidas no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Origanum majorana</i> sob diferentes intensidades de luz (T1) Controle, (T2) BAP 0.5 mg L ⁻¹ , (T3) BAP 1. mg L ⁻¹ , (T4) BAP 1.5 mg L ⁻¹ , (T5) BAP 2.0 mg L ⁻¹ , (T6) m-TOP 0.5 mg L ⁻¹ , (T7) m-TOP 1.0 mg L ⁻¹ , (T8) m-TOP 1.5 mg L ⁻¹ , (T9) m-TOP 2.0 mg L ⁻¹ . Lavras, UFLA 2022	57

ARTIGO 2

Figura 1 - Plântulas de <i>Origanum majorana</i> L. oriundas de segmentos nodais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes intensidades 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022.....	72
Figura 2 - Número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC), da parte aérea (MSPA), de plântulas de <i>Origanum majorana</i> L. oriundas de segmentos nodais cultivados <i>in vitro</i> nas intensidades 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aos 40 dias	74

Figura 3 -	Quantificação de ARB (mg g^{-1}) nas folhas produzidas no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Origanum majorana</i> sob diferentes intensidades de luz. As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Lavras, UFLA, 2022	77
Figura 4 -	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE - DAD (quantificação de arbutina em folhas secas). TR ARB = 4,2 minutos. produzidas no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Origanum majorana</i> sob diferentes intensidades de luz (T1) $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (T2) $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (T3) $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (T4) $94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (T5) $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lavras, UFLA 2022	78
Figura 5 -	Plântulas de <i>Origanum majorana</i> L. oriundas de segmentos nodais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes espectros de luz: branca, azul (A), verde, amarelo, vermelho (V), 50%A/50%V, 30%A/70%V, 70%A/30%V aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022	79
Figura 6 -	Plântulas de <i>Origanum majorana</i> L. oriundas de segmentos nodais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes espectros de luz, aos 40 dias. (A) Número de brotos (NB), (B) Comprimento da parte aérea (CPA), (C) Matéria seca das folhas (MSF), (D) do caule (MSC), (E) da parte aérea (MSPA). Lavras, UFLA, 2022	80
Figura 7 -	Quantificação de arbutina (ARB - mg g^{-1}) nas folhas produzidas no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Origanum majorana</i> sob diferentes espectros de luz, Lavras, UFLA, 2022	83
Figura 8 -	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE - DAD na quantificação de arbutina em folhas secas produzidas no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Origanum majorana</i> sob diferentes espectros de luz. T1 (Branca), T2 (Azul), T3 (Verde) T4 (Amarelo), T5 (Vermelho), T6 (50A:50V), T7 (30V:70A), T8 (70V:30A)	84

ARTIGO 3

- Figura 1 - Plântulas de *Origanum majorana* L. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose em combinação com sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas (SVN4), aos 40 dias, Lavras 2022 98
- Figura 2 - Número de brotos (A) e comprimento da parte aérea (B) de plântulas de *Origanum majorana* L. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes doses em combinação com sistema de ventilação natural com 4 membranas, aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022 99
- Figura 3 - Massa seca de folha, caule e parte aérea de plantas de *Origanum majorana* L. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose em combinação com sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas, aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022 100
- Figura 4 - Quantificação de arbutina (ARB mg g⁻¹) nas folhas produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose em combinação com sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas, aos 40 dias, Lavras, UFLA 2022 101
- Figura 5 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE - DAD (quantificação de arbutina em folhas secas) produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose em combinação com sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas, aos 40 dias, Lavras (2022). T1 (7,5g), T2 (15g), T3 (30g) 102
- Figura 6 - Número de brotos e comprimento da parte aérea de plantas de *O. majorana* L. cultivadas *in vitro* em meio MS cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, com sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas (SVN4), aos 40 dias 103
- Figura 7 - Número de brotos, comprimento da parte aérea, matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC), da parte aérea (MSPA), de plântulas de *Origanum majorana* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes espectros de luz em sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas, aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022 104

- Figura 8 - Quantificação de ARB (mg g^{-1}) nas folhas produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* sob diferentes espectros de luz e sistema de ventilação natural com quatro membranas porosas, Lavras 2022..... 107
- Figura 9 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE - DAD (quantificação de arbutina em folhas secas).TR ARB = 4,2 minutos. produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* sob diferentes espectros de luz e sistema de ventilação com quatro membranas (SVN4), T1 (Branca), T2 (Azul), T3 (Verde) T4 (Amarelo), T5 (Vermelho), T6 (50A:50V), T7 (30A:70V), T8 (70A:30V 108

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Exemplos de família botânica e espécie de plantas onde se encontra o composto químico arbutina.	21
---	----

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Correspondência entre volumes e as massas injetadas para a construção das curvas analíticas de arbutina (ARB). Lavras, UFLA, 2022.....	39
Tabela 2 - Massa injetada, área média ($n=3$) e desvio padrão relativo das curvas analíticas para Arbutina nos dois dias de análise. Lavras, UFLA 2022	53
Tabela 3 - Resultados da regressão linear para curvas analíticas de Arbutina, em dois dias consecutivos de análise. Lavras, UFLA 2022	55
Tabela 4 - Limites de quantificação e detecção determinados com base nos parâmetros das curvas analíticas obtidas. Lavras, UFLA 2022	55

ARTIGO 2

Tabela 1 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de <i>Origanum majorana</i> L. cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes intensidades de luz, aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022	75
Tabela 2 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de <i>Origanum majorana</i> L. cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes espectros de luz, aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022	82

ARTIGO 3

Tabela 1 - Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de <i>Origanum majorana</i> L. cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes espectros de luz e sistema de ventilação natural com quatro membranas, aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022 ...	106
--	-----

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Família Lamiaceae	16
2.2	<i>Origanum majorana</i> L.: aspectos botânicos e agronômicos.....	16
2.3	Composição química e aplicações de <i>Origanum majorana</i> L.	18
2.4	Ocorrência e biossíntese de arbutina	19
2.5	Micropropagação e produção de arbutina <i>in vitro</i>	22
	REFERÊNCIAS	25
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	31
	ARTIGO 1 - 6-BENZILAMINOPURINA E META-TOPOLIN NO ESTABELECIMENTO, PROLIFERAÇÃO DE BROTAÇÕES E ACÚMULO DE ARBUTINA EM <i>Origanum majorana in vitro</i>	31
	ARTIGO 2 - CRESCIMENTO E ACUMULO DE ARBUTINA EM <i>Origanum majorana</i> L. CULTIVADA <i>in vitro</i> SOB DIFERENTES INTENSIDADES E QUALIDADE ESPECTRAL DE LUZ	66
	ARTIGO 3 – CULTIVO SOB SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL, DOSES DE SACAROSE E COMPRIMENTO DE ONDA EM RELAÇÃO AO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS E ACÚMULO DE ARBUTINA DE <i>Origanum majorana</i> L. <i>in vitro</i>	91

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A *Origanum majorana* L. é uma planta herbácea, medicinal e aromática pertencente à família Lamiaceae (syn. *Majorana hortensis* Moench) comumente conhecida como Manjerona doce (MUQADDAS et al., 2016; TRIPATHY et al., 2017). É uma planta medicinal nativa da região mediterrânea e cultivada em muitos países da Ásia, Norte da África e Europa (BINA & RAHIMI, 2016; MÉABED et al., 2018).

A planta tem sido utilizada para em distúrbios gastrointestinais, respiratórios, cardíacos, reumatológicos e neurológicos (BINA & RAHIMI, 2016), pois são alegadas a ela atividades antioxidante, hepatoprotetora, cardioprotetora, antiplaquetária, gastroprotetora, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral (BOUYAHYA et al., 2021; MÉABED et al., 2018).

Os metabólitos secundários produzidos pela manjerona têm sido objeto de vários estudos, sendo os principais fitoquímicos concentrados nas partes aéreas desta planta e pertencendo principalmente as classes de compostos fenólicos e terpenóides (AMOR et al., 2019.; ERENLER et al.; 2015). A *O. majorana* L. contém importantes fitoconstituintes sendo rica em timol, carvacrol, taninos, hidroquinona, arbutina, limoneno, terpineno, canfeno e flavonóides (BOUYAHYA et al., 2021; MÉABED et al., 2018).

Nos últimos anos, extratos de ervas medicinais, rico em arbutina tem atraído atenção especial devido às múltiplas propriedades biológicas e farmacológicas e seus benefícios cosméticos (BOO, 2021; RYCHLIŃSKA & NOWAK, 2012; SAEEDI et al., 2021). Dentre as espécies que naturalmente produzem a arbutina a *O. majorana* L. tem sido explorada como potencial fonte deste metabolito, sendo por isso estudada (LUKAS et al., 2010).

A micropropagação de plantas representa uma alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico, entre as quais as medicinais com valor farmacológico reconhecido. A cultura de tecidos permite suprir a crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com capacidade de síntese de metabólitos secundários potencializada por diferentes fatores químicos e físicos (MORAIS et al., 2012).

Na micropropagação, os reguladores de crescimento, especialmente as auxinas e citocininas, desempenham um papel muito importante. É bastante comum a utilização da interação de auxinas e citocininas no processo de diferenciação, e também para estimular o acúmulo de metabólitos secundários nos tecidos vegetais. As auxinas são utilizadas quando o

propósito for o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular, já as citocininas são frequentemente utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações múltiplas (MORAIS et al., 2012).

Estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de plantas medicinais e aromáticas têm diferentes respostas em função da intensidade luminosa e do controle do espectro de luz durante o cultivo (ALVARENGA et al., 2015; APPOLLONI et al., 2021). A fonte de luz tradicional utilizada na cultura *in vitro* é a luz branca fluorescente, onde se trabalha geralmente com o objetivo de encontrar a intensidade de luz mais adequada de acordo com cada espécie estudada. Os diodos emissores de luz (LEDs) como uma nova fonte de energia têm muitas vantagens em comparação com a fonte de luz tradicional, porque os LEDs têm uma vida longa, especificidade de comprimento de onda e largura de banda estreita, o que permite observar diretamente a influência de uma faixa de comprimento de onda mais específica no desenvolvimento da planta (APPOLLONI et al., 2022; BIAN et al., 2014).

O cultivo *in vitro* convencional comumente é heterotrófico ou fotomixotrófico. Os explantes cultivados em recipientes com alta umidade relativa do ar, alta concentração de etileno, baixa concentração de CO₂ e baixa taxa fotossintética, utilizam a sacarose como fonte de carbono exógena. Com a utilização desses métodos a taxa de sobrevivência durante a aclimatização é relativamente baixa (MOREIRA et al., 2013; SALDANHA et al., 2012). Com isso, o estímulo de uma micropropagação fotoautotrófica com o objetivo de promover o crescimento e a taxa fotossintética. Para induzir o crescimento fotoautotrófico torna se necessário retirar a sacarose do meio de cultivo, aumentar a intensidade luminosa e CO₂, para isso, a utilização de frascos com sistema de ventilação natural através de membranas permeáveis nas tampas, tem melhorado a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de biomassa seca (SALDANHA et al., 2012; KOZAI, 2006).

Objetivou-se avaliar a influência de diferentes reguladores de crescimento, espectros de luz, sistema de ventilação natural e doses de sacarose na propagação *in vitro* e acúmulo de arbutina de *Origanum majorana* L.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Lamiaceae

A família Lamiaceae consiste em aproximadamente 3500 espécies que são nativas principalmente na região do Mediterrâneo (LORENZI et al., 2002). Pertencem á esta familia as espécies de alecrim (*Rosmarinus sp.*), sálvia (*Salvia sp.*), orégano, manjerona (*Origanum sp.*), tomilho (*Thymus sp.*), manjerição (*Ocimum sp.*), menta (*Mentha sp.*), dentre outras, as quais são estudadas devido às suas propriedades aromaticas e medicinais (LORENZI et al., 2002; MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007).

As características morfológicas dessa família são diversas, podendo se apresentar como erva, arbusto ou árvore. Além disso suas folhas são simples e podem apresentar raramente folhas compostas, opostas ou verticiladas e sem estípulas, geralmente são serreadas. Com inflorescência cimosas, frequentemente congesta, suas flores são vistosas, bissexuadas, zigomorfas, diclamídeas, pentâmeras e bilabiadas. Os frutos das plantas pertencentes a essa família, apresentam como baya ou esquizocarpo (LORENZI et al., 2002).

Tem como característica principal, seu aroma bastante marcante e fácil de distinguir, destacando-se por isso na área comercial de forma relevante, para a indústria farmacêutica e cosmética, bem como para extração de óleos, chás, culinária e na aromaterapia (LORENZI et al., 2002).

Grande parte das espécies desta família é aromática e possui mistura complexa de compostos bioativos com propriedades antibacterianas, antivirais, antioxidantes e anti-inflamatórias que contribuem para a atividade biológica geral em condições *in vitro* e *in vivo* (FERRARA et al., 2003; NAGHIBI et al., 2005; ZHAO et al., 2021). As propriedades antioxidantes dos membros da família Lamiaceae são atribuídas principalmente aos compostos fenólicos como o ácido rosmarínico e ácido cafeico em alecrim, sálvia, orégano e tomilho (AHN et al., 2020; MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007).

2.2 *Origanum majorana* L.: aspectos botânicos e agronômicos

A espécie *O. majorana* L. (sin: *Majorana hortensis* Moench) é uma planta herbácea e aromática que pertence à família Lamiaceae. Originária de lugares áridos da Europa meridional espalhou-se por quase todo o mundo, no Brasil sendo cultivada, sobretudo, em hortas e jardins (CHISHTI et al., 2013; MÉABED et al., 2018).

A *O. majorana* conhecida dos antigos egípcios, gregos e romanos, foi cultivada no Egito há mais de 3.000 anos como erva de vaso e usada para saborear a comida. Os gregos chamavam a manjerona de “alegria das montanhas” e usavam coroas de manjerona nos casamentos (RODRIGUES et al., 2005; CHARLES, 2013). A manjerona (*O. majorana* L.) é uma erva aromática cultivada em vários países mediterrânicos desde a antiguidade, cujo uso se popularizou tanto como planta medicinal quanto como ingrediente de tempero (CALA, 2021; VAGI et al., 2002).

O. majorana é conhecida atualmente como manjerona-doce, possui odor forte, aromático, penetrante, quente, às vezes picante, mas muito agradável (TRIPATHY et al., 2017). É uma planta altamente aromática, arbustiva perene crescendo de 30 a 60 cm (figura 1), rizoma oblíquo, caule peludo, folhas inteiras, as maiores sendo fragmentadas, oblatas a amplamente elípticas e flores brancas ou vermelhas em brácteas agrupadas (BALDONI, 2017; BINA et al., 2017.; BOUYAHYA et al., 2021; RODRIGUES et al., 2005; TRIPATHY et al., 2017).

Figura 1 - *Origanum majorana* L. cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, UFLA 2022



Fonte: Do autor (2022)

No cultivo, recomenda-se formas de propagação via sementes ou a partir de estacas do caule. É indicado um espaçamento de 60 x 30 cm entre linhas e plantas, respectivamente. A espécie prefere regiões de clima temperado brando, com luz plena, solos não muito ácidos, com boa fertilidade, bem drenados e protegidos de ventos fortes. Além disso, recomenda-se uma adubação com esterco de gado bem curtido, esterco de galinha ou composto orgânico, quando necessário (EMBRAPA, 2007).

A manjerona possui excelente capacidade de enraizamento com estacas herbáceas apicais coletadas no outono e primavera, sendo indicado o uso de estacas apicais de 3 e 6 cm de comprimento para a propagação assexuada da espécie (ZIECH et al., 2020). Visando a produção de biomassa da *O. majorana*, é indicado um período de 60 dias no verão e 72 dias no inverno entre o transplântio e a colheita (SOUZA et al., 2021).

Sandhya et al. (2021) estabeleceram um protocolo eficiente para a propagação *in vitro* através de segmentos nodais, empregando meio de cultura MS + 1,0 mg/L BAP na indução de microbrotos ($4,4 \pm 0,22$ microbrotos). A multiplicação foi realizada em meio MS + 0,5 mg/L BAP + 0,25 mg/L ANA, gerando $98,0 \pm 0,22$ brotos por explante/cultura vaso. O enraizamento *in vitro* foi superior em $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L AIB, gerando $4,8 \pm 0,20$ raízes/brotos.

A espécie é utilizada como condimento, flavorizante e aromatizante de bebidas, carnes, sopas em pó, sorvetes, balas e assados (SOLIMAN et al., 2009). A *O. majorana* é tradicionalmente indicada no tratamento de enxaqueca, tonturas, asma e problemas gastrointestinais (ABDEL-MASSIH, ABRAHAM, 2014).

2.3 Composição química e aplicações de *Origanum majorana* L.

Inicialmente, a manjerona era utilizada como aromatizante e flavorizante de alimentos, bebidas, medicamentos e mais tarde foram descobertas propriedades aromatizantes empregadas em perfumaria como aroma e fixador de perfumes (BALDONI, 2017). A espécie é capaz de produzir a arbutina, um fenol amplamente utilizado na indústria cosmética, como clareador para tratamento de desordens de hiperpigmentação, não causando melanocitotoxicidade, sendo assim uma opção ao uso de hidroquinona, corticoesteróides e ácido kójico (ZHU, GAO 2008).

A *O. majorana* L. é rica em fitoquímicos, como timol, carvacrol, taninos, hidroquinona, arbutina, vitexina, timonina, triacontana, sitosterol, hidrato de *cis*-sabineno, limoneno, terpineno, canfeno (BINA, RAHIMI, 2016) e flavonóides como diosmetina, luteolina e apigenina, que explicam suas propriedades (BOUYAHYA et al., 2021; MÉABED et al., 2018).

Vários compostos foram identificados na manjerona e diferentes atividades farmacológicas foram atribuídas a esta espécie. Na análise do óleo essencial por cromatografia gasosa (GC-MS) foram identificados compostos voláteis monoterpênicos como: hidrato de *trans*-sabineno (16,0%), sabineno (14,1%), hidrato de *cis*-sabineno (11,8%), γ -terpineno (10,2%), acetato de α -terpinil (10,0%), α -terpineno (8,9%), terpinen-4-ol (AL-FATIMI, 2018; BINA et al., 2017; MÉABED et al., 2018).

Vários trabalhos têm sido descritos demonstrando a atividade biológica da planta, Chaves et al. (2019) demonstraram que o óleo essencial obtido de folhas secas de *O. majorana* apresentou atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* e também atividade antimicrobiana contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Rus et al. (2015) também constataram que o óleo da manjerona possui alta capacidade antifúngica, sugerindo a sua utilização como fungicida ecológico contra fungos patogênicos ou contra fungos deteriorantes como *Verticillium dahliae* e *Penicillium aurantiogriseum*.

Os extratos desta planta são bem conhecidos por sua proeminente e variadas atividades biológicas, como ansiolítico, anticonvulsivante (ERENLER et al., 2015), antidiabético, antimutagênico, antiúlcera (BINA, RAHIMI, 2017), antibacteriano (AMOR et al., 2019), antifúngico (RUS et al., 2015) antioxidante (AL-FATIMI, 2018), antiprotozoário, inseticida e ovicida, bem como efeito citotóxico sobre linhas cancerosas e devido ao potencial efeito antiproliferativo (CALA, 2021; MAKRANE et al., 2018).

A espécie possui forte atividade antioxidante, principalmente devido ao seu alto teor de ácidos fenólicos e flavonóides, que são úteis em suplementos de saúde e conservação de alimentos (BAATOUR et al., 2012).

A partir de diferentes combinações de técnicas cromatográficas, foram isolados e identificados compostos químicos o extrato acetato de etila de partes aéreas de *O. majorana*, sendo 5,6,3'-Trihidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavona, hesperetina, hidroquinona, arbutina e ácido rosmarínico (ERENLER et al., 2016).

A planta tem uma grande quantidade de ácidos fenólicos (ácido rosmarínico, clorogênico e cafeico), flavonoides, ácidos ursólico e oleanólico, sendo também uma fonte útil de monoterpênóides, sesquiterpênóides, hidrocarbonetos, compostos fenólicos e compostos aromáticos (SANDHYA et al., 2021).

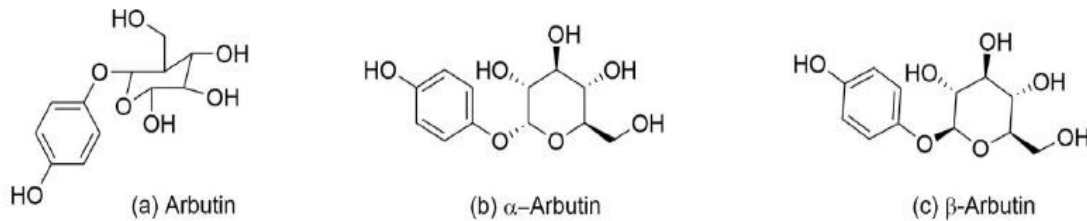
2.4 Ocorrência e biossíntese de arbutina

Origanum majorana pertence às plantas, que produzem naturalmente arbutina, onde o conteúdo deste composto varia dentro de uma faixa muito ampla, desde 0,2% a 11,8%, dependendo da origem geográfica (CALA, 2021; LUKAS et al., 2010).

A arbutina é um glicosídeo de hidroquinona é conhecida por seu efeito inibidor da atividade de tirosinase e é comumente usada como agente clareador da pele (GALLO et al., 2015; INOUE et al., 2013; KIM et al., 2018).

O glicosídeo de hidroquinona ou arbutina (p-hidroxifenil- β -D-glucopiranosídeo) é um polifenol hidrofílico bioativo que possui dois isômeros, sendo eles α -arbutina (4-hidroxifenil- α -glucopiranosídeo) e β -arbutina (4-hidroxifenil- β -glucopiranosídeo) (COUTEAU, COIFFARD, 2016) (FIGURA 2). A formação desses isômeros depende de como a hidroquinona se liga ao átomo do carbono anomérico na molécula de glicose e já foi demonstrado que a α -arbutina é dez vezes mais eficaz que a β -arbutina (SAEEDI et al., 2021).

Figura 2 - Estrutura da arbutina e seus estereoisômeros



Fonte: (Bhalla, Mittal et al. 2022)

A β -arbutina ocorre naturalmente em várias espécies vegetais, enquanto a α -arbutina é comumente produzida por vias químicas ou biotecnológicas. Os altos níveis de arbutina nas folhas estão relacionados ao crescimento das plantas em clima frio ou seco, como adaptação às condições de estresse (BRAGA et al., 2020)

Arbutina é um dos principais constituintes da planta *Arctostaphylos uva-ursi* (uva-ursi) e é encontrada em quantidades significativas em *Origanum majorana* (Gallo et al., 2015). A arbutina é amplamente distribuído na natureza e é encontrada em espécies das famílias de plantas Rosaceae, Lamiaceae, Myrothamnaceae, Ericaceae, dentro outras (MIGAS, KRAUZE-BARANOWSKA, 2015; SKRZYPCZAK-PIETRASZEK et al., 2017) (TABELA 1).

Tabela 1 - Exemplos de família botânica e espécie de plantas onde se encontra o composto químico arbutina.

Família	Espécie
Caprifoliaceae	<i>Viburnum opulus L.</i>
Ericaceae	<i>Arbutus unedo L.</i> <i>Arctostaphylos uva ursi (L.) Spreng.</i> <i>Gaultheria procumbens L.</i> <i>Vaccinium vitis idaea L.</i>
Lamiaceae	<i>Majorana hortensis Moench</i> <i>Origanum vulgare L.</i>
Pirolaceae	<i>Chimaphila umbellata (L.) Nutt.</i>
Rosaceae	<i>Pyrus boissieriana Buhse</i> <i>Pyrus communis L.</i> <i>Pyrus pyrifolia Nakai</i>
Saxifragaceae	<i>Bergenia cordifolia (Haw.) A. Br.</i> <i>Bergenia crassifolia (L.) Fritsch</i>
Turneraceae	<i>Turnera diffusa Willd.</i>

Fonte: EKIERT et al., 2012.

Estudos mostraram que a arbutina pode ser benéfica no tratamento de várias doenças, como distúrbios de hiperpigmentação, tipos de câncer, doenças do sistema nervoso central distúrbios do sistema, osteoporose, diabetes (SAEEDI et al., 2021). A arbutina tem sido alvo de pesquisas devido ao seu alto potencial na elaboração de formulações cosméticas, sendo amplamente utilizado para prevenir distúrbios de hiperpigmentação, embora suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias sejam responsáveis por diversos efeitos farmacológicos, também é utilizada tradicionalmente para hipoglicemia, cicatrização de feridas e distúrbios renais (BALLA et al., 2020).

A arbutina funciona como inibidor da tirosinase e bloqueia eficientemente a biossíntese de melanina em humanos, além disso, o composto é bem conhecido por sua atividade diurética (MIGAS, KRAUZE- BARANOWSKA, 2015; RYCHLIŃSKA, NOWAK, 2012). A atividade despigmentante da arbutina pela inibição da tirosinase ocorre desde o início da formação do pigmento até a maturação da eumelanina, detem a vantagem de ser uma molécula estável e atóxica. Após reagir com a enzima, ela age como citoestática, inibindo a hidroxilação da tirosina e a atividade de DOPA oxidase da tirosinase (BOO, 2021).

Dentro do gênero *Origanum*, a formação de arbutina mostrou-se polimórfica, com grandes quantidades de arbutina presentes em *Ornithogalum. dubium*, bem como em *O. majorana* silvestre e cultivada. A alta variabilidade de arbutina em *O. majorana* permitiria uma

seleção em cultivares com alto teor de arbutina e variedades de baixa arbutina (LUKAS et al., 2010)

A quantidade ou teor de arbutina no material vegetal é variável, dependendo do método de secagem e o período de vegetação da planta. Por exemplo, a maior quantidade de arbutina foi determinada nas folhas verdes jovens e completamente desenvolvidas de *Bergenia crassifolia* secas a 80-100° C (MIGAS, KRAUZE-BARANOWSKA, 2015). O teor de arbutina foi determinado em extratos vegetais por muitos métodos: espectrofotométrico, densitométrico e cromatográficos (LAMIEN-MEDA et al., 2009; RYCHLIŃSKA, NOWAK, 2012).

Piekoszewska et al. (2010) obteve 7,2-7,8% de arbutina nos brotos secos de *Ruta graveolens* e *Hypericum perforatum* cultivadas *in vitro*. Kwiecien et al. (2013) realizaram a biotransformação de hidroquinona em arbutina em cultura de tecidos vegetais de *Aronia melanocarpa*. A análise quantitativa de arbutina por HPLC indicou quantidades até 8,27 g/100g peso seco.

2.5 Micropropagação e produção de arbutina *in vitro*

As plantas medicinais e aromáticas mantem sua importância na busca de novas e valiosas fontes de drogas e compostos bioativos, fazendo com que a demanda por estas plantas aumente (GHORBANPOUR et al., 2017). Dentre as vantagens da utilização de cultura de tecidos vegetais para a produção de plantas medicinais, citam-se: produção de material de alta qualidade para a indústria farmacêutica (MORAIS et al., 2012) bem como a obtenção de compostos medicinais de interesse (MURTHY et al., 2014).

A propagação *in vitro* ou micropropagação, é uma forma de cultivo que garante a produção e multiplicação rápida do material vegetal em condições assépticas). Estas condições incluem a composição do meio de cultivo (a combinação dos 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) (ERIG, SCHUCH, 2005; GEORGE, HALL, KLERK, 2008).

Diversas pesquisas sobre a micropropagação de espécies medicinais já foram descritas: estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni, Asteraceae) (RAMÍREZ-MOSQUEDA et al., 2017), mil-folhas (*Achillea millefolium* L.) (ALVARENGA et al., 2015), hortelã-da-folha-grossa (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng) (SILVA et al., 2017), e alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae) (LAZZARINI et al., 2019).

A produção de metabólitos secundários por técnicas biotecnológicas tem se tornando familiar pela cultura de tecidos para uso farmacêutico. A biossíntese de metabólitos secundários, como por exemplo compostos fenólicos e flavonoides, depende de condições intrínsecas à espécie, como seu código genético, sendo a resposta fisiológica ao ambiente dependente de cada espécie (LI et al., 2014; TAULAVUORI et al., 2018).

Um dos principais fatores que interferem na micropropagação é a suplementação de reguladores de crescimento, tais como auxinas e citocininas, isolados ou em combinações, para determinar um rápido crescimento de células, acompanhado do desenvolvimento organizado de raízes e parte aérea (BHOJWANI, DANU, 2013; KUMAR, REDDY, 2011). Recentemente a superioridade das Topolinas (um novo grupo de citocininas aromáticas com anel benzílico hidroxilado) em cultura de tecidos vegetais (FAJINMI et al., 2014), tem sido relatado, devido ao alívio de problemas de micropropagação, como anormalidades de brotações e dificuldades na aclimatização *ex vitro* (GENTILE et al., 2017).

A luz (qualidade espectral, fluxo de fótons e fotoperíodo) é um dos fatores que influenciam o crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies de plantas *in vitro*, sendo essencial para vários processos fisiológicos em plantas, como a fotossíntese, influenciando assim o crescimento e desenvolvimento, bem como a morfogênese (BHOJWANI, DANU, 2013). Os diodos emissores de luz (LEDs) tem sido uma fonte de luz alternativa potencial para cultivo *in vitro*, devido à sua especificidade de comprimento de onda (BATISTA et al, 2018; GUPTA, JATOTHU, 2013). Ramírez-Mosqueda et al. (2017) demonstraram que as diferentes luzes de LED produzem um efeito diferencial (positivo ou negativo) no crescimento e desenvolvimento durante a cultura *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

Na micropropagação convencional, a natureza heterotrófica ou fotomixotrófica de crescimento das plantas é, diretamente ou indiretamente, responsável pela maioria dos fatores relacionados ao custo de produção das plantas micropropagadas (KOZAI, KUBOTA, 2001). No cultivo *in vitro* convencional (heterotrófico), utiliza – se um sistema fechado sem trocas gasosas entre o ambiente *in vitro* e *ex vitro*, devido a isso há baixas taxas de transpiração e fotossíntese, restrição de absorção de água e nutrientes, o que reduz a taxa de crescimento do explante (SALDANHA et al., 2012).

O sistema de ventilação natural permite trocas gasosas do recipiente com o exterior, ao mesmo tempo em que mantém um microambiente asséptico. Dessa forma, há um aumento da aeração, redução da umidade relativa, maior sobrevivência na fase de aclimatização e maior produção de fotoassimilados, uma vez que mantém a concentração ideal de CO₂ e melhora a capacidade fotossintética (MOREIRA et al., 2013; SALDANHA et al., 2012).

Outra forma de possibilitar a micropropagação fotoautotrófica seria o cultivo *in vitro* com o emprego de tampas que permitam trocas gasosas, o qual é denominado de sistema de ventilação natural. Saldanha et al. (2012) criaram uma membrana de qualidade com materiais de baixo custo, utilizada em pesquisas recentes no estudo da influência do sistema de cultivo no crescimento e no metabolismo secundário.

O uso das membranas aumenta as trocas gasosas, influenciam o crescimento e o metabolismo secundário de plantas medicinais cultivadas *in vitro*. Larema et al. (2012), avaliaram plântulas de ginseng-brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas sob sistema convencional e sistema de ventilação natural. Os autores observaram maior crescimento e aumento do acúmulo de 20 - hidroxiecdisona quando seu cultivo foi associado à ausência de sacarose no meio de cultura. Silva et al. (2017) observaram que o uso do sistema de ventilação natural com 1 e 2 membranas aumenta a matéria seca de *Plectranthus amboinicus*, ao passo que o uso de 4 membranas aumenta o acúmulo de carvacrol.

Na literatura, existe uma carência de informações sobre a quantificação de arbutina em *Origanum majorana* cultivada *in vitro* e as condições ambientais favoráveis para a micropropagação, seu crescimento *in vitro* e seus respectivos efeitos na biossíntese de compostos fenólicos, como arbutina. Nos últimos anos, pesquisadores têm otimizado as condições de cultivo *in vitro* no geral, produzindo metabólitos por meio da otimização de fatores bióticos e abióticos, como temperatura, umidade, intensidade de luz, meio de cultivo, aeração, etc (LOI et al., 2021). Mostafa et al (2010) quantificou o teor de arbutina em folhas de *Arbutus andrachne* L, cultivadas *in vitro* sob diferentes formulações de meio de cultivo e reguladores de crescimento, obtendo cerca de 0.09% de teor de arbutina. Kwiecień et al. (2017), ao estudarem a biotransformação de diferentes concentrações de hidroquinona em arbutina, via cultura de tecidos de brotos de manjerona, reportaram que o uso de 192 mg/L de hidroquinona foi eficiente para a obtenção de 52,6 mg de arbutina por grama de matéria seca de brotos cultivados em meio líquido sob agitação.

REFERÊNCIAS

- AMOR, G.; CAPUTO, L.; LA STORIA, A.; DE FEO, V.; MAURIELLO, G.; FECHTALI, T. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Artemisia herba-alba* and *Origanum majorana*. **Essential Oils from Morocco Molecules**, v. 24, 402, 2019
- ABDEL-MASSIH, R.; ABRAHAM, A. . "Extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Rheum rhaponticum*, and *Origanum majorana* exhibit significant anti-staphylococcal activity." **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research** v.5, n.3, p. 819, 2014
- AHN, J.; ALFORD, A. R.; NIEMEYER, E. R. Variation in phenolic profiles and antioxidant properties among medicinal and culinary herbs of the Lamiaceae family. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.14, p.1720–1732, 2020
- AL-FATIMI, Y. M. Volatile Constituents, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Aerial Parts of *Origanum majorana* L. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 23, n.4, p. 1-10, 2018
- APPOLLONI, E.; PENNISI, G.; ZAULI, I.; CAROTTI, L.; PAUCEK, I.; QUAINI, S.; ORSINIA, F.; GIANQUINTO, G. Beyond vegetables: effects of indoor LED light on specialized metabolite biosynthesis in medicinal and aromatic plants, edible flowers, and microgreens. **Journal of the Science Food Agriculture**, v.102, p.472–487, 2022
- ASSAF, M. H.; AU, A. A.; MAKBOUL, M. A.; BECK, J. P.; ANTON, R. Preliminary Study of Phenolic Glycosides from *Origanum majorana*; Quantitative Estimation of Arbutin; Cytotoxic Activity of Hydroquinone, **Planta medica**, 1987
- BHALLA, M., R. MITTAL, M. KUMAR AND A. S. KUSHWAH. "Pharmacological Aspects of a Bioactive Compound Arbutin: A Comprehensive Review." **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 13, n. 2, 2022
- BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. **Plant Tissue Culture: An Introductory Text**. Springer ,2013
- BIAN, A. H.; YANGA, Q. C.; LIUA, W. K. Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review. **Journal of the Science Food Agriculture**, v.95, n. 5, p. 869-77, 2014
- BINA, F.; RAHIMI, R. Sweet Marjoram: A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biological Activities. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 22, n. 1, p. 175-185, 2017
- BOUYAHYAA, A.; CHAMKHI, I.; BENALI, T.; GUAOUGUAOU, F. E.; BALAHBIB, A.; OMARI, N.; TAHA, D.; BELMEHDI, O.; GHOKHANI, Z.; MENYIY, N. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. **Journal of Ethnopharmacology** v. 265, 2021

BOO, Y.C. Arbutin as a Skin Depigmenting Agent with Antimelanogenic and Antioxidant Properties **Antioxidants** v.10, p.1129, 2021

BRAGA, V. C. C.; PIANETTI, G. A.; CÉSAR, I. C. Comparative stability of arbutin in *Arctostaphylos uva-ursi* by a new comprehensive stability-indicating HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 6, p.884-891, 2020

CALA, A.; SALCEDO, J.R.; TORRES, A.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; MACÍAS, F.A. A Study on the Phytotoxic Potential of the Seasoning Herb Marjoram (*Origanum majorana* L.). **Leaves. Molecules**. v.26, n. 11, 2021

CHAVES, R. D. S. B., R. L. MARTINS, A. B. L. RODRIGUES, É. D. M. RABELO, A. L. F. FARIAS, L. B. BRANDÃO, L. L. SANTOS, A. K. R. GALARDO AND S. S. M. DA SILVA DE ALMEIDA (2020). "Evaluation of larvicidal potential against larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and of the antimicrobial activity of essential oil obtained from the leaves of *Origanum majorana* L." **PLoS ONE**, v.15, n. 7, 2020.

CHISHTI, S.; KALOO, Z. A.; SULTAN, P. Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 5, n. 10, p. 170-177, 2013

CHARLES, D. J. **Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources**, Springer Science Business. 2013

CHAVES, R. DO S.B., MARTINS, R.L., RODRIGUES, A.B.L., DE MENEZES RABELO, E., FARIAS, A.L.F., ARAÚJO, C.M. DA C.V., SOBRAL, T.F., GALARDO, A.K.R. Larvicidal Evaluation of the *Origanum Majorana* L. Essential Oil against the Larvae of the *Aedes aegypti* Mosquito. **Biorxiv**, v. 15, n. 7, 2019

COUTEAU, C. AND L. COIFFARD. "Overview of skin whitening agents: Drugs and cosmetic products." **Cosmetics** v.3, n.3, 2016

CARVALHO, A. A., S. K. V. BERTOLUCCI, A. D. C. HONORATO, T. T. ROCHA, S. T. SILVA AND J. E. B. P. PINTO . "Influence of light spectra and elicitors on growth and ascaridole content using in vitro cultures of *Dysphania ambrosioides* L." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)** v.143, n. 2, p. 277-290, 2020

EKIERT, INGA KWIECIEŃ, AGNIESZKA SZOPA, BOŻENA MUSZYŃSKA. Possibilities of arbutin production using plant biotechnology method. Halina. **Polish Journal of Cosmetology**. v. 15, n.3, p. 151-162, 2012

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Série de Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Corumbá/MG. 2007

ERENLER, R.; SEN, O.; AKSIT, H.; DEMIRTAS, I.; YAGLIOGLU, A. S.; ELMASTASA, M.; TELCIN, I. Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 96, n.3, p.822-36, 2015

GALLO, F. R.; PAGLIUCA, G.; MULTARI, G.; PANZINI, G.; D'AMORE, E.; ALTIERI, I. New High-performance Liquid Chromatography-DAD Method for Analytical Determination of Arbutin and Hydroquinone in Rat Plasma. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.77, n. 5, p.530-5, 2015

GI, E. V.; SIMAÄ NDI, B.; DAOOD, H. G.; DEAÄ K, A.; SAWINSKY, J. Recovery of Pigments from *Origanum majorana* L. by Extraction with Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 50, p. 2297–2301, 2002

HABIBI, H.; GHAHTAN, N.; KOHANMOO, M.A.; ESKANDARI, F. Chemical Composition and Antibacterial Effect of Medicinal Plants against Some Food-Borne Pathogens. **Research in Molecular Medicine**. v. 5, n. 2, p. 14-21, 2017

HU, Z.M., ZHOU, Q., LEI, T.C., DING, S.F., XU, S.Z. Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: biosafety as skin whitening agents. **Journal Dermatology Science**. v. 55, p.179–184, 2009

INOUE, Y.; HASEGAWA, S.; YAMADA, T.; DATE, Y.; MIZUTANI, H.; NAKATA, S. Analysis of the Effects of Hydroquinone and Arbutin on the Differentiation of Melanocytes. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. v. 36, n. 11, p. 1722– 30, 2013

KIM, T. J.; PARK, Y. J.; PARK, S. U.; HA, S. H.; KIM, J. K. Determination and quantification of arbutin in plants using stable isotope dilution liquid chromatography–mass spectrometry. **Applied Biological Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 523–530, 2018

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation–environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, n. 1, p. 188-204, 2010.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. **Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants**. Journal of Plant Research, v. 114, n. 4, p. 525-537, 2001

KUMAR, N & REDDY, M. P. In vitro Plant Propagation: A Review. **Journal of Forest Science**. v. 27, n. 2, pp. 61-72, 2011

KWIECIEN, I.; SZOPA, A.; MADEJ, K.; EKIERT, H. Arbutin production via biotransformation of hydroquinone in in vitro cultures of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. **Acta Biochemistry Polonica**, v. 60, p. 865–870, 2013

LAMIEN-MEDA, A.; LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; FRANZ, C.; NOVAK, J. Validation of a quantitative assay of arbutin using gas chromatography in *Origanum majorana* and *Arctostaphylos uva-ursi* extracts. **Phytochemical Analysis**. v. 77, n. 5, p.530-535, 2009

LEMMA, D. T.; BANJAW, D. T.; MEGERSA, H. G. Micropropagation of Medicinal Plants: Review. **International Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 7, n. 2, pp. 796-802, 2020.

LIANG, C. H.; CHOU, T. H.; DING, H. Y. Inhibition of melanogenesis by a novel origanoside from *Origanum vulgare*. **Journal Dermatological Science**, v.57, n. 3, p. 170–7, 2010

- LIM, Y.J., LEE, E.H., KANG, T.H., HA, S.K., OH, M.S., KIM, S.M., YOON, T.J., KANG, C., PARK, J. H., KIM, S.Y. Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of α -melanocyte stimulating hormone-induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tissues. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, p. 367–373, 2009
- LOI, M.; VILLANI, A.; PACIOLLA, F.; MULÈ, G.; PACIOLLA, C. Challenges and Opportunities of Light-Emitting Diode (LED) as Key to Modulate Antioxidant Compounds in Plants. A Review. **Antioxidants**, v.10, n. 42, 2021
- LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; MITTEREGGER, U.; NOVAK, J. Arbutin in marjoram and oregano. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p.185–90, 2010
- MAKRANE, H.; EL MESSAOUDI, M.; MELHAOUI, A.; EL MZIBRI, M.; BENBACER, L.; AZIZ, M. Cytotoxicity of the Aqueous Extract and Organic Fractions from *Origanum majorana* on Human Breast Cell Line MDA-MB-231 and Human Colon Cell Line HT-29. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2018, 9pp, 2018
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96-103. 2007
- MÉABEDA, E. M. H.; EL- SAYEDB, N. M.; ABOU-SREEAC, A. I. B.; ROBY, M. H. H. Chemical analysis of aqueous extracts of *Origanum majorana* and *Foeniculum vulgare* and their efficacy on Blastocystis spp. Cysts. **Phytochemistry**, v. 43, p. 158–163, 2018
- MIGAS, P. AND M. KRAUZE-BARANOWSKA. "The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics." **Phytochemistry Letters**, v.13, p. 35-40, 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 Mediciniais**, v.14, n.1, p.110-121, 2012
- MOREIRA, A. L.; SILVA, A. B. D.; SANTOS, A.; REIS, C. O. D.; LANDGRAF, P. R. C. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.
- MOSTAFA, S. E.; KARAM, S.N.; SHIBILI, R. A.; ALALI, F.Q. Micropropagation and production of arbutin in oriental strawberry tree. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 103, p.111-121, 2010
- MUQADDAS, R. A. K.; NADEEM, F.; JILANI, M. I. Essential Chemical Constituents and Medicinal Uses of Marjoram (*Origanum majorana* L.) – A Comprehensive Review. **International Journal of Chemical and Biochemical Science**. v. 9, p. 56-62, 2016
- NAGHIBI, F.; MOSADDEGH, M.; MOTAMED, S. M.; GHORBANI, A. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from. **Ethnobotany to Pharmacology Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 63-79, 2005
- PIEKOSZEWSKA, A.; EKIERT, H.; ZUBEK, S. Arbutin production in *Ruta graveolens* L. and *Hypericum perforatum* L. in vitro cultures. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 223–229, 2010

PRERNA & VASUDEVA, N. *Origanum majorana* L. -Phyto-pharmacological review. **Indian Journal of Natural Products and Resources** v. 6, n. 4, p 261-267, 2015

RAINA, A. P.; NEGI, K. S. ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF *Origanum majorana* AND *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* GROWING IN INDIA. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, p.1015–1017, 2012

RYCHLIŃSKA, I. & NOWAK, S. Quantitative Determination of Arbutin and Hydroquinone in Different Plant Materials by HPLC. **Nototulae Bototanicae Horti Agrobotanic**, v. 40, n. 2, p. 109-113, 2012

SAEEDI, M., K. KHEZRI, A. SEYED ZAKARYAEI AND H. MOHAMMADAMINI. "A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin." **Phytotherapy Research**, v. 35, n.8, p. 4136-4154, 2021

SANDHYA, D., P. JOGAM, M. MANOKARI, M. S. SHEKHAWAT, J. S. JADAUN, V. R. ALLINI AND S. ABBAGANI. "High-frequency in vitro propagation and assessment of genetic uniformity and micro-morphological characterization of *Origanum majorana* L. –A highly traded aromatic herb." **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34. 2021

SEYFIZADEH, N., MAHJOUR, S., ZABIHI, E., MOGHADAMNIA, A., POURAMIR, M., MIR, H., KHOSRAVIFARSANI, M., ELAHIMANESH, F. Cytoprotective effects of arbutin against tert-butyl hydroperoxid induced toxicity in hep-G2 cell line. **World Applied Science Journal**. v. 19, p. 163–167, 2012

SKRZYPCZAK-PIETRASZEK, E., I. KWIECIEŃ, A. GOŁDYN AND J. PIETRASZEK . "HPLC-DAD analysis of arbutin produced from hydroquinone in a biotransformation process in *Origanum majorana* L. shoot culture." **Phytochemistry Letters**, v. 20, p. 443-448, 2017

SOLIMAN, F. M., M. F. YOUSIF, S. S. ZAGHLOUL AND M. M. OKBA . "Seasonal variation in the essential oil composition of *Origanum majorana* L. cultivated in Egypt." **Journal of Biosciences**, v.64, n. 9-10, p 611-614, 2009

SOUZA, J. M., CARGNELUTTI FILHO, A., CARINI, F., DA COSTA, S. L., HEINZMANN, B. M., & RODRIGUES, P. Seasons influence on content, yield and chemical composition of *Origanum majorana* L. essential oil. **Comunicata Scientiae**, v.12, 2021

SOUZA, J. M. D., A. CARGNELUTTI FILHO, D. L. SILVEIRA, D. B. ULIANA, M. V. LOREGIAN, G. E. DUMKE AND M. A. G. WESCHENFELDER. "Fitomassa de manjerona em intervalos de colheita em transplantes no verão e no inverno." **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.56, 2021

TAHA, M.M.E.; SALGA, M.S.; ALI, H.M.; ABDULLA, M.A.; ABDELWAHAB, S.I.; HADI, A.H.A. Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited: role of arbutin. **Journal Ethnopharmacology**. v. 141, p. 273–281. 2012

TRIVELLINI, A.; LUCCHESINI, M.; MAGGINI, R.; MOSADEGHA, H.; VILLAMARIN, T. S. S.; VERNIERI, P.; MENSUALI-SODI, A.; PARDOSSI, A. Lamiaceae phenols as

multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 241–254, 2016

TRIPATHY, B.; ET MAEDA, K.; FUKUDA, M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences**, v.5, n. 4, p. 1717-23 1717. 2017

TRIPATHY, B.; SATYANARAYANA, S.; KHAN, K. A.; RAJA, K. An Updated Review on Traditional Uses, Taxonomy, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Origanum majorana*. **International Journal Pharma Res Health Science**. v. 5, n. 4, p. 1717-2, 2017

ZHAO, F.; CHEN, Y. P.; SALMAKI, Y.; DREW, B. T.; WILSON, T. C.; SCHEEN, A. C.; CELEP, F.; BRÄUCHLER, C.; BENDIKSBY, B.; WANG, Q.; MIN, D. Z.; PENG, H.; OLMSTEAD, R. G.; LI, B.; XIANG, C. L. An updated tribal classification of Lamiaceae based on plastome phylogenomics. **BMC Biology**. v.19, n.2, 2021

ZHU, W. AND J. GAO. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, Elsevier**. v. 13, n. 1, p. 20-4, 2008

ZIECH, A. R. D., M. C. DE OLIVEIRA, M. F. ZIECH AND D. JUNGBLUTH. "Época de coleta e tamanho de estacas apicais na propagação vegetativa de *Origanum majorana* L." **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, 2020

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - 6-BENZILAMINOPURINA E META-TOPOLIN NO ESTABELECIMENTO, PROLIFERAÇÃO DE BROTAÇÕES E ACÚMULO DE ARBUTINA EM *Origanum majorana in vitro*

(VERSÃO PRELIMINAR)

**Artigo preparado de acordo com as normas do Research, Society and Development
Journal**

RESUMO

A manjerona-doce (*Origanum majorana* L.) é uma espécie vegetal rica em arbutina uma substância de interesse medicinal e cosmético. No entanto protocolos de micropropagação de plantas usando diferentes concentrações de sais e reguladores de crescimento têm sido descritos em espécies de plantas medicinais. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi realizar o estabelecimento e propagação de plantas de *O. majorana* L. *in vitro* através de diferentes meios de cultura, tipo de explantes e reguladores e suas interações, assim como a quantificação de arbutina. Foram realizados experimentos de estabelecimento, indução e proliferação de brotos, enraizamento. No experimento de estabelecimento, segmentos nodais e apicais foram cultivados em meios MS, MS/2 e MS/4. Para indução e proliferação de brotos axilares, explantes foram cultivados em meio MS suplementado com BAP e meta-topolin, com cinco concentrações (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) isoladamente e em combinação com ANA (0 e 0,25 mg L⁻¹). No enraizamento foram testados os meios MS/2 e MS/4, suplementados, isoladamente com diferentes concentrações de ANA e AIB (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹). A quantificação da arbutina por CLAE foi realizada em amostras de folhas proveniente do experimento de proliferação de brotos. Após 40 dias, foi avaliado o crescimento e acúmulo de arbutina. As plantas cultivadas em meio MS a partir do explante apical apresentaram maiores valores de crescimento e a indução de brotos foi afetada positivamente pelo BAP e TOP, com maior número de brotos em meio MS com 2,0 mg L⁻¹ de BAP. Maior percentual de enraizamento ocorreu em meio MS/2 suplementado com AIB. O acúmulo de Arbutina em folhas de manjerona foi inibida pela presença de BAP. O crescimento *in vitro* e acúmulo de arbutina da manjerona foi favorecido pelo cultivo em meio MS suplementado com meta-topolim.

Palavras-chave: Meios de cultura. Reguladores de crescimento. Manjerona. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) is a plant species rich in arbutin, a substance of medicinal and cosmetic interest. However, plant micropropagation protocols using different concentrations of salts and growth regulators have been described in medicinal plant species. Therefore, the objective of this work was to carry out the establishment and propagation of *O. majorana* L. plants *in vitro* through different culture media, type of explants and regulators and their interactions, as well as the quantification of arbutin. Experiments were carried out on establishment, induction and proliferation of shoots, rooting. In the establishment experiment, nodal and apical segments were cultured in MS, MS/2 and MS/4 media. For induction and proliferation of axillary shoots, explants were cultured in MS medium supplemented with BAP and meta-topolin, with five concentrations (0; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mg L⁻¹) alone and in combination with ANA (0 and 0.25 mg L⁻¹). For rooting, MS/2 and MS/4 media were tested, supplemented separately with different concentrations of ANA and IBA (0; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 mg L⁻¹). Quantification of arbutin by HPLC was carried out in leaf samples from the bud proliferation experiment. After 40 days, the growth and accumulation of arbutin was evaluated. Plants grown in MS medium from the apical explant showed higher growth values and shoot induction was positively affected by BAP and TOP, with a greater number of shoots in MS medium with 2.0 mg L⁻¹ of BAP. Higher percentage of rooting occurred in MS/2 medium supplemented with IBA. Arbutin accumulation in marjoram leaves was inhibited by the presence of BAP. The *in vitro* growth and arbutin accumulation of marjoram was favored by cultivation in MS medium supplemented with meta-topolym.

Keywords: Culture media. Growth regulators. Marjoram. *In vitro* culture.

1. INTRODUÇÃO

A manjerona-doce (*Origanum majorana* L.) é uma planta herbácea e aromática pertencente à família Lamiaceae (syn. *Majorana hortensis* Moench). Nativa da região mediterrânea é cultivada em muitos países da Ásia, Norte da África e Europa (BINA, RAHIMI, 2016; MÉABED et al., 2018; MUQADDAS et al., 2016; TRIPATHY et al., 2017). A espécie é rica em fitoquímicos, como timol, carvacrol, taninos, hidroquinona, arbutina, limoneno, terpineno, canfeno e flavonoides (BOUYAHYA et al.; 2021; MÉABED et al.; 2018;).

Contudo, como forma de cultivar e garantir a produção e multiplicação rápida do material vegetal, sob condições controladas de fatores ambientais e nutricionais podem-se utilizar técnicas de propagação *in vitro* ou micropropagação (GEORGE et al., 2008). Isso porque meios de cultivo fornecem nutrientes, os quais regulam o crescimento e a morfologia dos tecidos vegetais. Os meios de cultivo MS (MURASHIGE E SKOOG 1962) e B5 (GAMBORG et al. 1968) têm sido descritos como os mais utilizados no estabelecimento *in vitro* para diversas espécies vegetais. No entanto, estes meios não têm sido adequados em todas as aplicações *in vitro* (CALDAS et al., 1998; RAMAGE e WILLIANS 2002).

Na fase de estabelecimento *in vitro* de explantes, a adição de reguladores de crescimento, principalmente auxinas e citocininas, com principal objetivo suprir as possíveis deficiências endógenas de hormônios no explante (GEORGE et al., 2008). A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) comumente utilizada no cultivo *in vitro* devido a sua eficácia e acessibilidade apresenta efeitos adversos como sobre o crescimento, enraizamento e aclimatação de algumas (AREMU et al. 2012). Contrariamente, as topolinas (novo grupo de citocininas aromáticas com anel benzílico hidroxilado) tem sido descritas como mais eficiente para indução de brotos, sem desvantagens *in vitro*, devido ao seu poder em retardar a senescência, aumentando o conteúdo de pigmentos fotossintéticos *in vitro*, bem como modulando as atividades das enzimas antioxidantes (FAJINMI et al., 2014; GENTILE et al., 2017).

A propagação *in vitro* de *O. majorana*, tem sido explorada por estudos científicos (HUSSEIN et al, 2014; SANDHYA et al, 2021). Porém, nenhum deles avaliaram o uso de topolinas. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi estabelecer condições de cultivo *in vitro* que proporcionem melhor desenvolvimento de plantas de *O. majorana* L. através de diferentes meios de cultura, tipo de explantes e através da presença de diferentes tipos reguladores, assim como a quantificação de arbutina.

2. MATERIAL DE MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. A exsicata de *Origanum majorana* L. foi depositada no herbário PAMG, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais sob o registro nº 58898. As plantas matrizes foram cultivadas no Horto Medicinal da UFLA.

2.1 Estabelecimento *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro*, foram utilizados como explantes segmentos nodais (± 1 cm de comprimento) de plantas matrizes de *O. majorana* L. Os explantes foram lavados com detergente e mantidos em água corrente. Em seguida, foi realizada a desinfestação com água sanitária a 50 % v/v por 15 min e tríplice lavagem com água deionizada esterilizada.

Posteriormente, foi feita a retirada de folhas e inoculação dos segmentos nodais com aproximadamente 1 cm em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 6,0 g L⁻¹ de ágar, suplementado com 30 g de sacarose e pH ajustado para 5,7 \pm 0,1.

Segmentos nodais e apicais contendo um par de folhas foram excisados de plantas cultivadas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultivo, sendo utilizado os meios MS, MS/2 e MS/4. Cada meio de cultivo foi suplementado com 30 g sacarose, 6,0 g L⁻¹ ágar (Himedia®, tipo I) e pH ajustado para 5,7 \pm 0,1.

Posteriormente, os tubos de ensaio com os meios de cultivo foram autoclavados à 125°C e 1,2 atm de pressão por 20 min. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16h, temperatura de 25 \pm 1°C e irradiância de 32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida artificialmente por lâmpadas de LED (diodos emissores de luz).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x3 (dois tipos de explantes e três concentrações de meio de cultivo). Cada tratamento foi representado por 7 repetições com 3 plantas por repetição, totalizando 21 tubos de ensaios por tratamento

Após 40 dias de cultivo foi avaliado o comprimento médio da parte aerea e matéria seca das folhas e do caule.

2.2 Indução de brotos axilares

Segmentos nodais (± 1 cm de comprimento) foram excisados de plantas cultivadas *in vitro* e inoculados verticalmente, sob fluxo laminar asséptico, em tubos de ensaio (20x150 mm)

contendo 15 mL de meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®], tipo I) e pH ajustado para 5,7±0,1.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 (dois reguladores e cinco concentrações), sendo testados os reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e meta-topolin [6- (3-hidroxibenzilamino) purina] nas concentrações 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹. Cada regulador de crescimento foi testado individualmente, e os tratamentos foram constituídos por 4 repetições com 5 plantas por repetição, totalizando 180 tubos de ensaio. Após 30 dias de cultivo, foi observado o número de brotos.

2.3 Proliferação de brotações

Aglomerados de brotos axilares, provenientes do experimento indução de brotos, foram sub-cultivados em frascos contendo 50 mL de meio MS, suplementado com 50 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 25 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 25 mg L⁻¹ de arginina, 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®], tipo I) e pH ajustado para 5,7 ± 0,1.

A base dos explantes foram cortadas em aproximadamente 2 mm antes da inoculação no meio de proliferação de brotações. Os reguladores de crescimento utilizados foram BAP e meta-topolin nas concentrações 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ em combinação com ANA (0 e 0,25 mg L⁻¹) com 5 repetições com um frasco por repetição, sendo 4 brotos por frasco. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 (dois reguladores e cinco concentrações)

No entanto, no experimento foram analisados apenas 3 frascos por tratamento, sendo a avaliação composta por 3 repetições e cada repetição constituída de um frasco contendo 4 plantas, totalizando 27 frascos e 108 explantes. Os demais frascos (2) foram separados e as plantas utilizadas no experimento de enraizamento de brotos.

2.4 Indução de enraizamento

As brotações provenientes da proliferação de brotos foram inoculadas em frascos contendo 50 mL dos meios MS/2 e MS/4, suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®], tipo I) e pH ajustado para 5,7±0,1. Os reguladores de crescimento ANA e AIB foram testados separadamente nas concentrações 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹, com 3 repetições e um frasco por repetição contendo 4 brotações, totalizando 12 plantas por tratamento.

2.5 Análise de crescimento

Aos 40 dias, as plantas foram avaliadas quanto ao comprimento de parte aérea (CPA) em cm, número de brotos (NB) e matéria secas de folha (MSF), caule (MSC) e parte aérea (MSPA) em mg. Em seguida, o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel kraft e levados à estufa de circulação forçada de ar à 50°C, até peso constante (aproximadamente 72h). Posteriormente, a matéria secas foram mensuradas em balança de precisão.

2.6. Análises qualitativas e quantitativas da arbutina

2.6.2. Preparo das amostras

O preparo das amostras foi baseado no método descrito em Rychlinska e Nowak (2012). Em suma, alíquotas de 50 mg de folhas secas de *Origanum majorana* provenientes de experimentos *in vitro* foram pulverizadas em almofariz. Em seguida o material vegetal foi sonificado (3 × 15 min), empregando em cada ciclo 3 mL de metanol MeOH e H₂O (1:1). Os extratos foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório, a 40 °C, sob pressão reduzida. O resíduo foi ressuspendido em 1mL de água ultrapura, transferido para microtubo, sonificado por 2 minutos e, em seguida, centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi injetado automaticamente no cromatógrafo.

2.6.3 Preparo da solução de referência de arbutina (ARB)

Foram preparadas duas soluções de referência de arbutina. Inicialmente, preparou-se uma solução aquosa na concentração de 2 mg/mL. Em seguida, por diluição da primeira foi preparada outra solução na concentração de 1 mg/mL.

2.6.4 Condição cromatográfica por CLAE - DAD

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foram realizados em um sistema de cromatografia líquida Agilent 1200 (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha) equipado com uma bomba quaternária (G1311A) com sistema desgaseificador (G13222A), amostrador automático ALS (G1322A) e conjunto aquecedor TCC (G1316A). Utilizou-se um detector de ultravioleta de comprimento

de onda variável (G1315D), para obter-se cromatogramas a 220 nm. O equipamento foi controlado pelo software OpenLAB versão A07.04, build 04.07.28.

As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa C18 (Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies®, EUA) com um empacotamento à base de sílica (150 mm × 4,6 mm d.i., 5 µm) e pré-coluna (12,5 mm × 4,6 mm D.I., 5 µm). Um volume de 10 µL das amostras foi injetado na coluna com temperatura mantida a 25°C e uma taxa de fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. Utilizou-se água ultrapura (A) e metanol (B) como eluentes.

O programa de eluição foi o seguinte: 10% B em condição isocrática de 0-5 min, seguido de gradiente linear até 95% B por 5 min, mantendo-se em condição isocrática por mais 5 min, retornando a condição inicial em gradiente linear reverso por 5 min, totalizando 20 minutos de análise. Cada corrida foi seguida por um período de equilíbrio de 10 min.

2.6.5 Caracterização da presença da Arbutina nas amostras

A caracterização da presença de arbutina nas amostras foi realizada por perfis cromatográficos por CCD e CLAE-DAD. As análises por CCD empregaram placas de sílica gel 60G, 10x10 cm, preparadas manualmente. Alíquotas de 10 µL da amostra e de solução de referência de arbutina (1 mg/mL) foram aplicadas nas placas que foram eluídas com uma mistura de acetato de etila, metanol e água (70:20:10). Após a secagem da placa, esta foi nebulizada com uma solução de anisaldeído sulfúrico, seguida de aquecimento.

Perfis cromatográficos por CLAE-DAD também foram obtidos nas condições descritas no item 2.6.4. A caracterização da presença de arbutina foi realizada por comparação dos tempos de retenção da amostra e substância de referência analisadas nas mesmas condições, co-injeção com a substância de referência e pela homogeneidade espectral do pico da arbutina na amostra comparado ao da substância de referência a 220 nm.

2.6.6. Quantificação da Arbutina

A quantificação da arbutina foi feita a partir do método de padronização externa (Ribani et al., 2004). Para a construção da curva analítica de arbutina, visando avaliar a linearidade do método, fez-se necessário estimar inicialmente a faixa de concentração dessa substância no extrato de folhas secas de *Origanum majorana*. As estimativas foram baseadas nas áreas relativas do pico correspondente a arbutina nas amostras e a partir de uma solução de referência com concentração de 1 mg/mL. As amostras analisadas foram provenientes de plântulas cultivadas *in vitro* em ensaios preliminares.

A linearidade do método foi determinada a partir de duas curvas analíticas utilizando-se cinco concentrações distintas. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de diferentes alíquotas das soluções de referência (2mg/L e 1mg/mL - item 2.6.3), na faixa de 2 a 10 μ L, como indicado na tabela 1. As curvas analíticas foram determinadas em relação a massa injetada de arbutina.

Os dados obtidos para cada curva de calibração foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (R^2) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos dois dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de covariância ($p < 0,05$) no *software Graph Pad Prism* 6. Os teores de Arbutina foram expressos em mg por grama de planta (mg g^{-1})

Tabela 1. Correspondência entre volumes e as massas injetadas para a construção das curvas analíticas de arbutina (ARB). Lavras, UFLA, 2022.

Volume de injeção (μL)	Massa de injeção (μg)
Solução 1 (2mg/ml)	
8	16
Solução 2 (1mg/ml)	
10	10
6	6
4	4
2	2

Fonte: Da autora (2022)

a) Limite de quantificação e detecção

Os limites de quantificação e detecção foram calculados conforme a RDC 166 (BRASIL, 2017). O limite de quantificação foi calculado a partir da equação que emprega os parâmetros da curva analítica:

$$LQ = 10 \sigma/IC$$

Onde: LQ = limite de quantificação; σ : desvio padrão do intercepto da curva de regressão; IC= inclinação da curva analítica.

O limite de detecção foi calculado a partir dos dados da curva analítica, utilizando-se a seguinte equação:

$$LD = 3,3 \sigma / IC$$

Onde: LD = limite de detecção; σ = desvio padrão do intercepto da curva de regressão; IC=inclinação da curva analítica.

2.7 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade, utilizando-se o *software* estatístico SISVAR (Ferreira, 2011)

2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estabelecimento *in vitro*

A concentração de sais do meio de cultivo e o tipo de explante influenciaram significativamente ($p \leq 0,05$) o crescimento *in vitro* de *Origanum majorana* (Figura 1). De modo geral, as plantas cultivadas em meio MS e com explante apical apresentaram melhores resultados de crescimento, mostrando redução nos valores das variáveis de crescimento com a diminuição da concentração de sais do meio de cultivo (Figura 1).

Figura 1. Crescimento de segmentos apicais e nodais de *Origanum majorana* L. cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de sais do meio de cultura MS, MS/2 e MS/4 aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022.

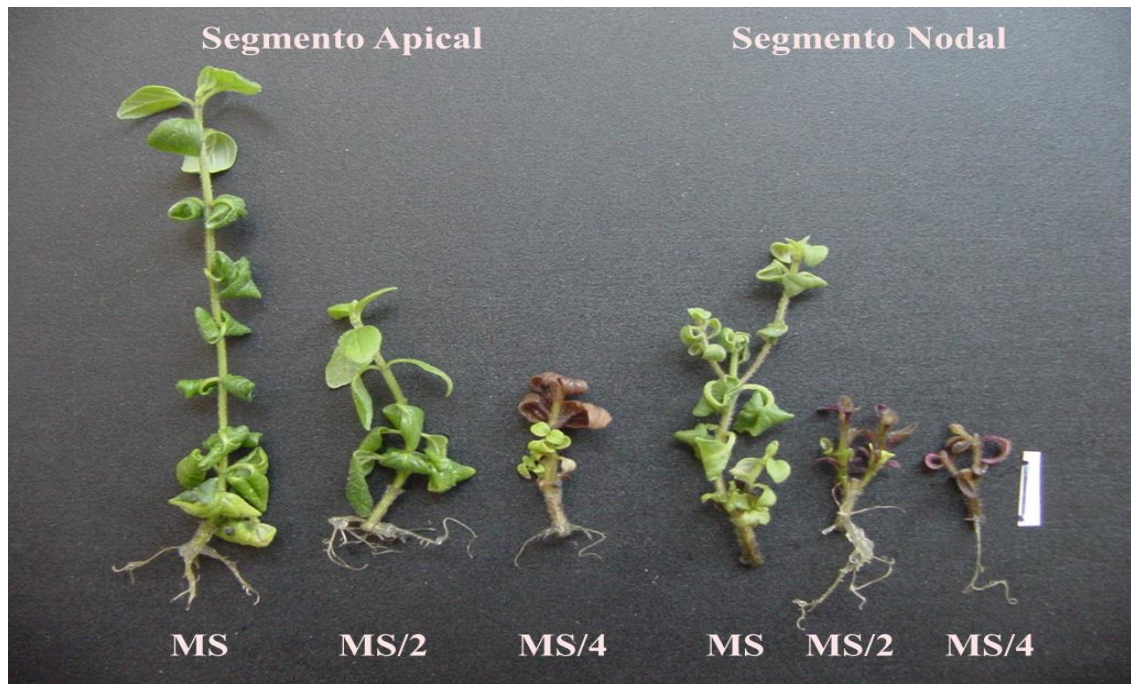


Foto do autor (2021)

Além disso, a concentração do meio e o tipo de explante influenciaram o comprimento da parte aérea, massas secas de folha, caule e parte aérea, e efeito reduzido na formação de raízes (dados não apresentados). No cultivo *in vitro* de explantes de *O. majorana* em meio MS (100% de sais) foi observado maior comprimento da parte aérea (5,9 cm e 3,0 cm) e massas secas que os demais meios MS/2 e MS/4 (50% e 25% de sais) (Figura 2). Estes resultados indicaram que *O. majorana* é uma espécie sensível a baixas concentrações de sais no cultivo *in vitro*.

Na literatura é relatado por diversos autores que com o aumento da concentração dos sais ocorreram aumento do comprimento da parte aérea e da massa seca. Rezali et al. (2017), por exemplo, trabalharam com *Typhonium flagelliforme* e observaram melhores resultados em explantes cultivados em meio MS, e puderam observar incremento no número de brotos, comprimento da parte aérea e massa seca. Já Fadel et al. (2010) observaram aumento do comprimento da parte aérea de *Mentha spicata* em meio MS/2 em comparação com o MS, realçando que cada espécie possui características únicas, determinadas por fatores genéticos e fisiológicos; portanto, as condições para o cultivo *in vitro* são diferenciadas.

No presente estudo, o meio MS/4 e o explante nodal apresentaram menores comprimento da parte aérea (0,4 cm), matéria seca de folha ($4,0 \text{ mg planta}^{-1}$) e matéria seca de parte aérea ($10,7 \text{ mg planta}^{-1}$). Vale ressaltar que o suprimento de nutrientes minerais no meio

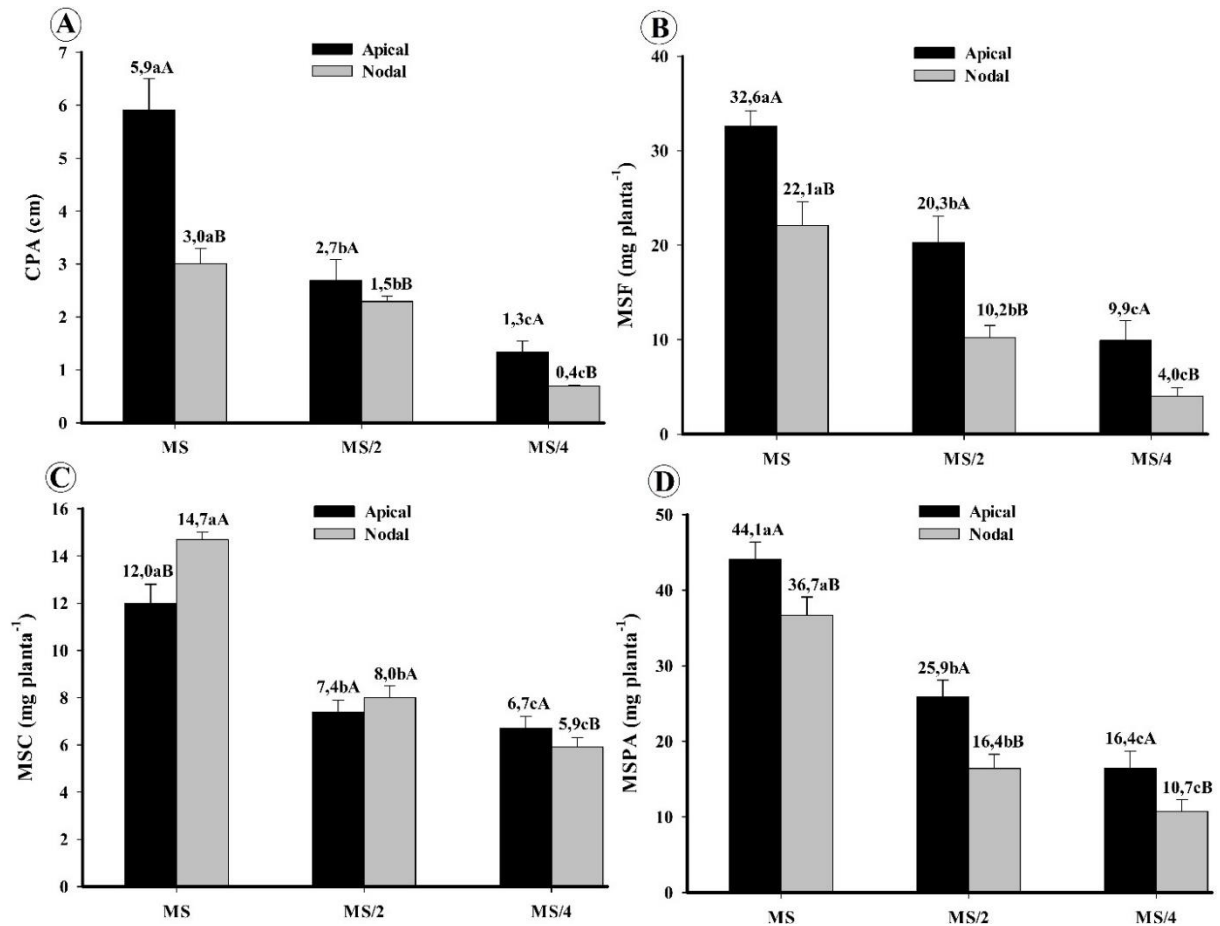
de cultura varia conforme a espécie vegetal estudada, bem como o processo de cultivo (KUMAR, REDDY, 2011; PHILLIPS e GARDA, 2019).

As plantas desenvolvidas a partir de segmentos apicais em meio MS apresentaram maiores comprimento da parte aérea (5,9cm) (Figura 2) e maiores matéria seca de folha (32,6 mg planta⁻¹) e parte aérea (44,1 mg planta⁻¹), com exceção da matéria seca de caule (12,0 mg planta⁻¹). E isso pode ter ocorrido pelo fato de os segmentos apicais estarem sob efeito da dominância apical, enquanto que nos segmentos nodais a alteração no balanço auxina/citocinina foi necessária para estimular o desenvolvimento das plantas. (BHOJWANI , DANTU, 2013; KUMAR, REDDY, 2011; PHILLIPS, GARDA, 2019)

Já o segmento nodal apresentou menores valores em todas variáveis analisadas, com exceção da matéria seca de caule (14,3 mg planta⁻¹). Este fato pode ser devido as brotações axilares regenerarem dos segmentos nodais. Resultados similares foram descritos por Lattuada et al. (2019) que observaram efeito significativo nas brotações formadas em plantas de orégano (*Origanum vulgare*) e hortelã (*Mentha piperita*) cultivadas a partir de segmentos nodais.

Em plantas de *Mentha arvensis* cultivadas *in vitro*, o segmento apical promoveu maior comprimento de parte aérea em relação aos segmentos nodais (ROSSI et al.; 2012). O tipo de explante utilizado na propagação *in vitro* apresenta grande importância devido à concentração endógena de fitohormônio presente nos tecidos. Kara e Baydar (2012) observaram em Lavanda (*Lavandula* sp.) cultivada *in vitro* maiores comprimentos de parte aérea de plantas cultivadas a partir de segmentos apicais quando comparado com segmentos nodais. E esses resultados corroboram com os observados no presente estudo. Contrariamente em plantas de *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro*, o segmento nodal promoveu maiores altura, massa seca, número de raízes e taxa de multiplicação (NICOLOSO e ERIG, 2002).

Figura 2. Comprimento da parte aérea (CPA), massas secas de folhas (MSF), caule (MSC) e parte aérea (MSPA) de plantas de *Origanum majorana* L. cultivadas *in vitro* a partir de segmentos nodais e apicais em meios MS, MS/2 e MS/4 aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022.

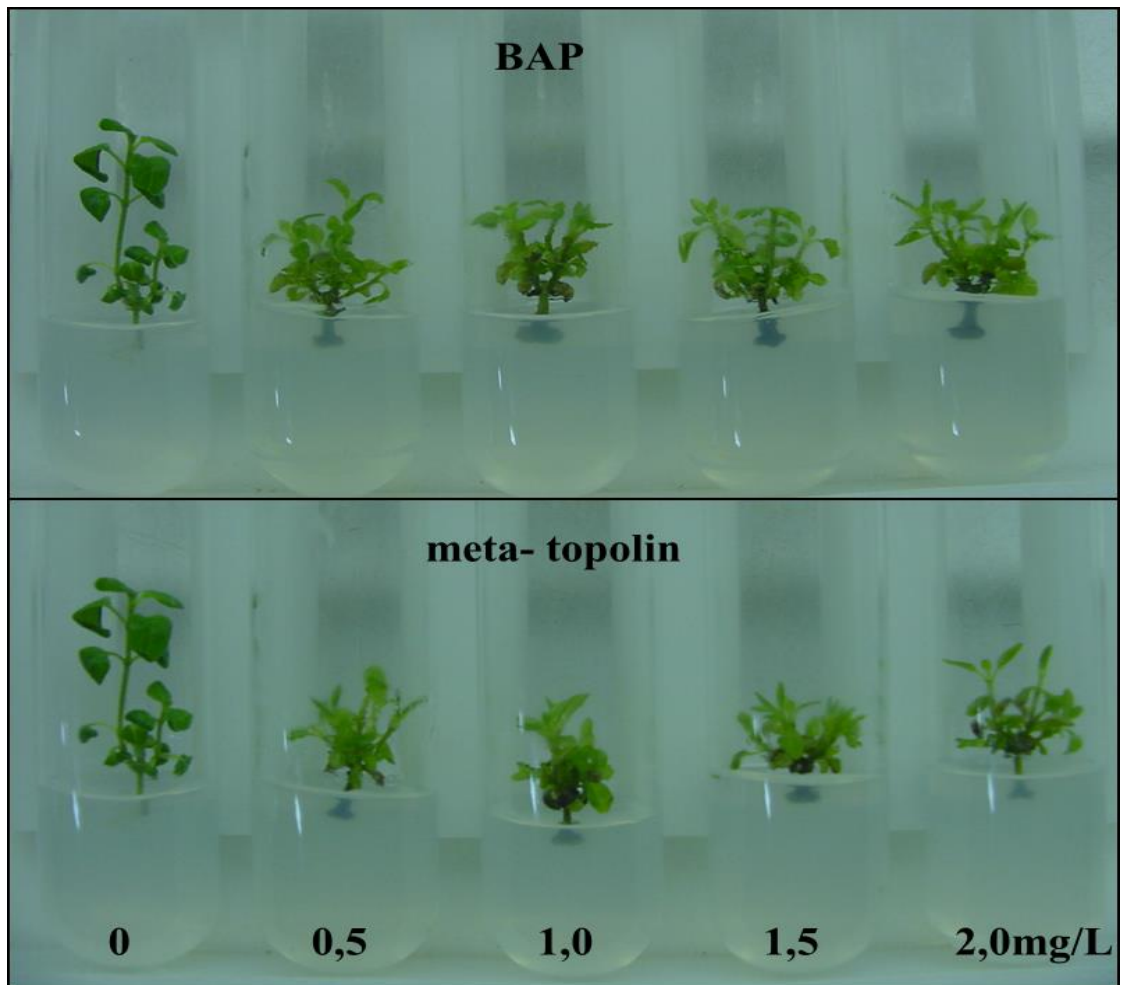


Médias seguidas da mesma letra minúscula em cada meio de cultivo e mesma letra maiúscula entre o tipo de segmentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

2.7 Indução de brotos axilares

O BAP e a meta-topolin apresentaram efeito significativo no processo de indução de brotos axilares de *O. majorana* (Figura 3). As diferentes concentrações de BAP tiveram efeito significativo no processo de indução de brotos axilares, onde o explante apresentou crescente número de brotações com o aumento das concentrações, sem que ocorresse a formação de raiz.

Figura 3. Plantas de *O. manjerona* L. oriundas de segmentos nodais cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de BAP e meta-topolin testados isoladamente, aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022

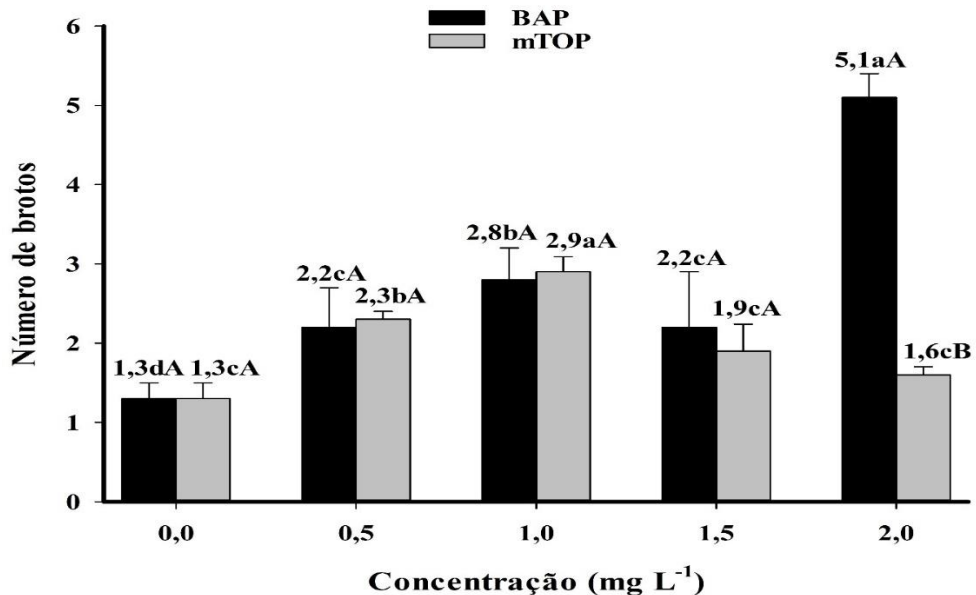


De modo geral, os maiores valores foram observados em explantes cultivados em meio de cultivo contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (5,1 brotos por explante) (Figura 4). Fallah et al. (2019) observaram aumento no número de brotos (média de 3,4 por explante) produzidos em explantes de *Zhumeria majdae* cultivadas em meio suplementado com diferentes concentrações de BAP. Contudo, menor número de brotos axilares foram observados em explantes cultivados em meio suplementado com meta-topolin em todas concentrações, sem ocorrer diferenças significativas entre as concentrações de BAP, a exceção da concentração $2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Na literatura, alguns trabalhos elucidam o efeito positivo do meta-topolin no processo de micropropagação *in vitro*. Bairu et al. (2007) observaram maiores taxa de multiplicação e enraizamento, bem como problemas de hiperidricidade no cultivo de *Aloe polyphylla* com uso de meta-topolin. Da mesma forma, Moyo et al. (2011) e Wojtania (2010) verificaram a

eficiência do meta-topolin na micropropagação de *Sclerocarya birrea* e papel importante desse regulador de crescimento na morfogênese de *Pelargonium* sp.

Figura 4. Indução de brotações axilares em explante de *Origanum majorana* L. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes concentrações de BAP e meta-topolin aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022.



Médias seguidas da mesma letra minúscula em cada concentração e regulador testado isoladamente e a mesma letra maiúscula entre cada regulador não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Grzegorzcyk-Karolak et al. (2020) observaram em plantas de *Salvia viridis* cultivadas em meio MS contendo diferentes tipos de citocininas (BAP, BAP ribosídeo, zeatina, meta-topolin). No entanto, evidenciou maior número de brotos por explante, assim como aumento da massa com o uso de 1 mg L⁻¹ meta-topolin. Resultados similares também foram obtidos por Bairu et al. (2007) no cultivo de *Aloe polyphylla* cultivadas com meta-topolin. Em forma em cultivo *in vitro* de *Ocimum basilicum*, KŐSZEGHI et al. (2014) observaram que a concentração 0,5 mg L⁻¹ de meta-topolin possibilitou melhor indução de brotos quando comparada a 1,0 mg L⁻¹ de BAP. No entanto, vale ressaltar que os autores mencionaram que tanto meta-topolin como BAP não apresentaram efeito no processo de emissão de raízes, fenômeno também observado no presente trabalho.

3.3 Proliferação de brotações

Influência significativamente na combinação de auxina e citocininas foi observada na proliferação de brotações *in vitro* de *O. majorana* (Figuras 5 e 6). Contudo, houve efeito

inibidor na mesma concentração para o comprimento da parte aérea, observando-se um declínio no comprimento da parte aérea em maiores concentrações.

O número de brotações aumentou de acordo com aumento da concentração dos reguladores de crescimento. A concentração de 2 mg L⁻¹ de BAP e meta-topolin possibilitam a obtenção de, respectivamente, 18,7 e 13,0 brotações por explante (Figura 6B). O meio suplementado com BAP mostrou tendência de maior indução de brotos. O meio contendo ambas citocininas na concentração de 2 mg L⁻¹ induziram de 3 a 4 vezes mais brotações em relação ao controle. Normalmente, o BAP é adicionado ao meio de cultivo principalmente para induzir a proliferação de brotos, portanto, espera-se que não ocorra efeito positivo no alongamento do caule, mesmo com adição de auxinas (BHOJWANI et al. 2013).

Maior comprimento da parte aérea ocorreu em meio contendo meta-topolin (Figura 6A). Todavia maior comprimento de brotações (4,53 cm) foi observado em meio sem regulador de crescimento. Amoo et al. (2010) também observaram que o cultivo de *Barleria greenii* em meio suplementado com meta-topolin promoveu aumento no número de brotos produzidos e comprimento da parte aérea.

Figura 5. Proliferação de brotações em segmentos nodais de *O. majorona* L. em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e meta-topolin em combinação com ANA ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) *in vitro*, aos 40 dias. Lavras, 2022.



Moreno et al. (2022) não observaram efeito significativo no número de brotos induzidos no cultivo *in vitro* de *Lippia origanoides* em meios contendo BAP ou a combinação de BAP + ANA. Todavia a presença de BAP e sua combinação com ANA promoveram diminuição no crescimento da parte aérea, corroborando desta forma com os resultados obtidos no presente

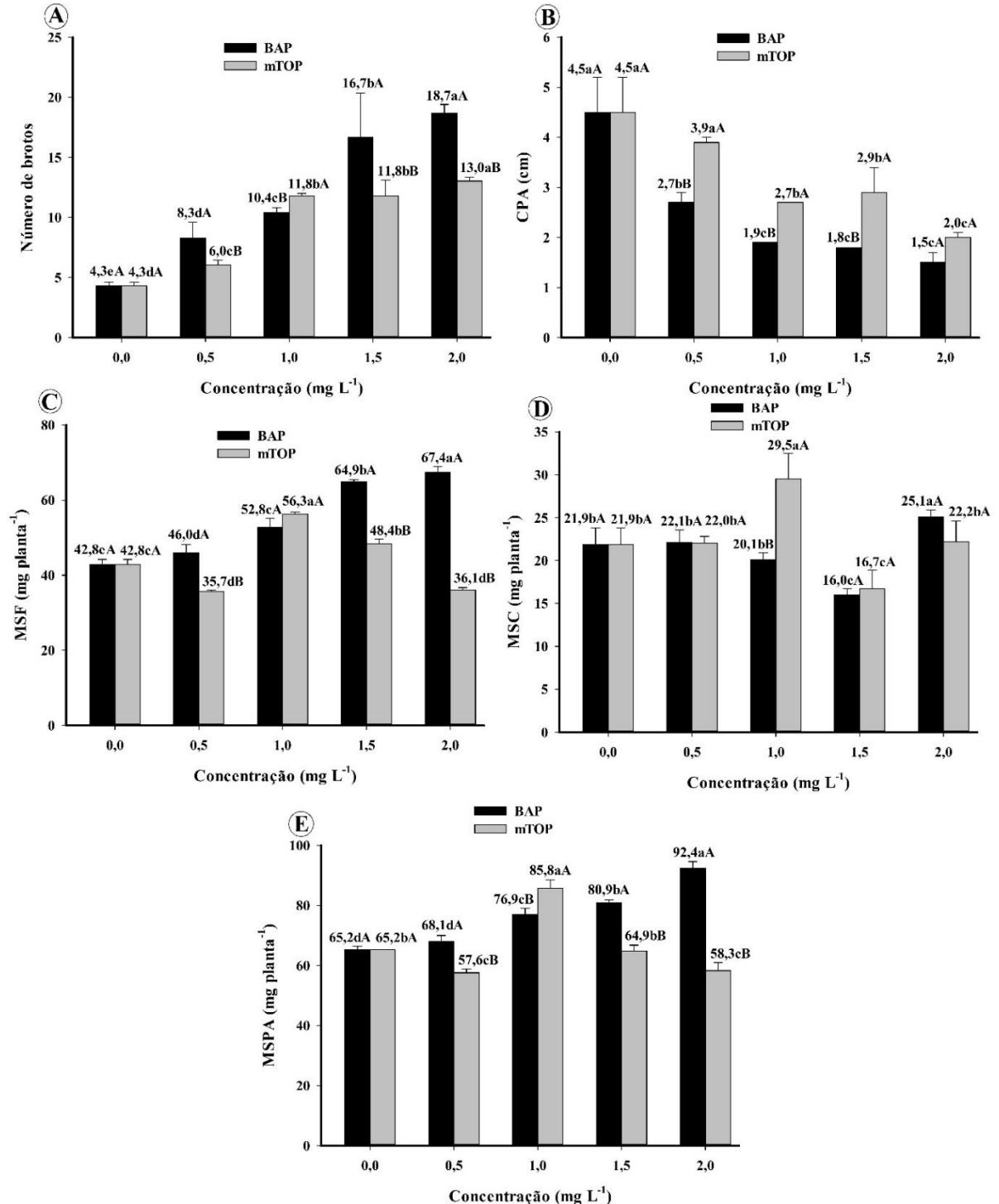
estudo. Nowakowsk e Pacholczak (2020) reportaram que o cultivo de *Daphne mezereum* L. em meio suplementado com meta-topolin ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), em combinação com ANA ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$), possibilitou maior número de brotos quando comparado ao meio contendo BAP, bem como na ausência de reguladores. Já Amoo et al. (2010) também observaram aumento no número de brotos induzidos com o aumento da concentração na micropropagação de *Barleria greenii* em meio suplementado com BAP, isolado ou em combinação com ANA.

O tipo de citocinina, a concentração e a combinação com auxina apresentaram efeito significativo na matéria seca de folhas no cultivo *O. majorana in vitro* (Figura 6C). Os explantes cultivados em meio suplementado com BAP tiveram o aumento da matéria seca com aumento das concentrações, embora entre as concentrações 1,0; 1,5; e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ não tiveram diferença significativa entre elas.

Comparando as citocininas BAP e meta-topolin, foi verificado efeito notório no aumento da massa seca de folhas nas concentrações 1,5 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ no cultivo com BAP (Figura 6C). O cultivo de *O. majorana* com meta-topolin apresentou maior matéria seca de folhas na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, mas as demais concentrações e o controle não apresentaram diferença significativa.

O cultivo *in vitro* com diferentes citocininas e concentração dos reguladores influenciou na produção de matéria seca do caule (Figura 6D). O cultivo suplementado com meta-topolin no geral apresentou maiores valores de matéria seca quando comparado com BAP em todas as concentrações. O meio suplementado com BAP apresentou massa seca igual ao controle em todas as concentrações (Figura 6D). A massa seca da parte aérea apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) quando o meio foi suplementado com diferentes concentrações e reguladores de crescimento (Figura 6E). No geral a massa seca da parte aérea foi maior no meio suplementado com BAP, a exceção da concentração de 1 mg L^{-1}

Figura 6. Avaliação de proliferação de brotações e produção de massa seca de plântulas de *O. majorana* L. cultivada *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e meta-topolin em combinação com ANA (0,25 mg L⁻¹) durante 40 dias. Lavras, UFLA 2022.



Médias seguidas da mesma letra minúscula em cada concentração e regulador testado isoladamente e a mesma letra maiúscula entre cada regulador não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

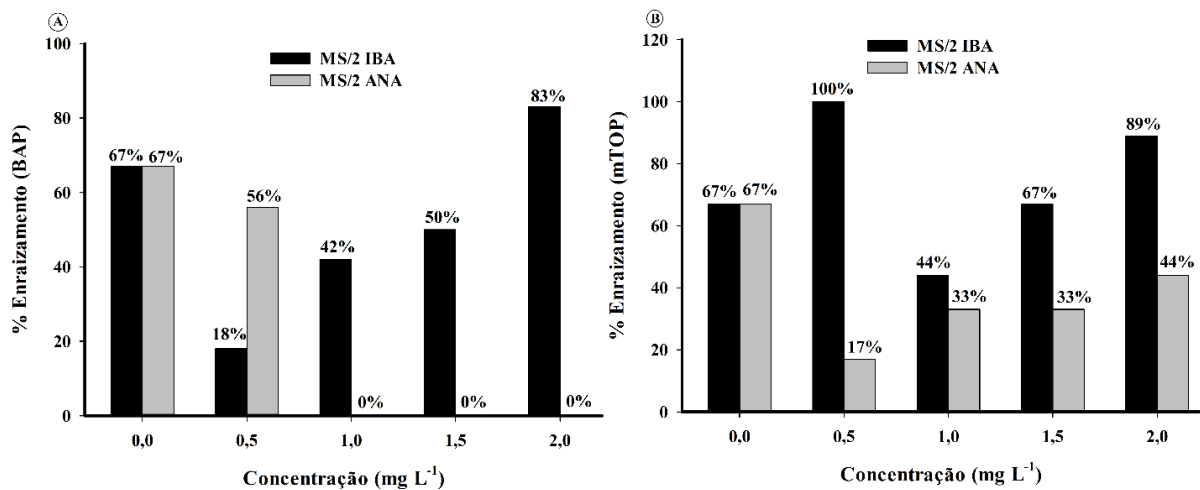
3.4. Enraizamento

Após 40 dias em cultivo para avaliação de proliferação de brotações em meio de cultivo suplementado com BAP e meta-topolin, as plântulas foram transferidas para meio de enraizamento. Os meios avaliados empregaram diferentes concentrações de sais minerais (MS\2 e MS\4) e diferentes concentrações de ANA e AIB.

a) Meio MS/2

Foi observado no presente trabalho que parte do material estava bastante necrosado e com raízes finas e curtas, e isso dificultou em grande parte a análise e coleta de dados. O cultivo de explantes em meio MS/2 suplementado com auxinas, proveniente de meio de multiplicação suplementado com BAP e meta-topolin, obteve indução de raízes em percentagens bem variadas. O maior percentual de enraizamento ocorreu em plantas cultivadas com AIB, em detrimento ao ANA (Figura 7A). Além disso, o meio suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de AIB apresentou maior percentual de indução de raízes.

Figura 7. Percentual de enraizamento de plantas de *O. majorana* L. cultivada *in vitro* em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de AIB e ANA aos 30 dias. Plantas provenientes da fase de multiplicação em meio de cultura suplementado com BAP (A) e meta-topolin (B). Lavras, UFLA 2022.



Majrshi et al. (2022) observaram melhor enraizamento *in vitro* de *Paulownia* spp. em meio suplementado com AIB em comparação com ANA, sendo que as plantas cultivadas em meio com AIB apresentaram o dobro de raízes em comparação as raízes provenientes de meio sem auxinas, corroborando os resultados obtidos na presente pesquisa. Pesquisas relataram melhor poder de ação de AIB no processo de enraizamento *in vitro*. No cultivo de *Olea europea* em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de AIB e ANA ocorreu a 86,67% de enraizamento com AIB (1,5 mg L⁻¹) e 40% com ANA (1,0 mg L⁻¹) quando comparados com

meio sem auxinas. Foi também observado aumento no percentual de enraizamento com o aumento da concentração de AIB, por esses motivos os autores sugerem que AIB poderia ter desencadeado divisão celular precoce, iniciando desta forma o surgimento mais rápido de raízes em relação ao ANA (ANSAR et al., 2015).

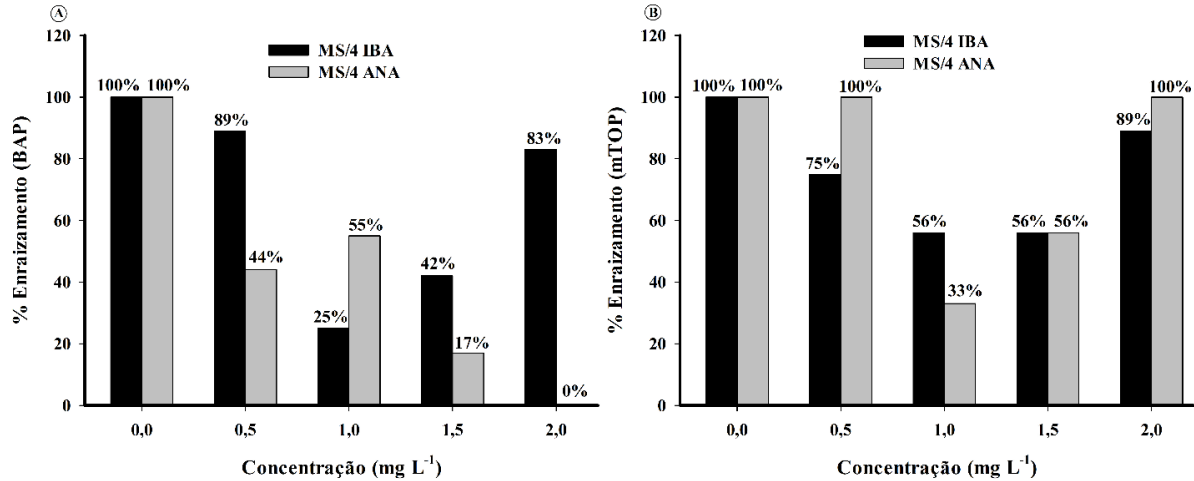
No presente estudo foi observado maior percentual de indução de raízes em plantas provenientes de meio contendo meta-topolin provenientes da fase de multiplicação de brotos. Além disso, plantas cultivadas em meio suplementado com ANA teve pouco ou nenhum efeito quando comparado com meio sem auxinas (Figura 7B).

O ANA não teve efeito em todas concentrações, a exceção da $0,5\text{mg L}^{-1}$ no processo de indução de raízes em brotações cultivadas provenientes da fase de multiplicação em meio suplementado com BAP (Figura 7A). O baixo percentual de enraizamento elucidou o efeito residual do BAP, pois as plantas já vinham sendo cultivadas a 60 dias em meio com BAP. Bairu et al. (2011) relataram que o contato prolongado das plantas com concentrações elevadas de BAP na fase de multiplicação reduziria a formação de raízes. Contudo, efeito contrário foi verificado em plantas provenientes de meio suplementado com meta-topolin, sugerindo que as brotações não teriam sofrido nenhum efeito residual por parte desta citocinina (Figura 7B).

b) meio MS/4

O cultivo das brotações de *O. majorana* em meio suplementado com auxinas não apresentou efeito no processo de indução de raízes quando comparadas ao controle. O percentual de enraizamento em meio suplementado com AIB ou ANA apresentou valores iguais ou inferiores aos valores do meio sem reguladores (Figura 8A e 8B). Estes resultados ressaltam que a redução de sais no meio de cultura melhora o crescimento *in vitro* de várias espécies. No entanto, a sua combinação com reguladores de crescimento (auxinas) pode não apresentar resultados desejados. Zayova et al. (2016) avaliando diferentes concentrações de sais no meio de cultura no cultivo *in vitro* de *Arnica montana* L. constataram que a redução de sais para MS/2, MS/3 e MS/4 melhorou o crescimento *in vitro* de plantas de arnica. Além disso, o meio MS/4 suplementado com AIB promoveu maiores número e comprimento de raízes.

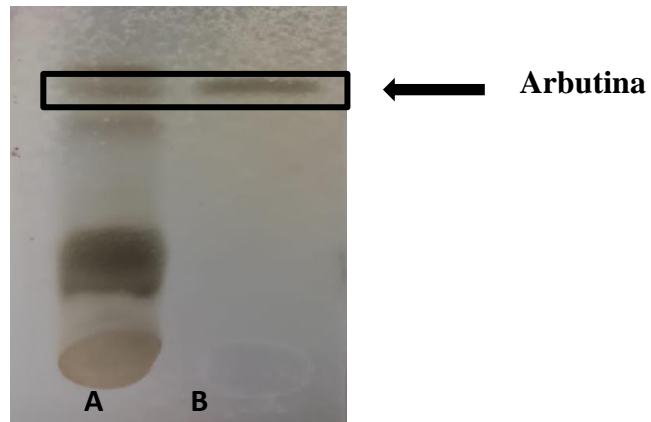
Figura 8. Percentual de enraizamento de plantas de *O. majorana* L. cultivada *in vitro* em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de AIB e ANA aos 30 dias. Plantas provenientes da fase de multiplicação em meio de cultura suplementado com BAP (A) e metatopolin (B). Lavras, UFLA 2022.



3.5 Caracterização da Arbutina nas amostras

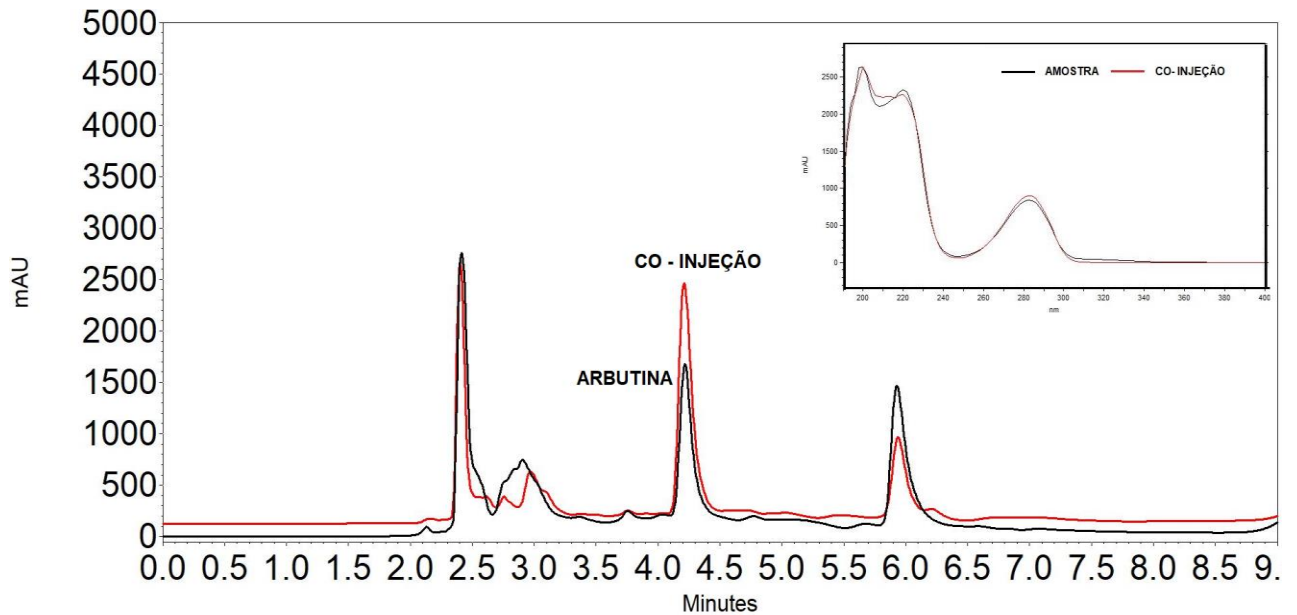
Para a caracterização da arbutina nas amostras de plântulas de *Origanum majorana* foram obtidos perfis cromatográficos por CCD e por CLAE-DAD (Figuras 9 e 10). A cromatoplaça de CCD (Figura 9) mostra a presença de uma banda com fator de retenção similar a arbutina, após revelação com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento. A presença de arbutina também foi confirmada por análises de CLAE-DAD por meio de co-injeção entre o extrato de folhas secas de *Origanum majorana* (preto) e co-injeção da amostra com solução de arbutina de referência (vermelho). O perfil obtido por CLAE-DAD na Figura 10 mostra o aumento da intensidade do pico com TR=4,2 minutos, atestada pela homogeneidade espectral do pico, determinada pelo DAD a 220 nm.

Figura 9. Cromatógrafo CCD, (A) amostras de extrato de folhas de manjerona, (B) amostras de solução padrão de arbutina (ARB). Lavras, UFLA 2022.



Do autor (2022)

Figura 10. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD de uma amostra de extrato de folha seca de *Origanum majorana* (preto) e co-injeção da solução extrativa com solução de arbutina de referência (vermelho) no tempo de retenção de 4,2 min. Lavras, UFLA 2022



3.6 Quantificação da Arbutina

O método estabelecido para as análises por CLAE-DAD em *Origanum majorana* no presente estudo baseou-se no método desenvolvido por Rychlinska e Nowak (2012). Para a determinação e quantificação de arbutina e hidroquinona por CLAE, em 16 drogas vegetais oriundas das famílias Lamiaceae, Ericaceae, Saxifragaceae, Rosaceae, esses autores empregaram também uma coluna de octadecilsilano (LiChro-CARD 125-4 Superspher®100 RP-18) e fase móvel água-metanol em eluição em gradiente. No método por CLAE-DAD estabelecido no presente estudo foi empregada uma eluição isocrática de 10% de metanol, como modificador orgânico que, como demonstrado no item anterior, eluiu arbutina em 4,2 min.

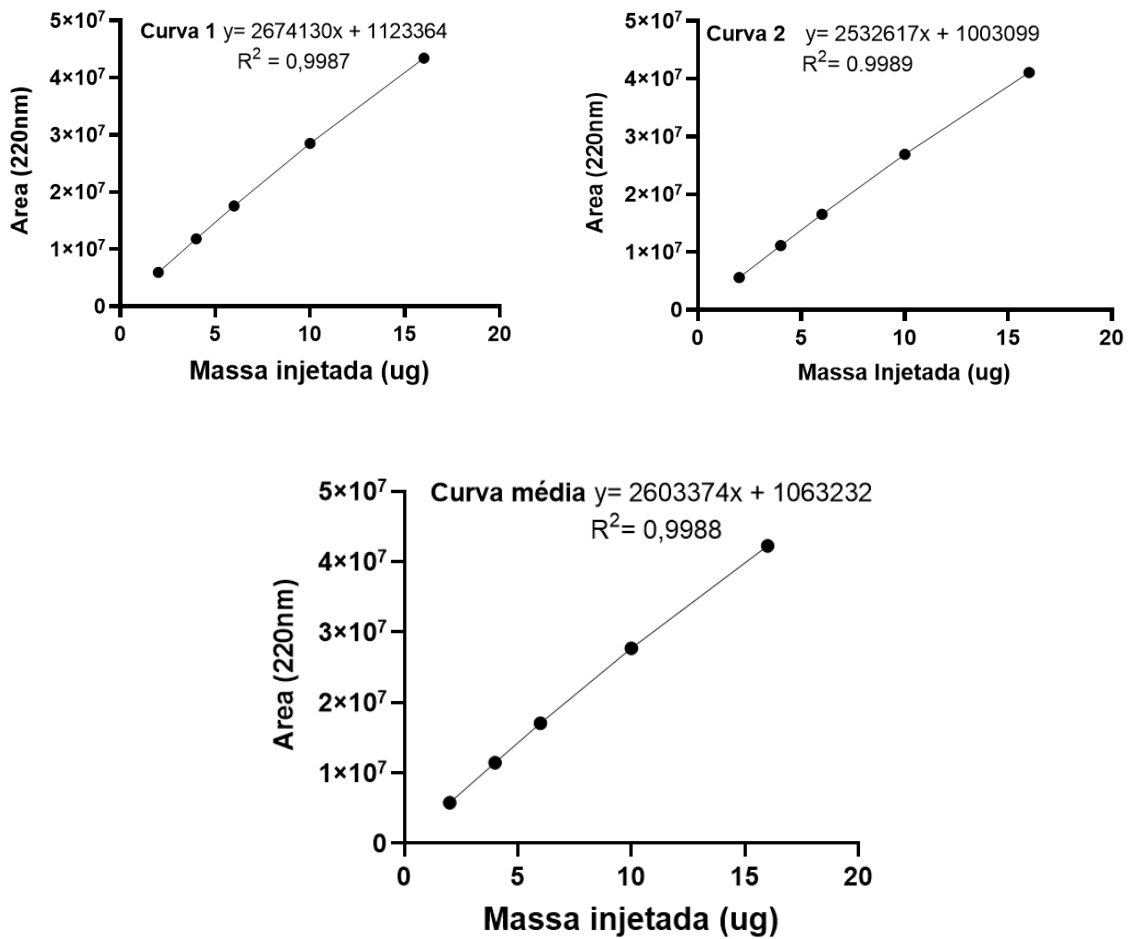
Para a quantificação da arbutina foram obtidas duas curvas analíticas, em dois dias consecutivos. Diferentes massas empregando soluções de referência de arbutina (1 mg/mL e 2 mg/mL) foram injetadas no cromatógrafo, em triplicata, na faixa de 2 a 16 µL. A tabela 3 apresenta nos dois dias análises, os valores de massa injetada e suas respectivas área e desvio padrão relativo para cada ponto da curva.

Tabela 2. Massa injetada, área média ($n=3$) e desvio padrão relativo das curvas analíticas para Arbutina nos dois dias de análise. Lavras, UFLA 2022.

Massa injetada (µg)	Dia 1		Dia 2	
	Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)
Solução de referência (2mg/ml)				
16	43424025	0,11	41094317	0,13
Solução de referência (1mg/ml)				
10	28518946	0,13	26920120	0,16
6	17573851	0,12	16533433	0,11
4	11789332	0,10	11115501	0,06
2	5927619	0,18	5591576	0,04

A curva de calibração do gráfico de massa injetada versus área de pico para arbutina foi linear no intervalo estabelecido (2-16 µg) com um R^2 de 0,9988 para a equação de regressão média ($y = 2603374x+1063232$) (Figura 11). As curvas de calibração obtidas nos dois dias consecutivos foram estatisticamente semelhantes ($p>0,05$).

Figura 11. Curvas analíticas e média obtidas por CLAE-FR, em dois dias consecutivos para ARB. Lavras, UFLA 2022.



Os dados da análise de regressão linear, dos dois dias de análises, estão representados na tabela 3. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) determinados a partir dos parâmetros da equação da curva média indicaram valores muito baixos [LD ($0,1078 \mu\text{g ml}^{-1}$) e LQ ($0,3267 \mu\text{g ml}^{-1}$)], demonstrando a sensibilidade do método (Tabela 4).

Tabela 3. Resultados da regressão linear para curvas analíticas de Arbutina, em dois dias consecutivos de análise.

Parâmetros estatísticos	Arbutina		
	Curva 1	Curva 2	Curva média
Faixa linear (μg)		2-16	
Coefficiente de correlação	0,9987	0,9989	0,9988
DPR da curva (%)	2,9	2,7	2,8
Inclinação ($\times 10^5$)	26,74	25,32	26,03
Erro padrão da inclinação ($\times 10^5$)	0,5518	0,4863	0,5189
Intercepto ($\times 10^5$)	11,23	10,03	10,63
Erro padrão do intercepto ($\times 10^5$)	5,0085	4,4146	4,7110

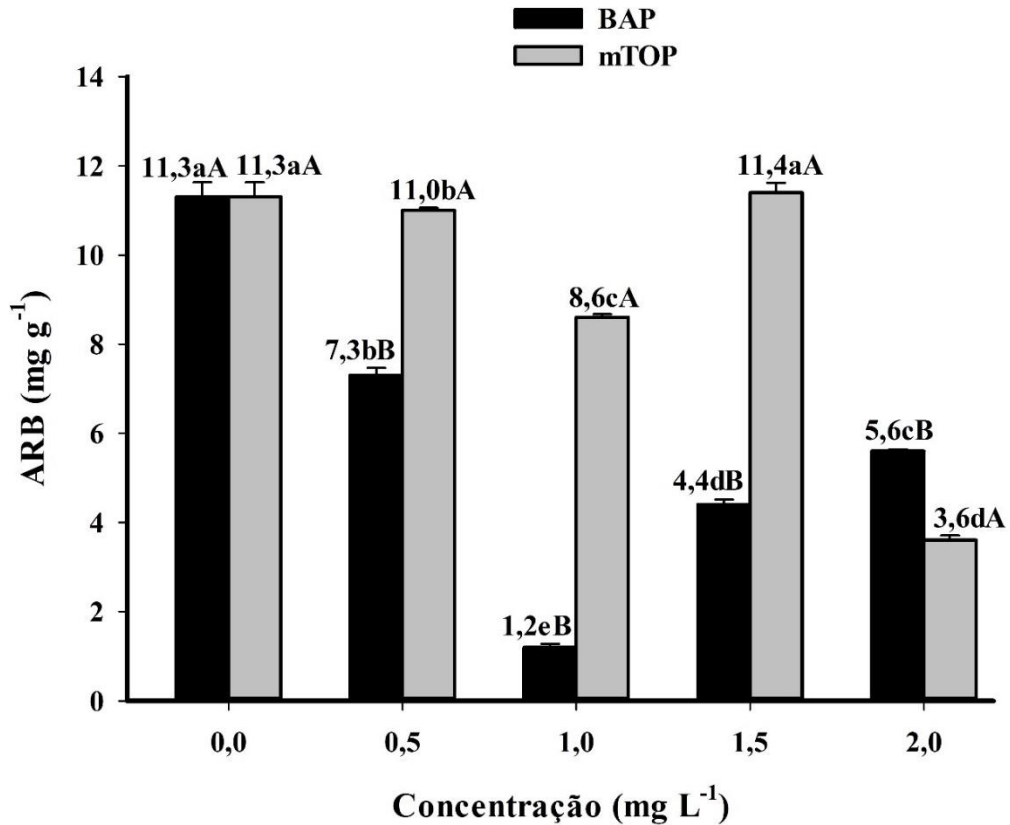
Tabela 4. Limites de quantificação e detecção determinados com base nos parâmetros das curvas analíticas obtidas

Parametros da curva	Curva 1	Curva 2	Média
Inclinação com o eixo y	2674130	2532617	2603374
Desvio padrão do intercepto		85039.74	
Limite de quantificação (μg)	0.32	0.34	0.33
Limite de detecção (μg)	0.10	0.11	0.11

3.7. Quantificação de Arbutina (ARB)

A presença de reguladores de crescimento não apresentou efeito significativo no aumento da produção da arbutina quando comparados com o controle (figura 12 e 13). Resultados similares foram descritos por Lazzarini et al. (2019) no cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis*, onde verificaram menor teor de carvacrol e timol nas plântulas cultivadas em meio sem regulador em comparação com as cultivadas em meio com regulador (BAP e TDZ).

Figura 12. Quantificação de ARB (mg g^{-1}) nas folhas de plântulas de *O. majorana* L. cultivada *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e meta-topolin em combinação com ANA ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) durante 40 dias, Lavras UFLA (2022).

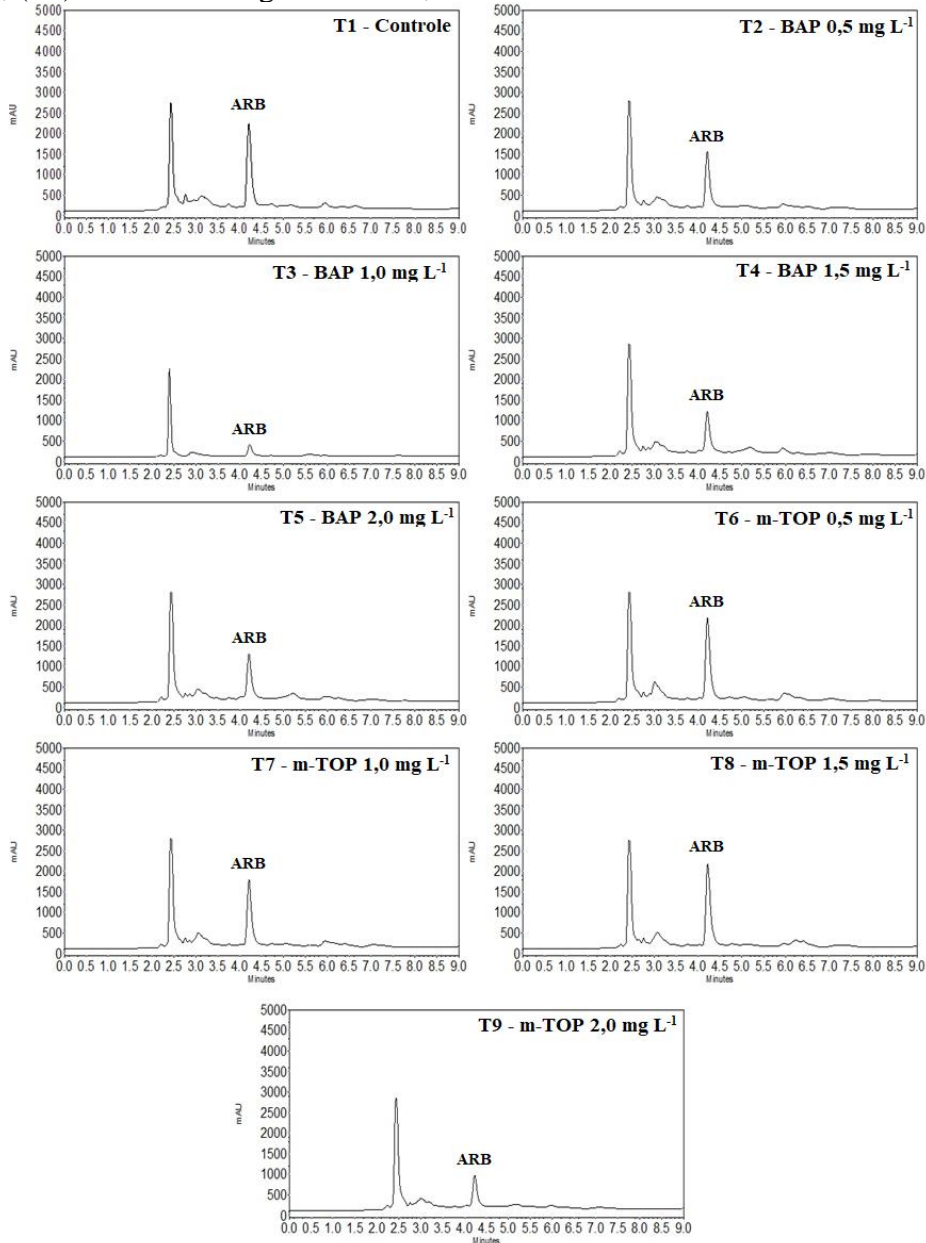


Médias seguidas da mesma letra minúscula em cada concentração e regulador testado isoladamente e a mesma letra maiúscula entre cada regulador não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

No entanto o maior acúmulo de arbutina nas folhas de *O. majorana in vitro* ocorreu no meio suplementado com meta-topolin (m-top) ao comparar com ao BAP (figura 12).

Além do BAP ter apresentado efeito inibidor para o acúmulo de arbutina em relação a meta-topolin, o aumento da sua concentração exacerbou o efeito inibitório. Resultados similares foram descritos por Silva et al. (2022) no cultivo *in vitro* de *Digitalis mariana* onde o aumento da concentração de BAP no meio do cultivo reduziu o conteúdo de cardenolídeos, sugerindo que a hiperidricidade muitas vezes causadas pelo uso de BAP, seria o responsável pela redução da biossíntese dos metabolitos secundários.

Figura 13. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD das folhas de *Origanum majorana* cultivadas em diferentes concentrações de BAP e m-TOP aos 40 dias. Tempo de Retenção (TR) ARB = 4,2 minutos. (T1) Controle, (T2) BAP 0.5 mg L⁻¹, (T3) BAP 1. mg L⁻¹, (T4) BAP 1.5 mg L⁻¹, (T5) BAP 2.0 mg L⁻¹, (T6) m-TOP 0.5 mg L⁻¹, (T7) m-TOP 1.0 mg L⁻¹, (T8) m-TOP 1.5 mg L⁻¹, (T9) m-TOP 2.0 mg L⁻¹. Lavras, UFLA 2022.



No entanto o acúmulo de arbutina em folhas cultivadas em meio suplementado com metatopolin nas concentrações de 0,5 e 1,5 mg L⁻¹ apresentaram valores sem diferenças significativas com o meio sem regulador. Este fato pode ser explicado pela estabilidade do meta-topolin no meio de cultivo comparativamente ao BAP, devido a presença de um grupo hidroxila em sua molécula que confere às topolinas uma vantagem estrutural sobre o BAP (AREMU et al., 2012).

A aplicação de reguladores de crescimento pode influenciar a resposta metabólica de várias formas, seja devido a ativação ou inibição de expressão de enzimas nas diferentes etapas de síntese de metabolito secundários. No cultivo *in vitro* de *Ocimum basilicum* os autores verificaram que reguladores de crescimento combinados ou isolados influenciaram na via biossintética. O uso da auxina (ANA, AIB e AIA) isolada aumentou o teor de linalol e a combinação de auxina (ANA, AIB e AIA) e citocininas (BAP) levou ao acúmulo de estragol (MONFORT et al., 2019).

3. CONCLUSÃO

Plântulas cultivadas em meio MS a partir do explante apical proporcionaram maior crescimento.

A utilização de reguladores de crescimento influenciou no processo de indução e proliferação de brotações, assim sendo na micropropagação de *Origanum majorana*.L afirma-se que o seu uso proporciona grande número de brotações, sendo o cultivo suplementado com BAP a 2,0 mg/L o recomendado .

A adição de reguladores de crescimento BAP e mTOP reduziu o acúmulo de arbutina com o aumento das concentrações do mesmo, tendo sido inibido principalmente pelo BAP.

4. REFERÊNCIAS

- AMANY, M. K.; SHAZA, A. M.; OMAIMA M. A.; AHMED, A. G. Adaptation of the in vitro Culture of *Origanum majorana* L. For Production of Phenolic Acids. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 12, n. 2, 2017
- ANSAR, A.; AHMAD, T.; ABBASI, N. A.; HAFIZ, I. A. EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF AUXINS ON IN VITRO ROOTING OF OLIVE CULTIVAR 'MORAILOLO'. **Pakistan Journal of Botany** v. 41, n. 3, p. 1223-1231, 2009.
- AMOO, S.O.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. V.; The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. **Plant Growth Regulators** v. 63, p.197–206, 2011.
- BAIRU, M. W.; STIRK, W. A.; DOLEZAL, K.; STADEN, J. V. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? **Plant Cell Tiss Organ Cult** v. 90, p. 15–23, 2007.
- BAIRU, M. W.; NOVA´K, O.; KAREL, D.; STADEN, J. V.; Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. **Plant Growth Regulation** v. 63, p. 105–114, 2011.
- BHOJWANI, S.S.; DANTU, P. K. **Plant tissue culture: An introductory text**. Agra: Springer, 309pp, 2013
- BINA, F.; RAHIMI, R.; Sweet Marjoram: A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biological Activities. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine** v. 22, n. 1, p. 175-185, 2016.
- BOUYAHYAA, A.; CHAMKHI, I.; BENALI, T.; GUAOUGUAOU, F.; BALAHBIB, A.; OMARI, N.; TAHA, D.; LMEHDI, O.; GHOKHANI, Z.; MENYIY, N. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. **Journal of Ethnopharmacology** v. 265, 2021.
- CALDAS, L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **EmbrapaSPI/Embrapa-CNPq**, v.1, p.87-132, 1998
- COSTA, M.B.T.; ARRUDA, A.S.; VIEIRA, M.C.; PAULA, M.S.P.; LUZ, J.P. Estabelecimento in vitro de *Ochroma pyramidale* em diferentes concentrações de meio MS e sacarose. **Revista Agrotecnologia**, v. 8, p. 1-9, 2017.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e o uso da luz natural. **Ciência Rural**, Pelotas, v. 35, p. 961-965, 2005.
- FADEL, D.; KINTZIOS, S.; ECONOMOU, A. S.; MOSCHOPOULOU, G.; CONSTANTINIDOU, H. I. Effect of Different Strength of Medium on Organogenesis, Phenolic Accumulation and Antioxidant Activity of Spearmint (*Mentha spicata* L.). **The Open Horticulture Journal**, v. 3, p. 31-35, 2010.

FAJINMI, O. O.; AMOO, S. O.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. **Optimization of in vitro propagation of *Coleonema album*, a highly utilized medicinal and ornamental plant.** South African Journal of Botany v. 94, p. 9–13, 2014

FALLAH, M.; FARZANEHA, M.; YOUSEFZADIB, M.; GHORBANPOURC, M.; MIRJALILIA, M. H. In vitro mass propagation and conservation of a rare medicinal plant, *Zhumeria Majdae* Rech.f & Wendelbo (Lamiaceae). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** v.17, p. 318–325, 2019.

GALLO, F. R.; PAGLIUCA, G.; MULTARI, G.; PANZINI, G.; D'AMORE, E.; ALTIERI, I. New High-performance Liquid Chromatography-DAD Method for Analytical Determination of Arbutin and Hydroquinone in Rat Plasma. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.** v.77, n. 5, p.530-5, 2015

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

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

GENTILE, A.; FRATTARELLI, A.; NOTA, P.; CONDELLO, E.; CABONI, E. The aromatic cytokinin *meta*-topolin promotes in vitro propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. **Plant Cell Tiss Organ Culture** v. 128, p. 693–703, 2017.

GRZEGORCZYK-KAROLAK, I.; HNATUSZKO-KONKA, K.; ZARZYCKA, M.; KUŹMA, L. The Stimulatory Effect of Purine-Type Cytokinins on Proliferation and Polyphenolic Compound Accumulation in Shoot Culture of *Salvia viridis* **Biomolecules** v.10, p. 178, 2020

KARA, N.; BAYDAR, N. Effects of Different Explant Sources on Micropropagation in Lavender (*Lavandula* sp.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, n. 2, p. 250 – 255, 2012,

KŐSZEGHI, S.; BEREZKI, C.; BALOG, A.; BENEDEK, K. Comparing the Effects of Benzyladenine and *meta*-Topolin on Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) Micropropagation. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 6, n. 4, p.422-427, 2014.

KUMAR, N.; REDDY, M. P. In vitro Plant Propagation: A Review. **Journal of Forest Science**, v. 27, n. 2, pp. 61-72, 2011

LATTUADA, D. S.; GUASSO, L. Z.; OLIVEIRA, K. M.; SILVA, V. M.; SOUZA, P. V. D. Tipos de explantes para estabelecimento in vitro de orégano e hortelã. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.25, n.3, p. 91-103, 2019.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CARVALHO, A. A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; YUCESAN, B.; PINTO, J. E. B. P. 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, p. 33–43, 2019.

- MÉABEDA, E. M. H.; EL- SAYEDB, N. M.; ABOU-SREEAC, A. I. B.; ROBYD, M. H. H. Chemical analysis of aqueous extracts of *Origanum majorana* and *Foeniculum vulgare* and their efficacy on Blastocystis spp. cysts **Phytomedicine**, v. 43, p. 158–163, 2018.
- MONFORT, L. E. G.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T. T.; LIMA, A. F.; SILVA, S. T.; SILVA, G. M.; Micropropagação e germinação de sementes in vitro de atoveran **Revista Ceres**, v. 62, n.2, p. 215-223, 2018
- 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 Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012.
- MORENO, J. S. R.; PORRAS, S. A. V.; ESCOBAR, R. H.; STASHENKO, E. E.; LORENZO, J. F. L.; GUTIÉRRE, L. N. G. In vitro propagation from nodal segments of *Lippia origanoides* (chemotype A) Propagação in vitro de segmentos nodais de *Lippia origanoides* (quimiotipo A) **Ciência Rural**, v.52, n.7, 2022.
- MOHAMAD, M. E.; AWAD, A. A.; MAJRASHI, A.; ABD ESADEK, O. A.; EL-SAADONY, M. T.; SAAD, A. M.; GENDY, A. S. In vitro study on the effect of cytokines and auxins addition to growth medium on the micropropagation and rooting of Paulownia species (Paulownia hybrid and Paulownia tomentosa. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, p. 1598–1603, 2021
- MOYO, M.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Recalcitrant effects associated with the development of basal callus-like tissue on caulogenesis and rhizogenesis in *Sclerocarya birrea*. **Plant Growth Regul**, v. 63, p.187–195, 2011.
- MUQADDAS, R. A. K.; NADEEM, F.; JILANI, M. I. Essential Chemical Constituents and Medicinal Uses of Marjoram (*Origanum majorana* L.) – A Comprehensive Review. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences. IJCBS**, v. 9, p.56-62, 2016.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.
- NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata* in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 1499-1506, 2006.
- NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito De Doses E Fontes De Carboidratos No Crescimento De Plantas De Ginseng Brasileiro [Pfaffia Glomerata (Spreng.) Pedersen] Cultivadas *In Vitro*. **Ciência e Agrotecnologia** v. 27, n. 1, 2003
- NOWAKOWSKA, K.; PACHOLCZAK, A. Comparison of the Effect of Meta-Topolin and Benzyladenine during *Daphne mezereum* L. Micropropagation. **Agronomy** v. 10, n. 12, 2020.
- NGUYEN, Q. T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. PHOTOAUTOTROPHIC MICROPROPAGATION. **Plant Factory**, CHAPTER 20, 2016.

Phillips, G. C & Garda, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. The Society for In Vitro Biology 2019. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* v. 55, p. 242–257, 2019

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral Nutrition and Plant Morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*—**Plant** v. 38, p. 116–124, 2002.

REZALI, N. I.; SIDIK, N. J.; SALEH, A.; OSMAN, N. I.; ADAM, N. A M. The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on in vitro growth of *Typhonium flagelliforme*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** v. 7, n. 2, p. 151–156, 2017.

ROSSI, Z. T. T.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MONFORT, L. E. F.; MOREIRA, C. M. Crescimento in vitro de hortelã-japonesa em função de diferentes concentrações de sais e de número e tipo de explante. **Revista Ciências Agrárias.**, v.54, n.3, p.267-273, 2012.

RYCHLIŃSKA, I & NOWAK, S. Quantitative Determination of Arbutin and Hydroquinone in Different Plant Materials by HPLC. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanic**, v. 40, n. 2, p.109-113, 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.

SANTOS, G.C., CARDOSO, F.P., MARTINS, A.D., PASQUAL, M., OSSANI, P.C., QUEIROZ, J.M, REZENDE, R.A.L.S. and DÓRIA, J. Effect of light and sucrose on photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation of *Physalis angulata*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 4, p. 1353–1367, 2020.

SOUZA, D. M. S. C.; FERNANDES, S. B; AVELAR, M. L. M.; FRADE, S. R; P.; MOLINAR, L. V; GONÇALVES, D. S.; BRONDANI, G. E. Mixotrophism effect on in vitro elongation and adventitious rooting of *Eucalyptus dunnii*. **CERNE**, v. 25, n. 4, p.394-401, 2019.

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 Organ Cult** v. 129, n. 3, p. 501–510. 2017.

TRIPATHY, B.; SATYANARAYANA, S.; KHAN, A.; RAJA, K. An Updated Review on Traditional Uses, Taxonomy, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Origanum majorana*. **International Journal Pharma Res Health Sci**. v. 5, n. 4, p. 1717-2, 2017.

WOJTANIA, A. Effect of meta-topolin on in vitro propagation of *Pelargonium hortorum* and *Pelargonium hederifolium* cultivars. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** v. 79, p.101–106, 2010

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

YASSER, H.; GEHAN, A.; ELSAYED, H.; KHALED, Y. In vitro Cultivation of Marjoram (*Origanum majorana* L.) under Influence of 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid) as Herbicide. **Life Science Journal** v. 12, n. 2, 2014

ZAYOVA, E.; PETROVA, M.; NIKOLOVA, M.; DIMITROVA, L. Effect of Medium Salt Strength on the Micropropagation, Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Arnica montana* L., Threatened Plant Species. **Biological Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 6-13, 2016.

**ARTIGO 2 - CRESCIMENTO E ACUMULO DE ARBUTINA EM *Origanum majorana*
L. CULTIVADA *in vitro* SOB DIFERENTES INTENSIDADES E QUALIDADE
ESPECTRAL DE LUZ**

(VERSÃO PRELIMINAR)

Artigo preparado de acordo com as normas Research, Society and Development Journal

RESUMO

Origanum majorana L. é uma planta herbácea e aromática pertencente a um grupo de plantas, que naturalmente produzem arbutina, uma substância de importância na indústria cosmética. A luz (intensidade e qualidade espectral) é um dos fatores que influenciam o crescimento, desenvolvimento e a síntese de metabolitos secundários de diferentes espécies de plantas *in vitro* devido a sua ação nos processos metabólicos das plantas. Objetivou-se verificar o efeito da intensidade de luz e do comprimento de onda no crescimento e acúmulo de arbutina *in vitro* de plântulas de *Origanum majorana*. No experimento de intensidade de luz, segmentos nodais foram cultivados em meio de cultura MS sob densidades de fluxo de fótons de 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtidas com lâmpadas LED. No experimento de espectro de luz (comprimentos de onda), segmentos nodais foram cultivados em meio de cultura MS sob diferentes diodos emissores de luz LED: vermelho (V); azul (A); combinação de luz azul (A) e vermelha (V) (30%A:70%V; 50%A:50%V; 70%A:30%V); branco LED (B), amarelo (AM) e verde (VD). Após 40 dias foi avaliado o crescimento, pigmentos fotossintéticos e acúmulo de arbutina por CLAE-DAD. As menores intensidades luminosas, 26 e 51 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, proporcionaram maior crescimento, conteúdo de pigmentos fotossintéticos. O aumento das intensidades luminosas proporcionou maior acúmulo de biomassa. Maior acúmulo de arbutina foi verificando sob maior intensidade de luz 131 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Quanto a qualidade de luz, diferentes comprimentos de onda não influenciaram significativamente no número de brotos e no comprimento da parte aérea. Espectro de luz branca e vermelho e azul combinados estimularam maior acúmulo de biomassa. Espectro de luz verde monocromática, branca e azul e vermelho combinadas proporcionaram maiores acúmulos de pigmentos fotossintetizantes. A quantidade de arbutina foi influenciado pelos diferentes espectros de luz. O espectro monocromático vermelho promoveu o maior teor de arbutina e o espectro monocromático amarelo inibiu o seu acúmulo.

Palavras-chave: diodos emissores de luz. Densidade de fluxo de fótons. Manjerona.

ABSTRACT

Origanum majorana L. is a herbaceous and aromatic plant belonging to a group of plants that naturally produce arbutin, a substance of importance in the cosmetic industry. Light (intensity and spectral quality) is one of the factors that influence the growth, development and synthesis of secondary metabolites of different plant species in vitro due to its action on the metabolic processes of plants. The objective was to verify the effect of light intensity and wavelength on growth and in vitro arbutin accumulation of *Origanum majorana* seedlings. In the light intensity experiment, nodal segments were cultivated in MS culture medium under photon flux densities of 26, 51, 69, 94 and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtained with LED lamps. In the light spectrum experiment (wavelengths), nodal segments were grown in MS culture medium under different LED light emitting diodes: red (V); blue (A); combination of blue (A) and red (V) light (30%A:70%V; 50%A:50%V; 70%A:30%V); LED white (B), yellow (AM) and green (VD). After 40 days, growth, photosynthetic pigments and arbutin accumulation were evaluated by HPLC-DAD. The lowest light intensity, 26 and 51 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provided greater growth and photosynthetic pigment content. The increase in light intensities provided greater accumulation of biomass. Greater accumulation of arbutin was verified under higher light intensity 131 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As for light quality, different wavelengths did not significantly influence the number of shoots and shoot length. Combined white and red and blue light spectrum stimulated greater biomass accumulation. Monochromatic green, white and blue and red light spectrum combined provided greater accumulation of photosynthetic pigments. The amount of arbutin was influenced by different light spectra. The red monochromatic spectrum promoted the highest arbutin content and the yellow monochromatic spectrum inhibited its accumulation.

Keywords: light emitting diodes. Photon flux density. Marjoram.

1. INTRODUÇÃO

Origanum majorana L. é uma espécie capaz de produzir a arbutina, um polifenol amplamente utilizado na indústria cosmética, como clareador para tratamento de desordens de hiperpigmentação, não causando melanocitotoxicidade, sendo assim uma opção ao uso de hidroquinona, corticoesteróides (CALA, 2021; LUKAS et al, 2010; ZHU & GAO, 2008;)

A arbutina é um glicosídeo de hidroquinona, é um dos principais constituintes da planta *Arctostaphylos uva-ursi* (uva-ursi) e é encontrada em quantidades significativas em *Origanum majorana* (GALLO et al, 2015; SAEEDI et al, 2021;), amplamente utilizada para clarear a pele e em produtos cosméticos devido a sua propriedade de suprimir a biossíntese da melanina na pele humana. (BOO, 2021; SAEEDI et al.; 2021).

Diversos processos para a produção de arbutina em diferentes espécies *Origanum vulgare* (RYCHLIŃSKA, NOWAK, 2012) *Origanum majorana* (SKRZYPCZAK-PIETRASZEK et al, 2017), *Fragaria spp*, *Vaccinium corymbosum* (KIM et al, 2018), *Bergenia crassifolia* (NIKULIN et al, 2019) através da cultura de tecidos têm sido descritos na literatura. Recentemente, (SKRZYPCZAK-PIETRASZEK et al, 2017) introduziram a espécie *O. majorana* como uma fonte alternativa de arbutina. A partir de um estudo de biotransformação, os autores demonstraram que a cultura de brotos *in vitro* de *O. majorana* converteu hidroquinona em arbutina.

A luz (qualidade espectral, fluxo de fótons e fotoperíodo) é um dos fatores que influenciam o crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies de plantas *in vitro* devido a sua ação nos processos metabólicos das plantas sendo desta forma uma ferramenta para a produção de compostos de interesse (SA´EZ et al. 2013).

Diodos emissores de luz (LED) tem sido bastante utilizada pelos laboratórios de cultura de tecidos de plantas comerciais devido às vantagens sobre os sistemas de iluminação convencionais (lâmpadas fluorescentes e incandescentes), como especificidade de comprimento de onda, durabilidade e tamanho reduzido (BATISTA et al, 2018). Ramírez-Mosqueda et al. 2017 demonstrou que as diferentes luzes LED produziram um efeito diferencial no crescimento e desenvolvimento durante o cultivo *in vitro* de *Vanilla. planifolia*.

No entanto, pelo fato das plantas terem diferentes respostas de crescimento e produção de metabólito secundário quando exposto a diferentes condições de luz em cultura *in vitro*, objetivou-se avaliar o efeito intensidade e qualidade de luz no crescimento e acúmulo de arbutina em plântulas de *Origanum majorana*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. A excisata de *Origanum majorana* L. foi depositada no herbário PAMG, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais sob o registro nº 58898. As plantas matrizes foram cultivadas no Horto Medicinal da UFLA.

2.1 Estabelecimento *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro*, foram utilizados como explantes segmentos nodais (± 1 cm de comprimento) de plantas matrizes de *O. majorana* L. Os explantes foram lavados com detergente e mantidos em água corrente. Em seguida, foi realizada a desinfestação com água sanitária a 50 % v/v por 15 min e tríplice lavagem com água deionizada esterilizada.

Posteriormente, foi feita a retirada de folhas e inoculação dos segmentos nodais em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 6,0 g L⁻¹ de ágar, suplementado com 30 g de sacarose e pH ajustado para 5,7 \pm 0,1. Os explantes foram repicados a cada 40 dias até a obtenção de material vegetal necessário para a montagem dos experimentos.

2.2 Influência da Intensidade de luz

Segmentos nodais (± 1 cm) foram excisados de plântulas cultivadas *in vitro* e inoculadas sob fluxo laminar asséptico em frascos contendo 50 mL de meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e com 6 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®], tipo I) e pH ajustado para 5,7 \pm 0,1. Após a inoculação, os explantes foram cultivados sob cinco intensidades de luz: 26, 51, 69, 94, 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtidas com Diodos Emissores de Luz (LEDs), sob um fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de 25 \pm 1°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, totalizando 60 frascos e 300 explantes. As intensidades luminosas foram mensuradas por um aparelho QSO-S Procheck + Sensor- PAR Photon Flux (Decagon Devices- Pullman- Washington-USA). Do experimento foram separados 2 frascos de cada tratamento para análise de pigmentos fotossintéticos.

2.3 Influência do comprimento de onda

Segmentos nodais (± 1 cm) foram excisados de plântulas cultivadas *in vitro* e inoculadas sob fluxo laminar asséptico em frascos contendo 50 mL de meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e com 6 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®], tipo I) e pH ajustado para $5,7 \pm 0$. Após a inoculação, os explantes foram cultivados sob diferentes diodos emissores de luz LEDs (TECNAL[©] Piracicaba, Brasil): vermelho (V); azul (A); combinação de luz Azul e Vermelha (30% A:70% V; 50% A:50% V; 70% A:30% V); branco LED (B), amarelo (AM) e verde (VD). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito, totalizando 48 frascos e 240 explantes.

A intensidade dos diodos foi de $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os espectros luminosos foram medidos por um espectrômetro manual SPECTRA PEN Z850 (Qubit Systems- Kingston, Ontario-USA). Do experimento foram separados 2 frascos de cada tratamento para análise de pigmentos fotossintéticos.

2.4 Análise de crescimento

Aos 40 dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento do broto (CB), número de brotos (NB), matéria seca de folha (MSF), matéria seca de caule (MSC), e matéria seca da parte aérea (MSPA). Para a determinação da matéria seca das folhas e caules, as respectivas partes foram acondicionados em sacos de papel kraft e levados à estufa de circulação de ar forçado, a 40°C, até peso constante (aproximadamente 72h). Posteriormente, o material desidratado foi pesado em balança de precisão.

2.5 Análise de pigmentos fotossintéticos

Para análise dos pigmentos fotossintéticos, 50 mg de matéria fresca das folhas de cada tratamento foram coletados, em sala escura iluminada somente com luz verde. Utilizou-se somente o segundo par de folhas de cada plântula. O material foi colocado em tubos do tipo Falcon, envoltos em papel alumínio, e, em seguida, 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados. Em seguida, os tubos foram encaminhados para a estufa, à temperatura de 65°C, por 24h.

Após esse período, alíquotas de 3 mL do extrato foram coletadas e transferidas para cubetas de quartzo, sendo feita a leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda 480 nm (carotenoides) 649 nm (clorofila *a*) e 665 nm (clorofila *b*). O espectrofotômetro TECAN

INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-control ® (versão 3.37) foi utilizado para a leitura da densidade óptica. As concentrações de clorofila e carotenoides tiveram seus resultados expressos em miligrama de pigmento por grama de matéria fresca de tecido foliar (mg g^{-1}), calculados de acordo com as seguintes equações, segundo a metodologia de Wellburn (1994):

$$\text{clorofila } a \text{ (Ca)} = [(12,47 \times A_{665,1}) - (3,62 \times A_{649,1})]$$

$$\text{clorofila } b \text{ (Cb)} = [(25,06 \times A_{649,1}) - (6,5 \times A_{665,1})]$$

$$\text{carotenoides} = (1000 A_{480} - 1,29 Ca - 53,78 Cb) / 220$$

Onde, $A_{665,1}$ = absorvância mensurada a 665 nm; $A_{649,1}$ = absorvância mensurada a 649 nm; A_{480} = absorvância mensurada a 480

2.6. Preparo de amostras e análises qualitativas e quantitativas de arbutina

Alíquotas de 50 mg de folhas secas de *Origanum majorana* provenientes de experimentos de luminosidade foram extraídas por sonicação por 3 ciclos de 15 minutos, empregando em cada ciclo 3 ml de metanol (MeOH) (50% de H_2O + 50% de MeOH). O volume de extrato de 3ml de cada fase orgânica foi recolhido, reunidos e evaporados sob vácuo em evaporador rotatório, à temperatura máxima de 40 °C. Os resíduos foram dissolvidos em 1mL de H_2O . Em seguida, a amostra foi transferida para microtubo e submetidas à sonicação por 2 minutos, seguida de centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. As análises qualitativas por CCD e CLAE-DAD e quantitativa por CLAE-DAD são as mesmas descritas no ponto 2.6. do artigo 1.

2.7 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise de crescimento sob intensidade de luz

O crescimento *in vitro* de *Origanum majorana* L. foi afetado pelas diferentes intensidades de luz. Observou-se um estiolamento nas plântulas sob 26 a 51 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentando caules finos e folhas menores, em comparação com os tratamentos 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 1). Maior número de brotos (2.6) e comprimento da parte aérea (6cm) foi observado sob cultivo em 51 e 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Resultados similares foram descritos por Lee et al. (2007) no cultivo *in vitro* de *Withania somnifera* onde as plântulas tiveram maiores crescimento sob cultivo a 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figura 1. Plântulas de *Origanum majorana* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes intensidades 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022.



O cultivo *in vitro* de *O. majorana* sob o aumento da intensidade luminosa teve uma tendência em reduzir o número de brotos (Figura 2). Por outro lado, no cultivo de *Hyptis*

suaveolens o aumento da intensidade luminosa (13 a 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) proporcionou um aumento do número de brotos e comprimento da parte aérea (ANDRADE et al., 2017), sendo o melhor crescimento observado sob intensidades de maior luz (47 e 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

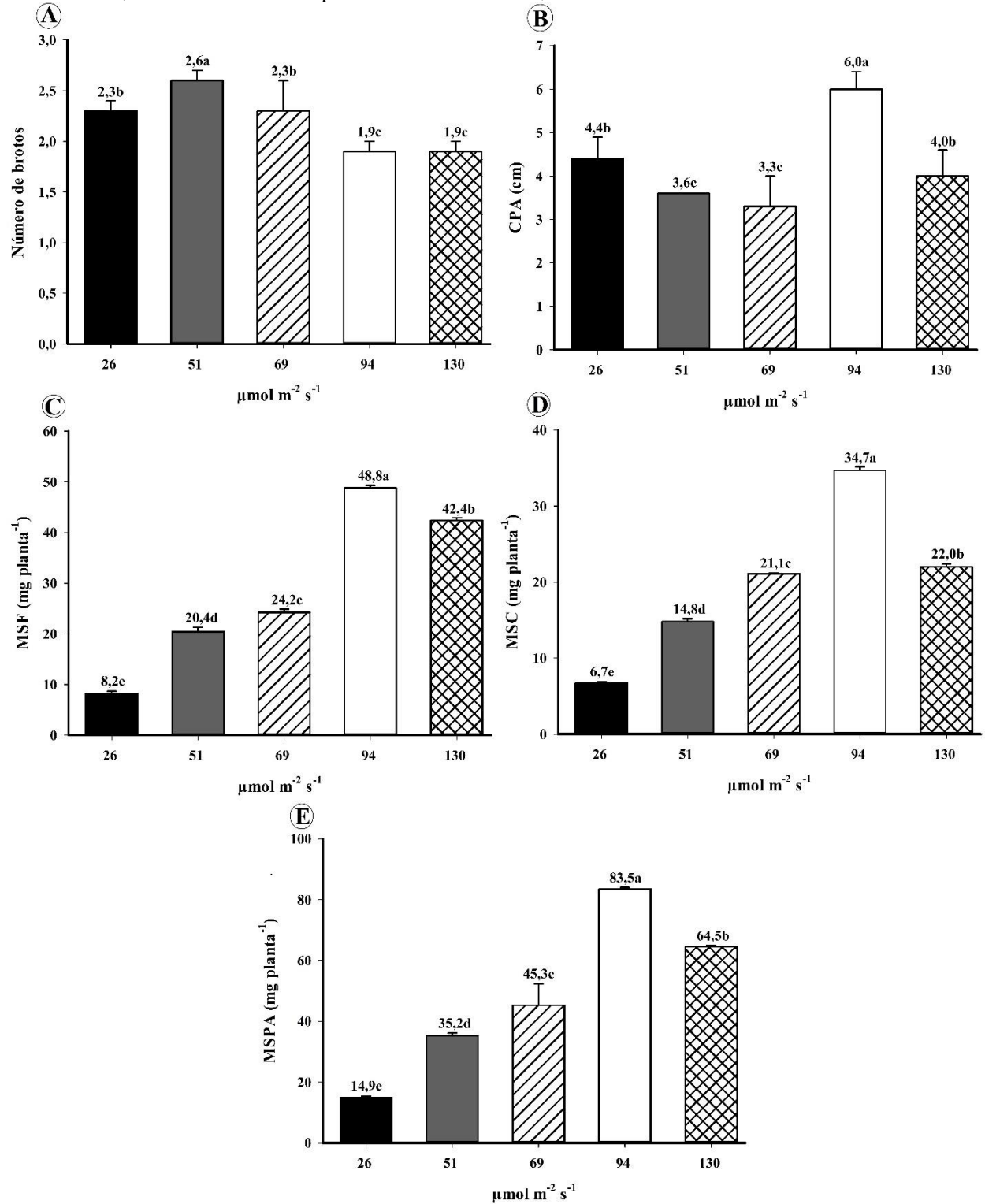
Maiores intensidades de luz foram favoráveis para a expansão de folhas de caules e *O. majorana*, provavelmente porque a intensidade luminosa regula a dimensão das folhas e dos caules, bem como na sua morfogênese (CAVALLARO et al., 2022).

Diferentes intensidades de luz influenciaram significativamente ($p < 0.05$) a produção de matéria seca de folha (MSF), do caule (MSC) e matéria seca da parte aérea (MSPA). Um maior ganho de matéria seca do caule e da folha foram observados a partir de 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2).

A intensidade de 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi superior a todos os outros tratamentos quanto a matéria seca das folhas (48,8 mg^{-1}), do caule (34,7 mg^{-1}) e matéria seca da parte aérea (83,5 mg^{-1}). Resultados contrários foram observados por Cioć et al. (20019) no cultivo de *Gerbera jamesonii* onde o aumento da intensidade luminosa de 40 a 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não afetou a produção de matéria seca e o número de brotos. Da mesma forma no cultivo *in vitro* de *Hyptis suaveolens* sob diferentes intensidades de luz verificaram um aumento das variáveis de crescimento com o aumento da intensidade luminosa (13 a 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (ANDRADE et al, 2017).

Os menores valores de matéria seca foram observados em plântulas cultivadas a 26 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2). De modo geral, plantas cultivadas em ambientes de baixa luminosidade apresentam menores valores de biomassa, em razão da baixa produção de fotoassimilados, resultado de uma fotossíntese ineficiente. Já no cultivo *in vitro* de *Achillea millefolium* os maiores valores de matéria seca da parte aérea e comprimento a da parte área, foi observado sob cultivo de 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ALVARENGA et al., 2015).

Figura 2. Número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC), da parte aérea (MSPA), de plântulas de *Origanum majorana* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* nas intensidades 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aos 40 dias. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, no teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Lavras, UFLA 2022.



3.2. Análise de pigmentos fotossintéticos sob intensidade de luz

As diferentes intensidades de luz afetaram significativamente ($p < 0.05$) a concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Origanum majorana* cultivadas *in vitro*. Os maiores valores quanto a clorofila *a*, *b* e carotenoides foram observados no cultivo sob intensidade de luz de $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Menores valores de clorofila e carotenoides foi observado em cultivo sob intensidade de 94 e $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Origanum majorana* L. cultivados *in vitro* sob diferentes intensidades de luz, aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022.

Intensidade $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Clorofila <i>a</i> (mg/g MF)	Clorofila <i>b</i>	Clorofila Total	Carotenoides
26	0,59a	0,14a	0,73a	0,15a
51	0,36c	0,11b	0,47c	0,10c
69	0,46b	0,11b	0,57b	0,12b
94	0,29d	0,07d	0,36d	0,08d
130	0,28e	0,08c	0,37d	0,10c
CV (%)	11,76	13,39	11,23	9,30

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade. MF: matéria fresca.

A intensidade da luz é um dos fatores-chave na regulação dos genes responsáveis pela biossíntese de clorofilas e carotenóides. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os valores de clorofila e carotenóides decrescem em *Origanum majorana* com o aumento da intensidade de luz, sugerindo desta forma uma correlação entre uma maior intensidade de luz e a redução da concentração de pigmentos fotossintetizantes, em decorrência da fotodegradação (CAVALLARO et al., 2022; SILVA et al., 2017). Mesmo assim, o acúmulo de matéria seca não foi afetado pela alta radiação em *Origanum majorana* (Figura 2).

Todavia, nem todas espécies apresentam esse comportamento *in vitro*. No cultivo de *Achillea millefolium* avaliando diferentes intensidade de luz (13 a $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) os autores observaram maior teor de pigmentos fotossintéticos a $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ALVARENGA et al., 2015). Resultados similares a estes foram descritos no cultivo *in vitro* de *Gerbera jamesonii* em diferentes intensidades de luz (40 a $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), onde o conteúdo de pigmentos fotossintético aumentou com o acréscimo da intensidade, sendo a intensidade de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o que acumulou maiores teores de pigmentos (CIOCI et al., 2019).

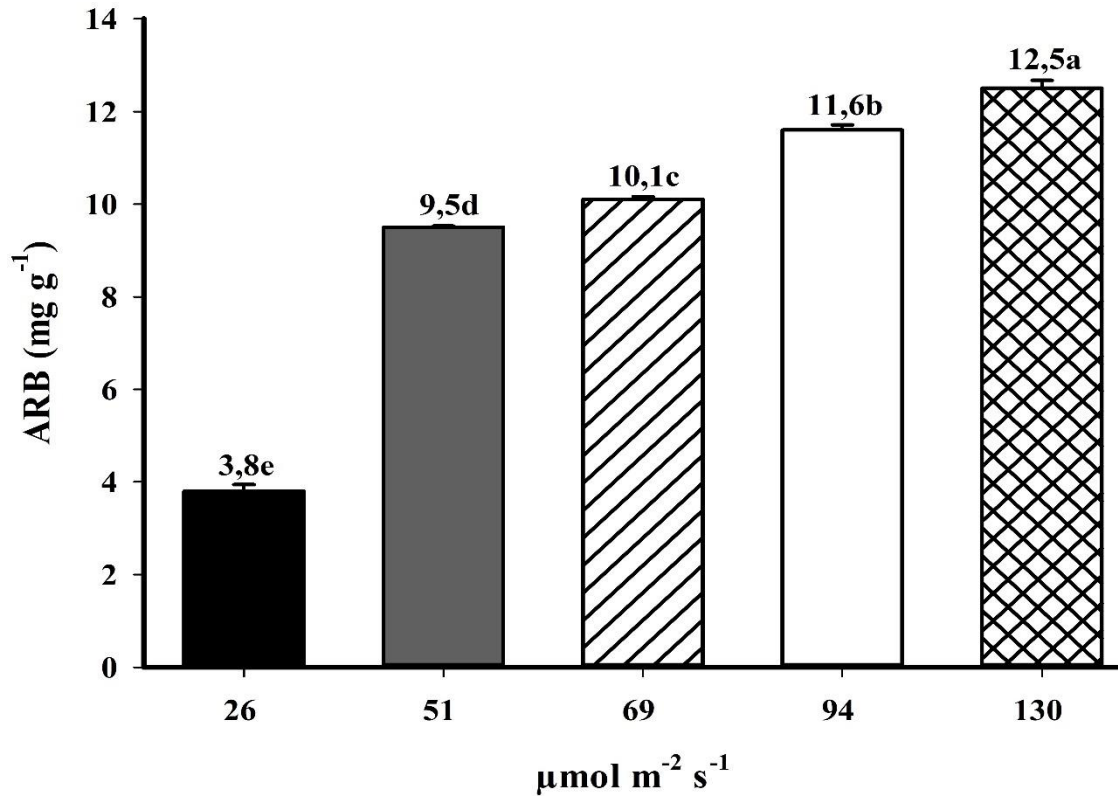
Assim sendo, fica notório que diferentes espécies *in vitro* necessitam de condições distintas de luminosidade, se adaptando morfológicamente e fisiologicamente a diferentes intensidades de luz de forma singular.

3.3. Quantificação de arbutina sob intensidade de luz

Diferentes intensidades de luz afetaram significativamente o acúmulo de arbutina em plântulas de *Origanum majorana* cultivadas em *in vitro* (Figura 3 e 4). O aumento da intensidade luminosa estimula a produção de compostos fenólicos nas plantas, com função de proteção do aparato fotossintético, pois a luz afeta à produção de metabólitos secundários como os compostos fenólicos e os flavonoides, no entanto a sua ação no aumento ou diminuição do teor dos compostos nas plantas é específico da espécie e do constituinte de interesse (JING et al., 2018; TAULAVUORI et al., 2018).

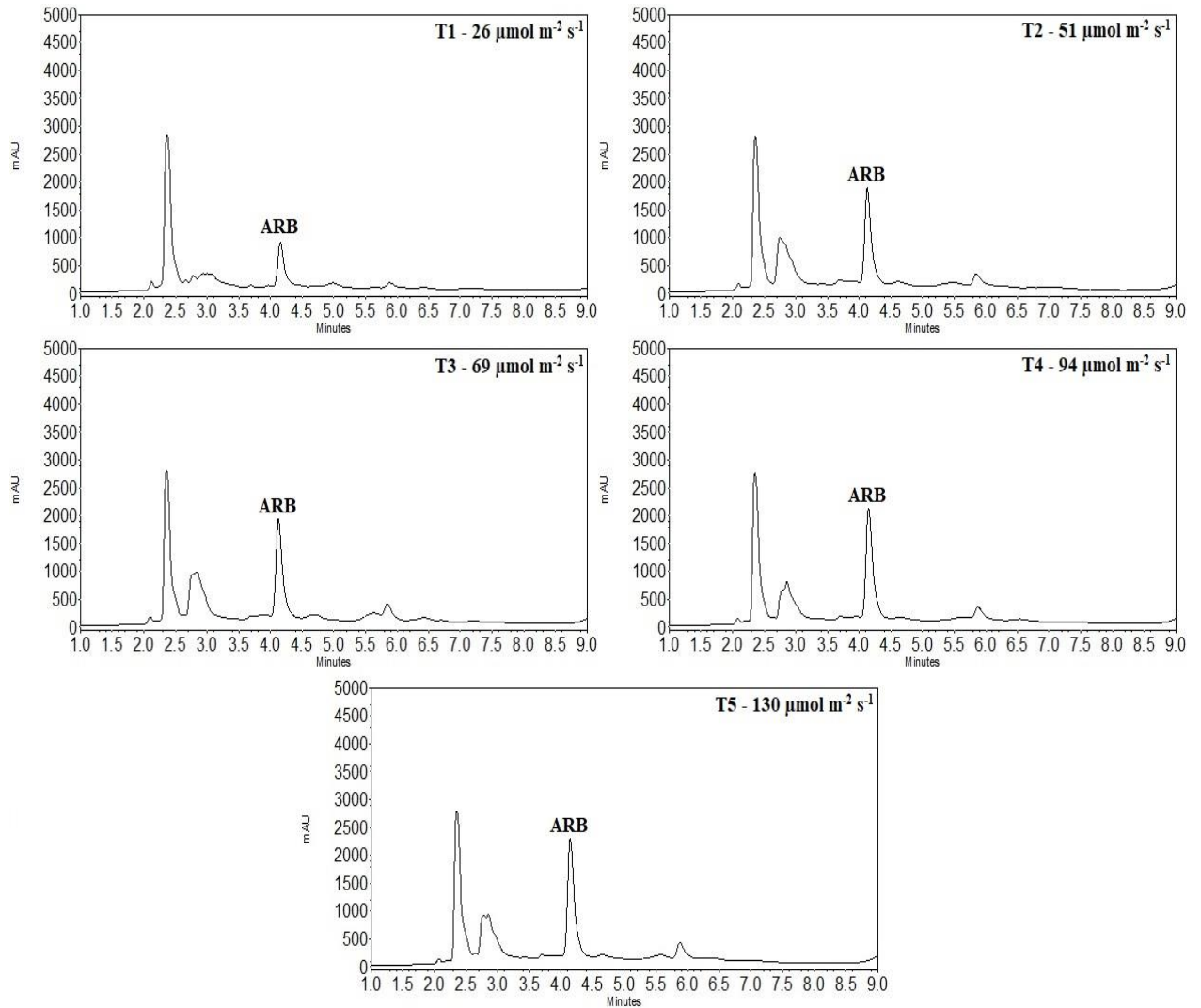
O aumento da intensidade de luz promoveu maior acúmulo de arbutina nas folhas de *O. majorana*. A partir da intensidade de luz de $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ houve o acúmulo de arbutina mais de duas vezes maior em comparação com o controle ($26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os valores obtidos são menores aos descritos por (RYCHLIŃSKA, NOWAK, 2012) para o conteúdo de arbutina apresentado em folhas de *O. majorana* cultivadas em solo a (17.24mg g^{-1}).

Figura 3. Quantificação de ARB (mg g^{-1}) nas folhas produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* sob diferentes intensidades de luz. As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Lavras, UFLA (2022).



O aumento da intensidade de luz leva a uma maior produção de fotoassimilados até um nível onde começam a ocorrer reações prejudiciais à planta, causadas pelo estresse luminoso (TAIZ et al., 2017). O estresse luminoso desfavoreceu acúmulo de pigmentos fotossintetizantes, conforme discutido no item 3.2, porém favoreceu o acúmulo de arbutina ($12,46 \text{ mg g}^{-1}$) como possível resposta ao estresse luminoso nas plântulas cultivadas sob $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Resultados similares foram observados no cultivo *in vitro* de *Digitalis mariana* sob diferentes intensidades luminosas (20 a $139 \mu\text{mol m}^{-2}$), onde o aumento da intensidade luminosa levou ao aumento do teor de cardenólídeos, justificando esse aumento ao estresse devido a exposição a elevada intensidade luminosa (SILVA et al., 2022). Contrariamente no cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis* sob diferentes intensidades luminosas, pesquisadores observaram o aumento do teor de y-Terpineno e diminuição do teor de carvacrol sob cultivo a $26 \mu\text{mol m}^{-2}$ (LAZZARRINI et al., 2018)

Figura 4. Perfis cromatograficos obtidos por CLAE - DAD (quantificação de arbutina em folhas secas).TR ARB = 4,2 minutos. produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* sob diferentes intensidades de luz (T1) $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (T2) $51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (T3) $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (T4) $94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (T5) $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lavras, UFLA 2022.



3.4 Análise de crescimento sob diferentes comprimentos de onda

O crescimento de *O. majorana in vitro* foi significativamente influenciada pela qualidade espectral da luz (Figura 5 e 6). Plântulas cultivadas sob luz verde e amarela apresentaram estioladas e com folhas pequenas. Maiores valores de comprimento da parte aérea foram observados sob cultivo de em espectro de luz branca (7,3cm) e vermelha (5,8cm), no entanto espectros de luz azul e combinação de luz azul e vermelha (50%A/50%V) tiveram efeito inibitório no comprimento da parte aérea. Estes resultados podem ser explicados pois a luz branca é de espectro amplo, combatendo desta forma a especificidade de luzes monocromáticas (CAVALLARO et al., 2022). Todavia, quanto a ao número de brotos produzidos diferentes espectros de luz não apresentaram efeito significativo.

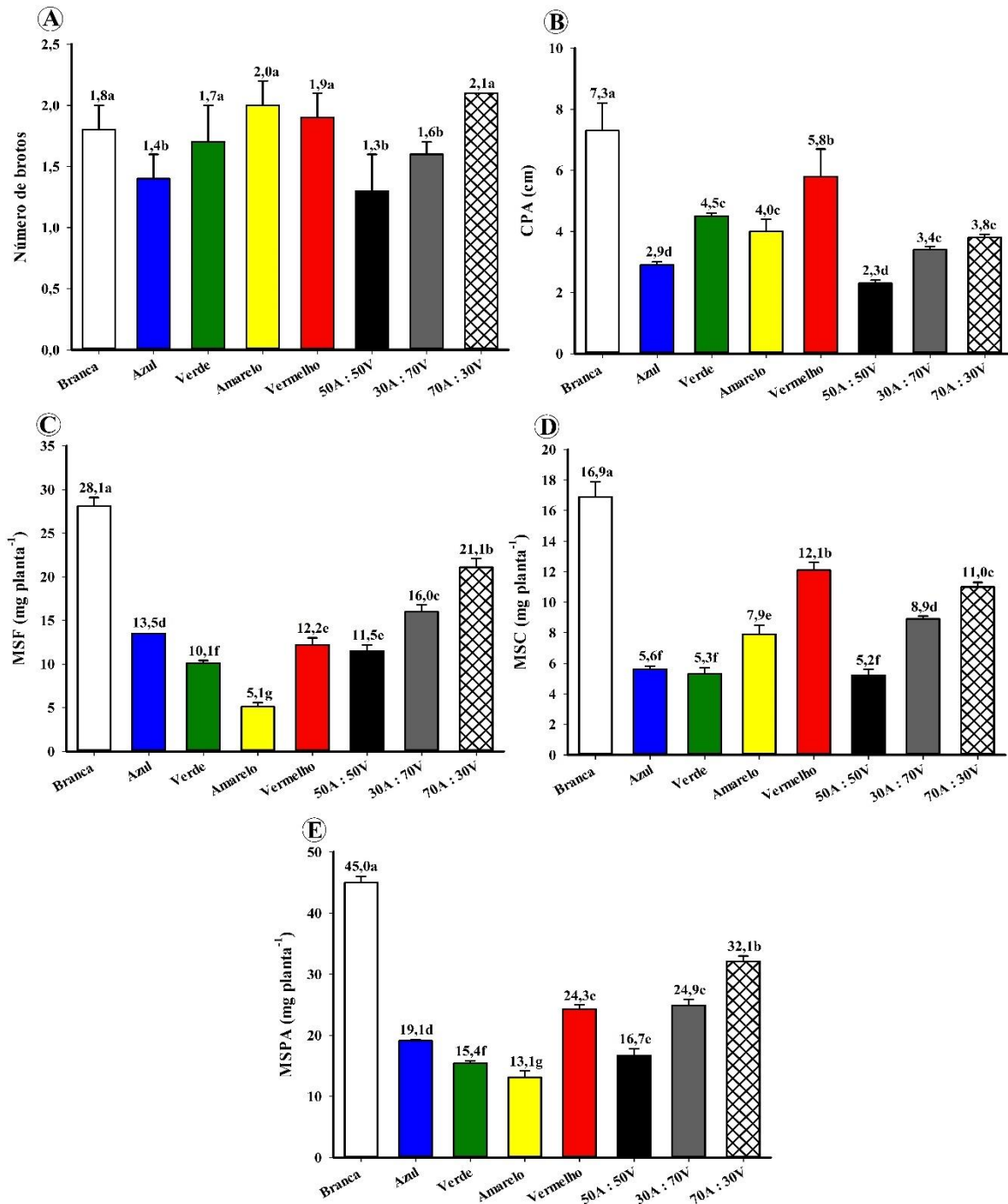
Figura 5. Plântulas de *Origanum majorana* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes espectros de luz: branca, azul (A), verde, amarelo, vermelho (V), 50%A/50%V, 30%A/70%V, 70%A/30%V aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022.



No cultivo sob luz monocromática vermelha e combinação de luz azul (50%) com vermelha (50%) as plântulas apresentaram visualmente mais vigorosas, bom crescimento em altura, folhas de tamanho maior e cor verde escura (Figura 6). A matéria seca de folha (MSF) das plântulas cultivadas sob luz branca acumularam o maior valor (28,1 mg), com valores bem

próximos as plântulas cultivadas sob combinação de luz azul e vermelha (70%A:30%V) (Figura 6).

Figura 6. Plântulas de *Origanum majorana* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes espectros de luz, aos 40 dias. (A) Número de brotos (NB), (B) Comprimento da parte aérea (CPA), (C) Matéria seca das folhas (MSF), (D) do caule (MSC), (E) da parte aérea (MSPA). Lavras, UFLA, 2022.



Combinação de espectros de luz azul e vermelha em detrimentos de luz monocromática pode superar as desvantagens individuais dessas luzes. Assim sendo, foi possível observar no

presente estudo que a combinação de luz azul e vermelha promoveu o crescimento das plântulas. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de espectros de luz azul e vermelha apresentarem efeito no processo de abertura e fechamento dos estômatos, o que pode levar a alteração do teor de água nos tecidos influenciando dessa forma na biomassa e tamanho das folhas, no entanto vale ressaltar que a melhor proporção de luz azul e vermelha pode ser específica para as espécies (LI et al., 2013).

Espectro de luz branca e vermelha mostraram-se mais eficientes na produção de MSC, sendo a luz azul e verde as que apresentaram menor acumulo de MSC. De modo geral maior produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) foi favorecida pelo cultivo em espectro de luz branca, vermelha e combinação de azul e vermelha (70%A:30%V). Todos esses resultados indicam que as respostas das plantas à iluminação LED são espécie e/ou cultivar dependente. Além disso, a combinação de LEDs de cores diferentes pode superar as limitações de cores individuais. Este estudo demonstra que a fonte de luz monocromática (qualidade espectral) pode ser um fator efetivo para propagação, crescimento de plântulas de *Origanum majorana*.

3.5 Análise de pigmentos fotossintéticos sob diferentes comprimentos de onda

O acumulo de pigmentos fotossintéticos foi influenciado significativamente pelo espectro luminoso (Tabela 2). As folhas das plântulas de *O. majorana* acumularam maiores teores de clorofila *a*, *b* e total e carotenoides sob cultivo sob luz verde.

Em especial a clorofila *a* observou-se um aumento expressivo no seu teor sob luz verde (0,68mg/g MF) seguido do espectro de luz vermelha (0,46mg/g MF). Valores elevados de pigmentos fotossintéticos observados sob cultivo da luz verde, são indicativos de estresse na planta, sendo esse aumento uma forma de compensar a falta de luz fotossinteticamente ativa (CAVALLARO et al, 2022). Esta compensação é explicada devido a penetração de luz verde nas plantas que favorece o aumento das plantas, proporcionando o aumento da fotossíntese nas folhas com mais eficiência que a luz azul e vermelha (ALVARENGA et al., 2015). Resultados similares foram observados no cultivo de *Achillea millefolium* sob espectro de luz verde, apresentou maiores valores de clorofila *a* e *b* e carotenoides (ALVARENGA et al., 2015).

Tabela 2. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Origanum majorana* L. cultivados *in vitro* sob diferentes espectros de luz, aos 40 dias. MF: matéria fresca. Lavras, UFLA, 2022.

Espectros	Clorofila	Clorofila	Clorofila	Carotenoides
	<i>a</i>	<i>b</i>	Total	
	(mg /g MF)			
Branca	0,41c	0,16b	0,57b	0,12c
Azul	0,23f	0,06d	0,29e	0,07f
Verde	0,68a	0,16b	0,8aa	0,17a
Amarela	0,16g	0,04e	0,2f	0,05d
Vermelha	0,46b	0,11c	0,57b	0,13b
50%A:50%V	0,33d	0,11c	0,44d	0,11d
30%A:70%V	0,29e	0,22a	0,50c	0,10e
70%A:30%V	0,45b	0,12c	0,57b	0,13b

Menores acumulo de clorofila *a* e *b* foram observados sob espectro de luz amarela (0,16 e 0,04 mg. /g MF, respectivamente) e azul (0,23 e 0,06 mg. /g MF) (Tabela 2). Weremczuk-Jezyna et al, (2021) observaram resultados contrários onde maior teor de clorofila no cultivo de *Dracocephalum forrestii* foi observado sob espectro de luz azul. Do mesmo modo, no cultivo de *Saccharum officinarum* a combinação de espectros de luz azul e vermelha (70%A:30%V e 50%A:50%V) induziu a produção de clorofila *a* e total, os autores justificam esses resultados pelo fato da luz azul apresentar papel importante na síntese de clorofila, induzindo a sua produção e dos cloroplastos (SILVA et al., 2014).

Silva et al. (2017) no cultivo de *Plectranthus amboinicus* verificaram um aumento na produção de pigmentos fotossintéticos sob espectro de combinação de luz azul e vermelha (50%A:50%V, 30%A:70%V). Portanto, conforme dados da literatura comparados aos resultados do presente estudo, nota -se que o aumento de pigmentos fotossintetizantes é dependente da espécie da qualidade de luz.

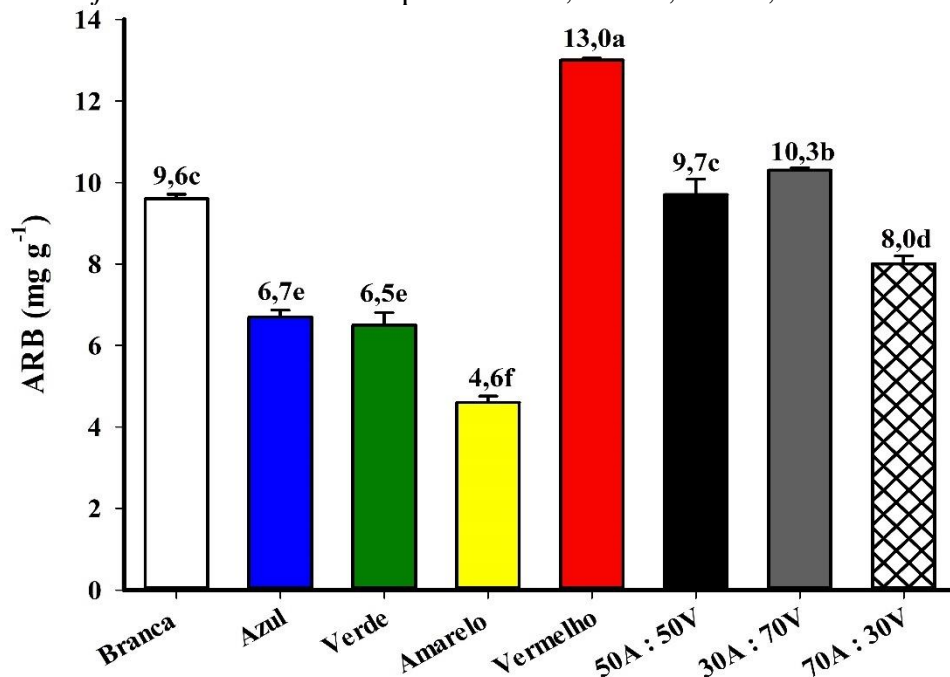
A qualidade espectral da luz influencia significativamente a resposta biológica da parte aérea. Desde fotorreceptores vegetais responsáveis pelo desenvolvimento e fotossíntese das plantas são conhecidos ser estimulado principalmente e mais significativamente pelas regiões vermelha e azul do espectro de luz, a maioria dos estudos avaliou o impacto da luz vermelha monocromática (660 nm), azul (460 nm) e azul combinado (440–480 nm) com luzes vermelhas (630–665 nm). Escasso são as informações disponíveis sobre os efeitos das regiões vermelho distante, verde e amarelo do espectro (CAVALLARO et al., 2022).

3.6 Quantificação de arbutina sob diferentes comprimentos de onda

Os teores de arbutina m plântulas de *O.majorana* foram latamente influenciados pela qualidade espectral de luz (Figura 7). No entanto o perfil químico foi pouco ou nada afetado pelos diferentes comprimentos de onda (Figura 8). Maiores valores de produção de arbutina foi observado sob cultivo em luz vermelha (13 mg g⁻¹) e combinação de luz azul e vermelha (30%A:70%V) com 10.3 mg g⁻¹. O uso de luzes LED monocromáticas ou compostas com diferentes qualidades espectrais podem ser uma ferramenta para a indução de metabólitos bioativos e pigmentos de interesse em cultura *in vitro*.

Resultados similares foram descritos por Silva et al. (2022) no cultivo *in vitro* de *Digitalis mariana* onde o cultivo sob combinação de luz vermelha e azul (30%V:70%A e 50%A:50%V) apresentou maior teor de cardenólídeos. Os autores justificaram seus resultados pelo fato de a luz vermelha e azul na sua maioria serem responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários devido a sua participação na fotossíntese.

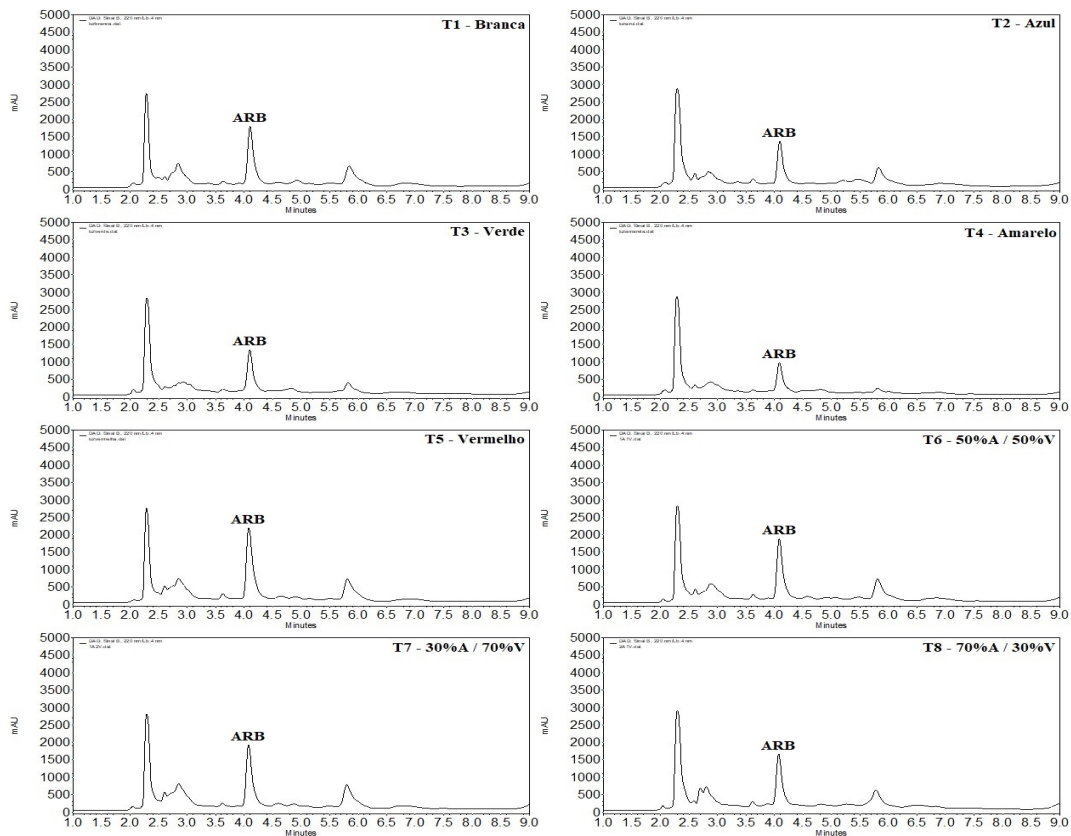
Figura 7. Quantificação de arbutina (ARB - mg g⁻¹) nas folhas produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* sob diferentes espectros de luz, Lavras, UFLA, 2022.



Menores valores de teor de arbutina foram observados sob cultivo de luz azul (6.7 mg g⁻¹), verde (6.5 mg g⁻¹) e amarela (4.6 mg g⁻¹). Estes resultados podem ser explicados pelo fato das plantas responderem o ambiente de maneira distinta, alocando seus fotoassimilados para a biossíntese de elementos necessários à sua sobrevivência e adaptação às condições ambientais oferecidas pelas diferentes fontes de luz.

Silva et al. (2017) reportaram maior acúmulo do metabolito secundário no cultivo *in vitro* de *Plectranthus amboinicus* sob espectro de luz azul, onde obteve maior teor de carvacrol. Várias pesquisas ressaltam que a produção de compostos fenólicos depende da espécie, cultivar, tempo de exposição e cada composto fenólico apresenta uma resposta específica a qualidade de luz (LOI et al, 2021). Sendo a arbutina um fenol, é esperado que a sua produção em *O. majorana* sob diferentes espectros de luz seja específica da própria espécie.

Figura 8. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE - DAD na quantificação de arbutina em folhas secas produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* sob diferentes espectros de luz. T1 (Branca), T2 (Azul), T3 (Verde) T4 (Amarelo), T5 (Vermelho), T6 (50A:50V), T7 (30V:70A), T8 (70V:30A)



4. CONCLUSÃO

A manipulação da intensidade e qualidade luminosa no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* L. influencia o crescimento das plântulas, e o acúmulo de pigmentos fotossintéticos e de arbutina.

Baixas intensidades luminosas (26 e $51 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) favorecem o crescimento e o acúmulo de pigmentos fotossintéticos. Entretanto, para maior acúmulo de arbutina é necessário o cultivo *in vitro* sob maiores intensidade de luz ($131 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Quanto a qualidade de luz, diferentes espectros não influenciaram significativamente no número de brotos e no comprimento da parte aérea. Espectro de luz branca e vermelho e azul combinados estimularam maior acúmulo de biomassa. No conteúdo de clorofila total espectro de luz verde monocromática, branca e azul e vermelho combinadas proporcionaram maiores valores.

Os teores do composto químico arbutina foi influenciado pelos diferentes espectros de luz. O espectro monocromático vermelho aumentou o teor de arbutina e o espectro monocromático amarelo diminuiu o teor de arbutina.

5. REFERÊNCIAS

- 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**. 1155, p. 277–284, 2017
- ALVARENGA, I.C.A., F.V. PACHECO, S.T. SILVA, S.K.V. BERTOLUCCI, AND J.E.B.P. PINTO. In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: Quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v. 122, n. 2, p.299–308, 2015
- AVINASH AGARWAL AND S. DUTTA GUPTA. Impact of Light-Emitting Diodes (LEDs) and its Potential on Plant Growth and Development in Controlled-Environment Plant Production System. **Current Biotechnology**, v. 5, p. 28-43, 2016
- BATISTA, D. S.; FELIPE, S. H. S.; SILVA, T. D.; CASTRO, K. M.; MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; MIRANDA, N. A.; RÍOS-RÍOS. A. M.; FARIA, D. V.; FORTINI, E. A.; CHAGAS, K.; TORRES-SILVA, G.; XAVIER, A.; ARENCIBIA, A. D.; OTONI, W. C. Light quality in plant tissue culture: does it matter? In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 54, p.195–215, 2018
- BARCELÓ-MUÑOZ, A.; BARCELÓ-MUÑOZ, M.; GAGO-CALDERON, A. Effect of LED Lighting on Physical Environment and Microenvironment on In Vitro Plant Growth and Morphogenesis: The Need to Standardize Lighting Conditions and Their Description. **Plants** v. 11, n. 60, 2022
- BALLESTER, A.R. & LAFUENTE, M.T. LED Blue Light-induced changes in phenolics and ethylene in citrus fruit: Implication in elicited resistance against *Penicillium digitatum* infection. **Food Chemistry**, v. 218, p. 575-583, 2017.
- BELLO-BELLO, J.J.; MARTÍNEZ-ESTRADA, E.; CAAMAL-VELÁZQUEZ, J.H.; MORALES-RAMOS, V. Effect of LED light quality on in vitro shoot proliferation and growth of *Vanilla planifolia* Andrews). **African Journal Biotechnology**, v. 15, p. 272–277, 2016
- BILLORE, V.; JAIN, M.; SUPRASANNA, P. Monochromic radiation through light-emitting diode (LED) positively augments in vitro shoot regeneration in Orchid (*Dendrobium sonia*). **Can. Journal Biotechnolgy**. 2017, 1, 50–58.
- BOO, Y.C. Arbutin as a Skin Depigmenting Agent with Antimelanogenic and Antioxidant Properties. **Antioxidants** v. 10, 2021
- CAVALLARO, V.; PELLEGRINO, A.; MULEO, R.; FORGIONE, I. Light and Plant Growth Regulators on In Vitro Proliferation. **Plants** v.11, p. 844, 2022.
- CIO' C, M.; KALISZ, A.; ZUPNIK, M.; PAWŁOWSKA, B. Z. Different LED Light Intensities and 6-Benzyladenine Concentrations in Relation to Shoot Development, Leaf Architecture, and Photosynthetic Pigments of *Gerbera jamesonii* Bolus In Vitro. **Agronomy**, v. 9, n. 7, p. 358, 2019

- FERREIRA, D. F. SISVAR - Sistemas de Análises de Variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. **UFLA**. 2011
- FURMANOWA, M, RAPCZEWSKA, L. *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch (*Bergenia*): Micropropagation and arbutin contents. [in:] *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants IV*. Bajaj YPS (ed). **Springer**, v. 21, p. 18-33, 1993
- FU, B., J.I.; X.; ZHAO, M.; HE, F.; WANG, X.; WANG, Y.; PENGFEI, L.; NIU, L. The influence of light quality on the accumulation of flavonoids in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 544-549, 2016.
- GALLO, F. R.; PAGLIUCA, G.; MULTARI, G.; PANZINI, G.; D'AMORE, E.; ALTIERI, I. New High-performance Liquid Chromatography-DAD Method for Analytical Determination of Arbutin and Hydroquinone in Rat Plasma. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.77, n. 5, p.530-5, 2015
- GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis **Plant Biotechnol Reports**, v. 7, p. 211–220, 2013
- HE, C. ZENG, Y. FU, Y. WU, J. LIANG, Q. Light quality affects the proliferation of in vitro cultured plantlets of *Camellia oleifera* Huajin. **PeerJ** 8, 2020
- JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. **Scientia Horticulturae** v. 236, p. 222–228, 2018
- JING, X.; WANG, H.; GONG, B.; LIU, S.; WEI, M.; AI, XIZHEN.; LI, Y.; SHI, Q. Secondary and sucrose metabolism regulated by different light quality combinations involved in melon tolerance to powdery mildew. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 1, p. 77-87, 2018
- LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; CÉLIO, M. M. F.; PINTO, J. E. B. P. Growth regulators affect the dry weight production, carvacrol and thymol content of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial crops and products**, v. 129, p. 35-44, 2019.
- LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V.; DOS SANTOS, J.; SILVA, S. T.; DE CARVALHO, A. A.; 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. 1, p. 1-13, 2018
- LEE, S. H.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. v. 90, p. 141–151. 2007
- LI, H.; TANG, C.; XU, Z. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis in vitro. **Scientia Horticulturae** v. 150, p. 117–124, 2015

LOBIUC, A.; VASILACHE, V.; PINTILIE, O.; STOLERU, T.; BURDUCEA, M.; OROIAN, M.; ZAMFIRACHE, M. Blue and red led illumination improves growth and bioactive compounds contents in acyanic and cyanic *Ocimum basilicum* L. microgreens. **Molecules**, v. 22, n.1, p. 1-14, 2017

KIM, T. J.; PARK, Y. J.; PARK, S. U.; HA, S. H.; KIM, J. K. Determination and quantification of arbutin in plants using stable isotope dilution liquid chromatography–mass spectrometry. **Appl Biol Chem** v. 61, n. 5, p.523–530, 2018

MA, X.; WANG, Y.; LIU, M.; XU, J.; XU, Z. Effects of green and red lights on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets in vitro. **Science Horticulturae**. v. 190, p. 104–109, 2015

MIRANDA, N. A.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; GALLO, R.; GATTI, K. C.; MOURA, L. C.; SOUZA, D. M. S. C.; MAGGIONI, J. H.; SANTOS, S. S. O. Quality and Intensity of Light in the In Vitro Development of Microstumps of *Eucalyptus urophylla* in a Photoautotrophic System. For. **Forest Science**. v. 66, n. 6, p. 754–760, 2020

MOSTAFA, S. E.; KARAM, S.N.; SHIBILI, R. A.; ALALI, F.Q. Micropropagation and production of arbutin in oriental strawberry tree. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 103, p.111-121, 2010.

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

NIKULIN, A. V.; OKUNEVA, M. V.; GORYAINOV, S. V.; POTANINA, O. G. Development and validation of an hplc-uv method for arbutin determination in bearberry leaves. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 53, n. 8, 2019.

PARK, Y.; RUNKLE, E. S. Spectral effects of light-emitting diodes on plant growth, visual color quality, and photosynthetic photon efficacy: White versus blue plus red radiation. **PLoS ONE** v. 13, n. 8, 2018

PACHECO, F.V.; AVELAR, R.P.; ALVARENGA, I.C.A.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ALVARENGA, A.A.; PINTO, J.E.B.P. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 251-257, 2016.

SAEEDI, M.; KHEZRI, K.; ZAKARYAEI, A. S.; MOHAMMADAMINI, H. A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin. **Phytotherapy Research** v. 35, p. 4136–4154. 2021

SILVA, M. M.A.; OLIVEIRA, A. L. B.; OLIVEIRA-FILHO, R. A.; GOUVEIA-NETO, A. S.; CAMARA, T. J. R.; WILLADINO, L. G. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets in vitro. **Proc. of SPIE** v. 8947, 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.

SKRZYPCZAK-PIETRASZEKA, E.; KWIECIENA, I.; GOŁDYNA, A.; PIETRASZEKB, J. HPLC-DAD analysis of arbutin produced from hydroquinone in a biotransformation process in *Origanum majorana* L. shoot culture. **Phytochemistry Letters** v. 20, p. 443–448, 2017

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal**. 6a ed, Porto Alegre: Editora Artmed, 2017. 858p.

TAULAVUORI, K.; PYYSALO, A.; TAULAVUORI, E.; JULKUNEN-TIITTO, R. Responses of phenolic acid and flavonoid synthesis to blue and blue-violet light depends on plant species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 150, n. 1, p. 183-187, 2018

WANG, J.; LU, W.; TONG, Y.; YANG, Q. Leaf Morphology, Photosynthetic Performance, Chlorophyll Fluorescence, Stomatal Development of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Exposed to Different Ratios of Red Light to Blue Light. **Front. Plant Science**. v.7, p. 250. 2016.

WEREMCZUK-JEZYNA, I.; HNATUSZKO-KONKA, K.; LEBELT, L.; GRZEGORCZYK-KAROLAK, I. The Protective Function and Modification of Secondary Metabolite Accumulation in Response to Light Stress in *Dracocephalum forrestii* Shoots. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, p. 7965, 2021

ZHU, W. AND J. GAO. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, Elsevier**. v. 13, n. 1, p. 20-4, 2008

ARTIGO 3 – CULTIVO SOB SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL, DOSES DE SACAROSE E COMPRIMENTO DE ONDA EM RELAÇÃO AO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS E ACÚMULO DE ARBUTINA DE *Origanum majorana* L. *in vitro*

(VERSÃO PRELIMINAR)

Artigo preparado de acordo com as normas Research, Society and Development Journal

RESUMO

A micropropagação fotoautotrófica refere-se à propagação em um meio que não contém componentes orgânicos suplementares e ocorre na ausência total de sacarose no meio de cultura. No entanto, quando a sacarose é adicionada, a micropropagação é designada fotomixotrófica. Em contrapartida, o sistema de ventilação natural permite trocas gasosas do recipiente com o exterior, através de membranas porosas, permitindo concentrações de CO₂ ideais, redução da umidade relativa, maior taxa fotossintética e maior sobrevivência na fase de aclimatização. Objetivou-se verificar o efeito da qualidade de luz (comprimento de onda) e o sistema de ventilação natural no crescimento e acúmulo de arbutina em plântulas *in vitro* de *Origanum majorana*. Segmentos nodais contendo um par de folhas, foram cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS e sistema de ventilação natural constituído de quatro membranas porosas e adição de sacarose nas concentrações 0; 7,5; 15 e 30 g. No sistema de ventilação sob influência de diferentes comprimento de onda, segmentos nodais com um par de folhas foram cultivadas meio MS, sistema de ventilação natural constituído de quatro membranas porosas suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e sob diferentes diodos emissores de luz LEDs : branco LED (BR); azul (A); verde (VD); amarelo (AM); vermelho (V); combinação azul e vermelha (50%A:50%V; 30%A:70%V; 70%A:30%V). Plântulas de *Origanum majorana* apresentam cultivo fotomixotrófico, sendo meio com 15g de sacarose e em sistema de ventilação natural com 4 membranas promoveu maior crescimento. No entanto maior acúmulo de arbutina foi favorecido em cultivo fotomixotrófico com 30g de sacarose. Sistema de ventilação e espectros de luz afetaram a crescimento, concentração de pigmentos fotossintéticos e acúmulo de arbutina em plântulas de manjerona. A luz monocromática vermelha proporcionou maior número de brotos e comprimento da parte aérea e maior acúmulo de biomassa foi induzido pelo espectro monocromático vermelho e azul e vermelho combinados (50A:50V e 30A:70V). A produção de pigmentos fotossintéticos e acúmulo de arbutina foi favorecida pelo espectro monocromática vermelha e menor produção e acúmulo foi observada sob espectro monocromático azul.

Palavras-chave: Fotomixotrófico. Glicosídeo fenólico. Manjerona. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Photoautotrophic micropropagation refers to propagation in a medium that does not contain supplemental organic components and occurs in the complete absence of sucrose in the culture medium. However, when sucrose is added, the micropropagation is called photomixotrophic. On the other hand, the natural ventilation system allows gas exchange between the container and the outside, through porous membranes, allowing for ideal CO₂ concentrations, reduced relative humidity, higher photosynthetic rate and greater survival in the acclimatization phase. The objective was to verify the effect of light quality (wavelength) and the natural ventilation system on growth and arbutin accumulation in *in vitro* seedlings of *Origanum majorana*. Nodal segments containing a pair of leaves were cultivated *in vitro* in MS culture medium and natural ventilation system consisting of four porous membranes and addition of sucrose at concentrations 0; 7.5; 15 and 30 g. In the ventilation system under the influence of different wavelengths, nodal segments with a pair of leaves were cultivated on MS medium, natural ventilation system consisting of four porous membranes supplemented with 15 g L⁻¹ of sucrose and under different light emitting diodes LEDs : white LED (BR); blue (A); green (DV); yellow (AM); red (V); blue and red combination (50%A:50%V; 30%A:70%V; 70%A:30%V). *Origanum majorana* seedlings present photomixotrophic cultivation, being a medium with 15g of sucrose and in a natural ventilation system with 4 membranes promoted greater growth. However, greater accumulation of arbutin was favored in photomixotrophic cultivation with 30g of sucrose. Ventilation system and light spectra affected growth, concentration of photosynthetic pigments and arbutin accumulation in marjoram seedlings. Red monochromatic light provided a greater number of shoots and shoot length, and greater biomass accumulation was induced by the combined red and blue and red monochromatic spectrum (50A:50V and 30A:70V). The production of photosynthetic pigments and arbutin accumulation was favored by the red monochromatic spectrum and lower production and accumulation was observed under the blue monochromatic spectrum.

Keywords: Photomixotrophic. Phenolic glycoside. Marjoram. *In vitro* culture.

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação fotoautotrófica refere-se à propagação e crescimento do explante ou planta sob condições livres de doenças em um meio que não contém componentes orgânicos suplementares, incluindo açúcares, vitaminas e hormônios vegetais (NGUYEN et al. 2016). A sacarose também interfere na micropropagação com trocas gasosas. É chamado micropropagação fotoautotrófica quando há ausência total de sacarose no meio de cultura, no entanto, quando a sacarose é adicionada, a micropropagação é fotomixotrófica (HOANG et al., 2017).

Em contrapartida, o sistema de ventilação natural permite trocas gasosas do recipiente com o exterior, ao passo que mantém um microambiente asséptico, através de membranas porosas, permitindo concentrações de CO₂ ideais, redução da umidade relativa, maior taxa fotossintética e maior sobrevivência na fase de aclimatização (NGUYEN et al. 2016; SALDANHA et al., 2012).

A micropropagação sem troca gasosa pode desencadear anormalidades fisiológicas e morfológicas como redução drástica da cutícula e formação de estômatos não funcionais, causando maior mortalidade dos explantes (SALDANHA et al., 2012).

O uso de membranas aumenta as trocas gasosas e influenciam o crescimento e o metabolismo secundário de plantas medicinais cultivadas *in vitro*. Larema et al. (2012), avaliaram plântulas de ginseng-brasileiro *Pfaffia glomerata*, cultivadas sob sistema convencional e sistema de ventilação natural com 1 e 2 membranas, observando maior crescimento em cultivo fotoautotrófico. Silva et al. (2017), observaram que o uso do sistema de ventilação natural com 1 e 2 membranas aumenta a matéria seca de *Plectranthus amboinicus*, ao passo que o uso de 4 membranas aumenta o acúmulo de carvacrol.

Como fonte de sinal e energia, a luz é um dos mais importantes fatores ambientais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Comparado com a intensidade da luz e o fotoperíodo, a qualidade da luz mostra efeitos muito mais complexos na morfologia da planta e fisiologia (WANG et al., 2016).

Até o momento, não há trabalhos relatando os efeitos da qualidade de luz e sistema de ventilação no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana*. No entanto, pelo fato das plantas terem diferentes respostas de crescimento e produção de metabólitos secundários quando exposto a diferentes condições de luz em cultura *in vitro*, objetivou-se avaliar o efeito da qualidade de luz e o sistema de ventilação natural no crescimento e acúmulo de arbutina em plântulas *in vitro* de *Origanum majorana*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. A excisata de *Origanum majorana* L. foi depositada no herbário PAMG, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais sob o registro nº 58898. As plantas matrizes foram cultivadas no Horto Medicinal da UFLA.

2.1 Sistema de ventilação natural suplementado com doses de sacarose

Experimentos preliminares foram realizados com o sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2), quatro (SVN4) membranas porosas e o controle (sem membrana) na ausência de sacarose usando explantes nodais com um par de folhas. No entanto esse experimento não foi bem sucedido, pois os explantes não cresceram. Durante esse experimento, os explantes cultivados com tampas com quatro membranas porosas mostraram capacidade de crescimento, o que nos levou a ajustar diferentes doses de sacarose para lidar com as novas condições de limitação da sacarose.

Segmentos nodais (± 1 cm), contendo um par de folhas, foram excisados de plantas cultivadas *in vitro* e inoculadas em frascos com capacidade para 200 mL de volume, com 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e sistema de ventilação natural constituído de quatro membranas porosas e adição de sacarose nas concentrações 0; 7,5; 15 e 30 g, 6,0 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®], tipo I) e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$.

Os frascos com os meios de cultivo foram autoclavados à 125°C e 1,2 atm de pressão por 20 min. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16h, temperatura de 25 ± 1 °C e irradiância de $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida artificialmente por lâmpadas de LED (diodos emissores de luz). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos totalizando 50 frascos e 200 explantes.

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

2.2 Sistema de ventilação sob influência do comprimento de onda

Segmentos nodais com um par de folhas (± 1 cm) foram excisados de plântulas cultivadas *in vitro* e inoculadas sob fluxo laminar asséptico em frascos contendo 50 mL de meio MS, sistema de ventilação natural constituído de quatro membranas porosas suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose e com 6 g L^{-1} de ágar (Himedia[®], tipo I) e pH ajustado para $5,7 \pm 0$. Após a inoculação, os explantes foram cultivados sob diferentes diodos emissores de luz LEDs (TECNAL[©] Piracicaba, Brasil): branco LED (BR); azul (A); verde (VD); amarelo (AM); vermelho (V); combinação azul e vermelha (50%A:50%V; 30%A:70%V; 70%A:30%V). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com oito tratamentos totalizando 96 frascos e 480 explantes.

A intensidade dos diodos foi de $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os espectros luminosos foram medidos por um espectrômetro manual SPECTRA PEN Z850 (Qubit Systems- Kingston, Ontario-USA). Do experimento foram separados 2 frascos de cada tratamento para análise de pigmentos fotossintéticos.

2.3 Análise de crescimento

Aos 45 dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao número de brotos (NB), comprimento do broto (CB), matéria seca de folha (MSF), do caule (MSC), e da parte aérea (MSPA). Para a determinação da matéria seca das folhas e caules, as respectivas partes serão acondicionados em sacos de papel kraft e levados à estufa de circulação de ar forçado, a 45°C , até peso constante (aproximadamente 72h). Posteriormente, o material seco foi pesado em balança de precisão.

2.4 Análise de pigmentos fotossintéticos

Para análise dos pigmentos fotossintéticos, 50 mg de matéria fresca das folhas de cada tratamento foram coletados, em sala escura iluminada somente com luz verde. Utilizou-se somente o segundo par de folhas de cada plântula. O material foi colocado em tubos do tipo Falcon, envoltos em papel alumínio, e, em seguida, 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram

adicionados. Em seguida, os tubos foram encaminhados para a estufa, à temperatura de 65°C, por 24h.

Após esse período, alíquotas de 3 mL do conteúdo foram coletadas e transferidas para cubetas de quartzo, sendo feita a leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda 480 nm (carotenoides) 649 nm (clorofila a) e 665 nm (clorofila b). O espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-control® (versão 3.37) foi utilizado para a leitura da densidade óptica. As concentrações de clorofila e carotenoides tiveram seus resultados expressos em miligrama de pigmento por grama de matéria fresca de tecido foliar (mg g^{-1}), calculados de acordo com as seguintes equações, segundo a metodologia de Wellburn (1994):

$$\text{clorofila } a \text{ (Ca)} = [(12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649})]$$

$$\text{clorofila } b \text{ (Cb)} = [(25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665})]$$

$$\text{carotenoides} = (1000 A_{480} - 1,29 Ca - 53,78 Cb) / 220$$

Onde, A_{665} = absorvância mensurada a 665 nm; A_{649} = absorvância mensurada a 649 nm; A_{480} = absorvância mensurada a 480.

2.5. Análises no CLAE

2.5.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado nas etapas analíticas é proveniente de experimentos de sistema de ventilação natural e doses de sacarose, assim como qualidade de luz combinado com sistema de ventilação natural, realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da UFLA. As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Horto de Plantas Medicinais da UFLA.

2.5.2. Extração de Arbutina e Preparo de amostras para CLAE

Alíquotas de 50 mg de folhas secas pulverizadas de *O. majorana* foram extraídas por sonicação por 3 ciclos de 15 minutos, empregando em cada ciclo 3 ml MeOH (50% de H_2O + 50% de MeOH). O volume de extrato de 3mL de cada fase orgânica foi recolhido, reunidos e evaporados sob vácuo em evaporador rotatório, à temperatura máxima de 40 °C, e os resíduos foram dissolvidos em 1.000 μL de H_2O . Em seguida, a amostra foi transferida para microtubo

e submetidas à sonicação por 2 minutos, seguida de centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi injetado automaticamente no cromatógrafo.

2.5.3 Condição cromatográfica estabelecida

A condição cromatográfica estabelecida para a quantificação de arbutina em extrato de folhas de *O. majorana* inclui o uso de coluna Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm d.i. 5 µm), temperatura da coluna de 25°C, fase móvel constituída por água Milli-Q e metanol grau CLAE, conforme descrito no item 2.6.4 do artigo 1.

2.6 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Sistema de ventilação natural suplementado com doses de sacarose

O cultivo de plântulas de *O. majorana in vitro* sobre diferentes concentrações de sacarose e sistema de ventilação com quatro membranas porosas apresentou efeito significativo. Os explantes cultivados em meio sem sacarose e com quatro membranas porosas não se desenvolveram (Figura 1). Portanto, o meio de cultura deve ser suplementado com sacarose, pois funciona como fonte de energia para sustentar o metabolismo fotomixotrófico. No decorrer do experimento foi observada a diminuição da quantidade do meio de cultura, sugerindo maior evapotranspiração em decorrência da presença das membranas porosas (Figura 1), permitindo maior perda de água do meio de cultura (Saldanha et al., 2012).

Segundo Souza et al. (2014) maiores trocas gasosas no cultivo *in vitro* proporcionam maiores crescimentos das plântulas, expansão da área foliar e da taxa fotossintética. Possivelmente, o tratamento com quatro membranas porosas por possibilitar maior entrada de CO₂ proporcionou maior crescimento das plântulas de *O. majorana in vitro*. Resultados similares foram descritos por Lazzarini et al. (2019) no cultivo de *Lippia gracilis* em sistema de ventilação natural com diferentes quantidades de membranas porosas nas tampas, os quais verificaram maiores comprimento da parte aérea e matéria seca com o uso de quatro membranas.

Figura 1. Plântulas de *Origanum majorana* L. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose em combinação com sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas (SVN4), aos 40 dias, Lavras 2022.

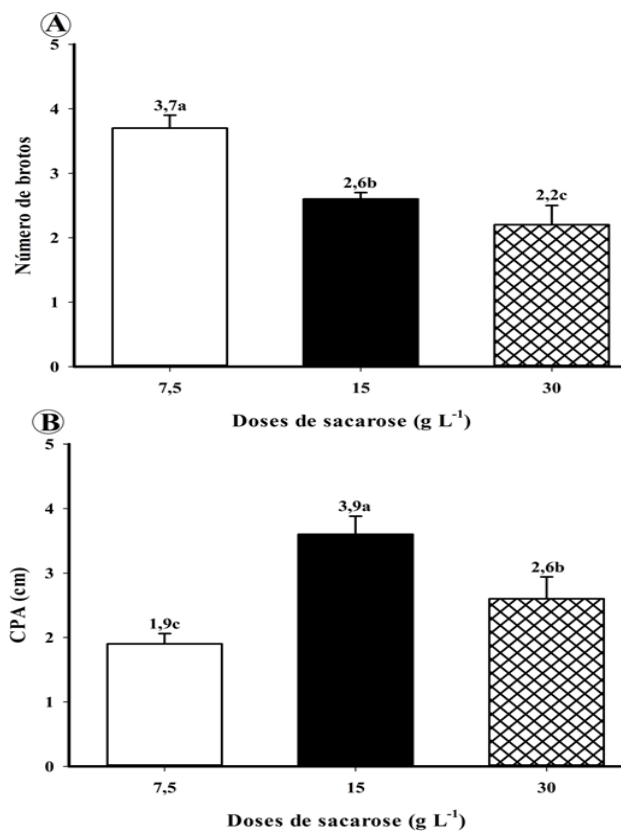


Maiores valores de comprimento da parte aérea (3,9 cm) e matérias secas foram observados em meio suplementado com 15 g de sacarose. Quanto ao número de brotos maior valor foi observado em cultivo suplementado com 7,5g de sacarose (3.7) (Figura 2).

Todavia, Silva et al. (2017), no cultivo de *Plectranthus amboinicus* em diferentes sistemas de ventilação natural e diferentes tipos de explantes, relataram que o sistema de ventilação com uma membrana com explante apical e sistema de ventilação com duas membranas com segmento nodal foram que proporcionam maior produção de biomassa.

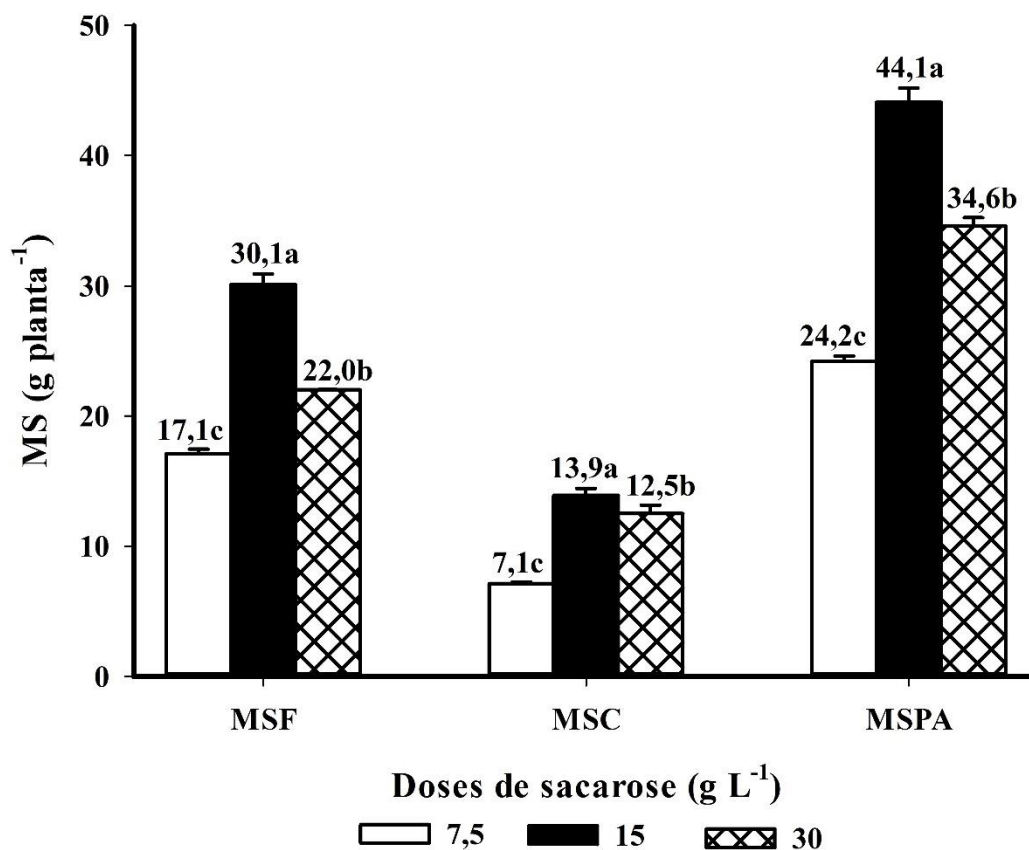
O uso de membranas porosas em meio suplementado com sacarose evidenciou crescimento diferenciado na regeneração de brotos e na expansão de folhas nas diferentes doses de sacarose. Pesquisas relatam que o uso e aumento de número de membranas nas tampas permitem aumento das trocas gasosas e redução da umidade, o que promove o crescimento das plantas (XIAO et al., 2011).

Figura 2. Número de brotos (A) e comprimento da parte aérea (B) de plântulas de *Origanum majorana* L. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes doses em combinação com sistema de ventilação natural com 4 membranas, aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022.



A concentração de sacarose afetou significativamente a matéria seca da plântula (Figura 3), as plântulas cultivadas no meio suplementado com 15 g L⁻¹ acumularam maiores matéria seca de folha, caule e da parte aérea.

Figura 3. Massa seca de folha, caule e parte aérea de plantas de *Origanum majorana* L. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose em combinação com sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas, aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022.



Estes resultados são similares aos obtidos em *Physalis angulata* (Solanaceae) cultivadas em meio MS com diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15; 22,5; e 30 g L⁻¹), onde maior crescimento ocorreu em meio suplementado com 15 g de sacarose (Santos et al., 2020). Portanto o acúmulo de matéria seca no cultivo *in vitro* resulta da interação entre a espécie de planta cultivada, composição do meio de cultivo, metabolismo de carboidratos e meio ambiente. Nicoloso et al. (2003) avaliaram o efeito de sacarose e fonte de carboidratos, e verificaram aumentos de número de brotos, comprimento e matéria seca da parte aérea com o aumento da sacarose no cultivo de *Pfaffia glomerata*, o que corrobora com os resultados observados no presente estudo.

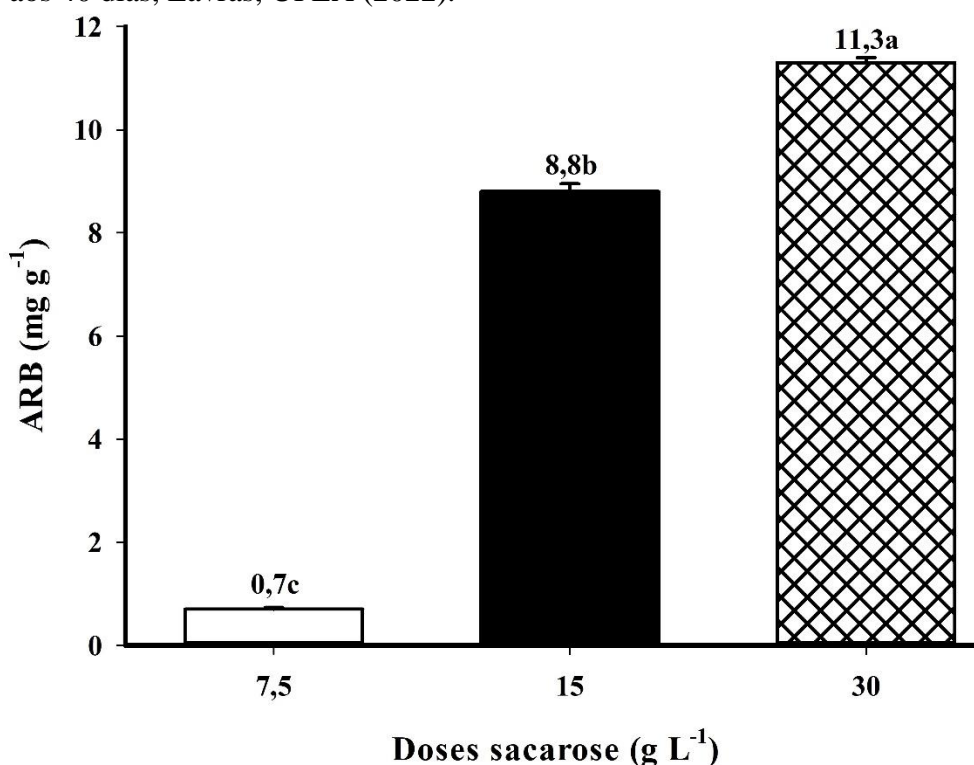
A micropropagação fotoautotrófica (sem adição de açúcar) tem sido bastante usada por promover o crescimento e fotossíntese, prevenir distúrbios morfológicos e fisiológicos e a alta sobrevivência na aclimatização (NGUYEN et al., 2016). No entanto, nem todas espécies de planta reagem positivamente ao cultivo *in vitro* fotoautotrófico, tendo em algum momento a necessidade de adição exógena de açúcar (fotomixotrófica). Monfort et al. (2015) verificaram efeito negativo no cultivo de *Ocimum selloi* sobre número de brotos, comprimento e matéria

seca na ausência de sacarose, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Todavia, resultados divergentes foram obtidos no cultivo de *Ochroma pyramidate* com diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 20 g) com a obtenção de melhor crescimento da parte aérea e matéria seca em meio sem adição de açúcar.

3.2. Quantificação de arbutina (ARB) no meio suplementado com doses de sacarose

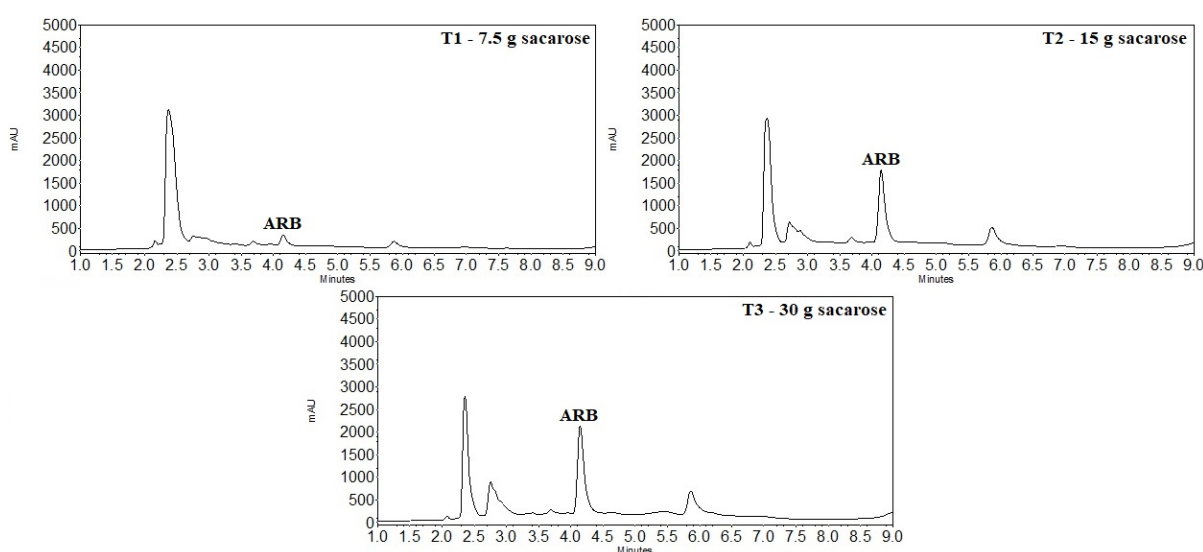
O cultivo de plântulas de *O. majorana in vitro* sobre diferentes concentrações de sacarose e sistema de ventilação com quatro membranas porosas apresentou efeito significativo no teor de arbutina (Figura 4). O teor de ARB em folhas provenientes de meio suplementado com 30g de sacarose (11.3 mg g^{-1}) foi maior do que no meio suplementado com 15g (8.8 mg g^{-1}). O teor de ARB no cultivo com 7,5g de sacarose apresentou-se abaixo do limite de quantificação estabelecido pelo método. Portanto a maior disponibilidade de açúcar no meio de cultura é importante para a produção de ARB nas folhas de *O. majorana*.

Figura 4. Quantificação de arbutina (ARB mg g^{-1}) nas folhas produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose em combinação com sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas, aos 40 dias, Lavras, UFLA (2022).



Não houve alteração no perfil químico registrado por CLAE-DAD a 220nm (figura 5). No entanto é possível observar a diferença quantitativa da arbutina pela intensidade do seu pico cromatográfico de acordo com a disponibilidade de sacarose.

Figura 5. Perfis cromatográficos registrados por CLAE - DAD a 220nm de extrato de folhas de *Origanum majorana* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose em combinação com sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas, aos 40 dias, Lavras (2022). T1 (7,5g), T2 (15g), T3 (30g)



Embora menor valor de sacarose (15g) disponível no meio de cultura tenha proporcionado maiores valores nas variáveis de crescimento, esta não foi suficiente para promover o incremento do teor de ARB nas folhas (Figura 4). Resultados similares foram descritos por Fortini et al, (2021) onde observaram no cultivo *in vitro* de *Vernonia condensata*, que adição de sacarose favoreceu o aumento de compostos fenólicos e flavonoides e que o aumento desses compostos era maior quando as plântulas estão sob sistema de ventilação natural.

A sacarose é uma importante substância resistente a doenças, ela não só fornece o esqueleto de carbono para a síntese de metabolitos, mas atua como sinais para induzir a defesa das plantas. O cultivo *in vitro* sem suplementação de uma fonte de carbono também pode alterar o metabolismo secundário das plantas. A sacarose pode funcionar como uma molécula sinalizadora e controlar vários processos metabólicos. É um fator importante que afeta a síntese de metabolitos secundários (SMEEKENS, HELLMANN, 2020). Kim et al. (2020) observaram um aumento flavonoides em plântulas de *Melissa officinalis* cultivadas *in vitro* com aumento da concentração de sacarose (50 a 300mM). Eles concluíram que a variação de sacarose causou

acumulo de determinados flavonoides, como uma forma de mecanismo de defesa contra stress osmótico.

3.3 Análise de crescimento sob comprimento de onda e sistema de ventilação Natural

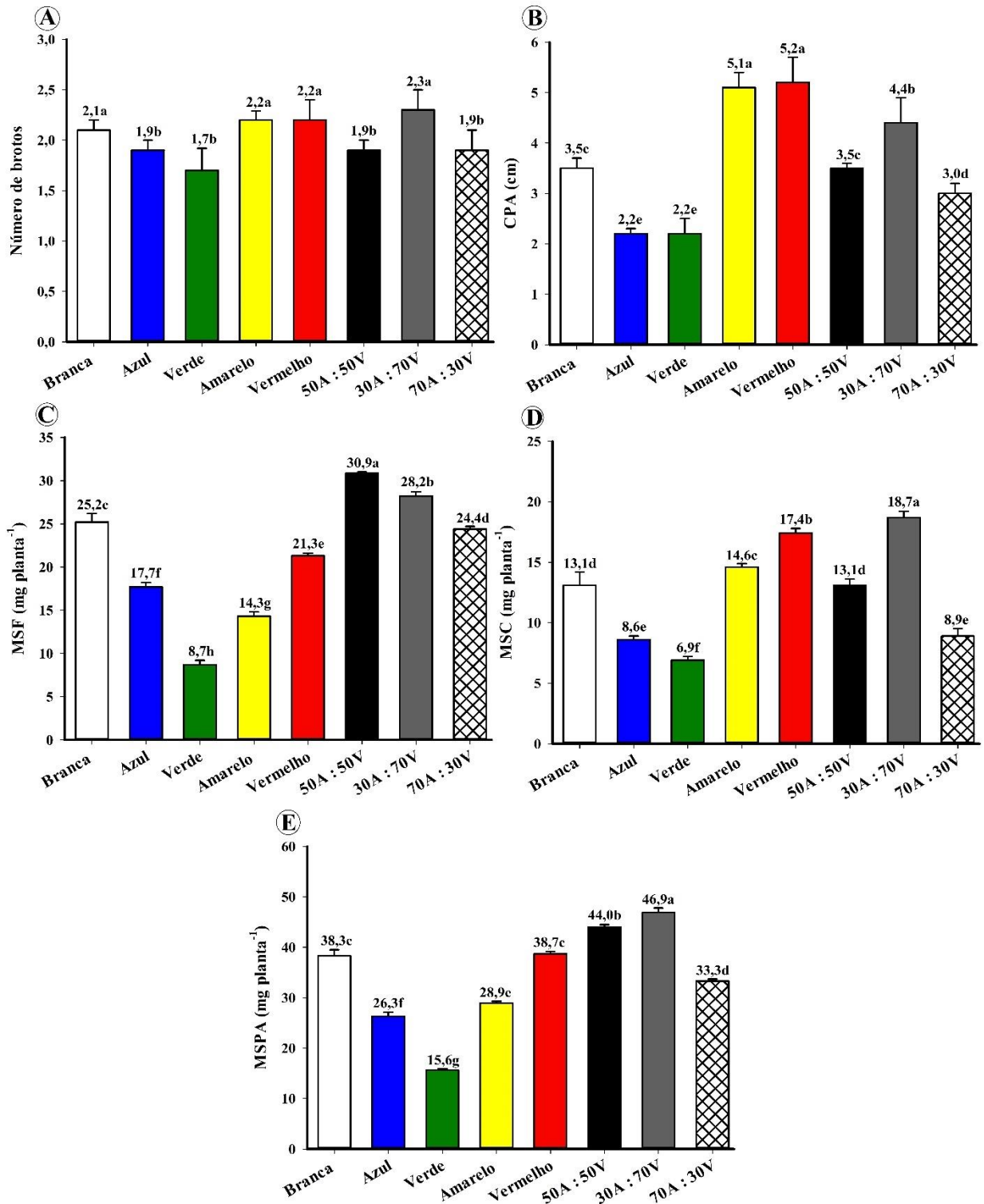
A qualidade de luz e o sistema de ventilação natural com quatro membranas afetaram significativamente o cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* (Figura 6 e 7). De forma visual plântulas cultivadas sob luz branca (BR) e combinação de luz azul e vermelha (50%A:50%V, 30%A:70%V, 70%A:30%V) apresentaram folhas maiores e de cor verde escura. Plântulas crescidas sob luz azul e verde apresentam crescimento reduzidos (folhas menores e caules finos).

A qualidade de luz não apresentou efeito significativo sobre o número de brotos produzidos pelas plântulas de manjerona. Maiores valores de CPA foram observados sob cultivo de luz vermelha (5.2cm) e menor valor observado sob luz verde (2.2cm) e azul (2.2cm).

Figura 6. Número de brotos e comprimento da parte aérea de plantas de *O. majorana* L. cultivadas *in vitro* em meio MS cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, com sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas (SVN4), aos 40 dias.



Figura 7. Número de brotos, comprimento da parte aérea, matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC), da parte aérea (MSPA), de plântulas de *Origanum majorana* L. oriundas de segmentos nodais cultivados *in vitro* sob diferentes espectros de luz em sistema de ventilação natural com 4 membranas porosas, aos 40 dias. Lavras, UFLA, 2022.



Valores de MSF e MSPA foram observados no cultivo sob combinação de luz azul e vermelha (50% A:50% V e 30% A:70% V) e o maior valor de MSC foi observado sob cultivo na

combinação 30%A:70%V. Resultados similares foram descritos por Moon et al. (2006) onde maior crescimento, peso fresco e número de brotos de *Tripterospermum japonicum* sob combinação de espectro de luz azul e vermelho (30%A:70%V) em frascos com tampas com sistema de ventilação. Segundo Saldanha et al. (2012) plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) cultivadas em frascos com membranas porosas apresentaram maior acúmulo de matéria seca de parte aérea e raízes, indicando a importância das trocas gasosas na morfogênese *in vitro*. O sistema de ventilação natural reduz a umidade relativa e o etileno dentro do frasco, com isso promove maior transpiração e absorção mineral das plantas *in vitro*, acarretando maior crescimento.

Todavia, contrariamente no cultivo *in vitro* de *Sacharum officinum* sob diferentes combinações de luz azul e vermelho (70%A:30%V) a combinação proporcionou maiores valores de massa fresca e número de brotos produzidos, reforçando deste modo que o uso de LEDs monocromáticos, a melhor proporção da mistura de LED azul e vermelho, e os efeitos e mecanismos associados à qualidade da luz nas plantas indicam que está relacionado com a espécie de planta ou cultivares (SILVA et al., 2014).

3.4 Pigmentos fotossintéticos sob comprimento de onda e sistema de ventilação Natural

A produção de pigmentos fotossintéticos foi influenciada significativamente pelos diferentes espectros de luz e sistema de ventilação natural com quatro membranas (Tabela 1). Para a fotossíntese, as plantas usam principalmente a luz dos comprimentos de onda de 400-500nm (azul) e 600-700nm (vermelho). No entanto, na presente pesquisa o cultivo de plântulas de *O. majorana* sob luz azul e branca apresentaram menor conteúdo de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides (Tabela 1).

Maiores valores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides ocorreram em plântulas cultivadas sob luz vermelha e luz verde. Resultados contrários foram descritos por Santos et al (2020) no cultivo fotomixotrófico (15g sacarose) de *Physalis angulata* e sistema de ventilação onde maiores valores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides foram observados sob cultivo em luz branca e combinação de luz azul e vermelha e menor valor de pigmentos foi observado sob luz vermelha. No entanto esses valores de conteúdo de pigmentos não tiveram diferenças significativas entre os diferentes espectros de luz, sugerindo dessa forma que o cultivo fotomixotrófico e diferentes espectros de luz não promoveu o crescimento da espécie.

Tabela 1. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Origanum majorana* L. cultivados *in vitro* sob diferentes espectros de luz e sistema de ventilação natural com quatro membranas, aos 40 dias. Lavras, UFLA 2022.

Espectros	Clorofila	Clorofila	Clorofila	Carotenoides
	<i>a</i>	<i>b</i>	Total	
	(mg /g MF)			
Branco	0,2e	0,08e	0,25d	0,08c
Azul	0,07f	0,02f	0,1g	0,02g
Verde	0,7b	0,19b	0,92b	0,17b
Amarela	0,5c	0,13c	0,58d	0,11e
Vermelha	1a	0,2a	1,22a	0,22a
50%A:50%V	0,3d	0,13c	0,46e	0,12d
30%A:70%V	0,5c	0,19b	0,66c	0,15c
70%A:30%V	0,3d	0,09d	0,45e	0,11e

No entanto na avaliação do sistema de ventilação, foi possível observar que este sistema promoveu maior teor de pigmentos fotossintéticos quando comparado em cultivos em diferentes espectros de luz sem sistema de ventilação (artigo 2 descrito anteriormente). Todavia, resultados contrários foram descritos por Lazzarini et al. (2019) no cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis* sob diferentes sistemas de ventilação, onde observaram uma diminuição no conteúdo dos pigmentos fotossintética com o aumento de número de membranas nas tampas. Os autores justificaram os resultados no aumento da evaporação de água devido ao sistema de ventilação, induzindo desta formação de stress hídrico, que pode causar baixa regulação da fotossíntese.

Resultados similares foram descritos por Larema et al. (2012) onde observaram aumento da concentração de pigmento fotossintéticos em cultivo de *Pfaffia glomerata* sob sistema de ventilação comparativamente as cultivadas sem sistema de ventilação. Muitos trabalhos também associam a maior disponibilidade de CO₂ dentro do frasco com o aumento dos teores de pigmentos fotossintéticos, como observado em *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al., 2012;) e *Lippia alba* (BATISTA et al., 2017).

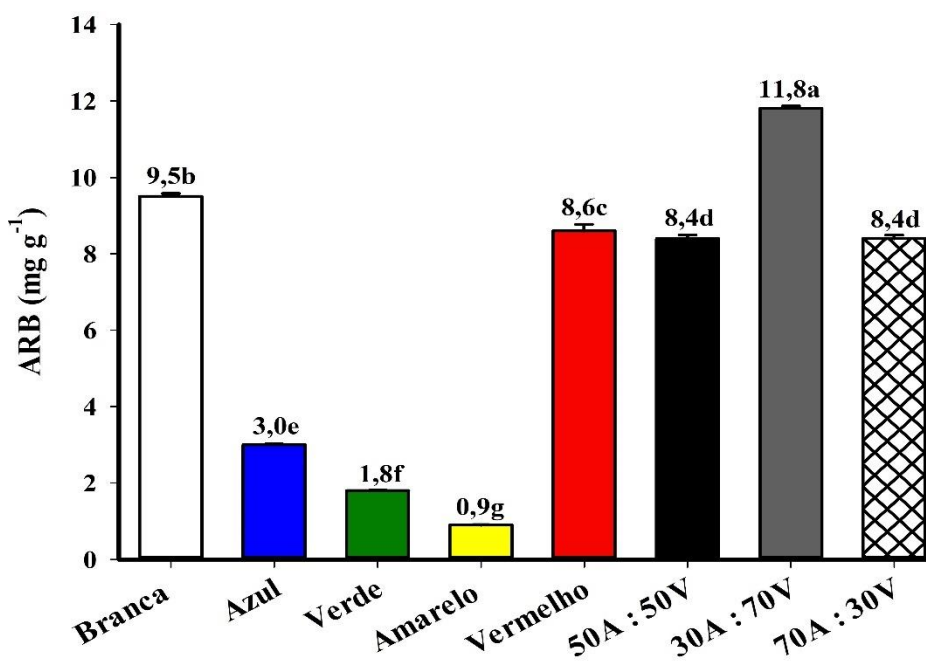
3.5 Quantificação de Arbutina (ARB) sob diferentes comprimentos de onda

O teor de arbutina foi significativamente afetada pelos diferentes espectros de luz no cultivo *in vitro* de *O. manjerona* (Figura 9 e 10). Maior teor de ARB (11.8 mg g⁻¹) foi produzido sob cultivo em espectro de combinação de luz vermelha e azul (30%A:70%V). A combinação de espectro de luz vermelha e azul apresentou efeito positivo na produção de ARB, pois

apresentaram maiores teor quando comparadas com a luz branca. O cultivo sob luz azul (3 mg g^{-1}) e verde (1.8 mg g^{-1}) diminuíram o teor de ARB produzido (Figura 8).

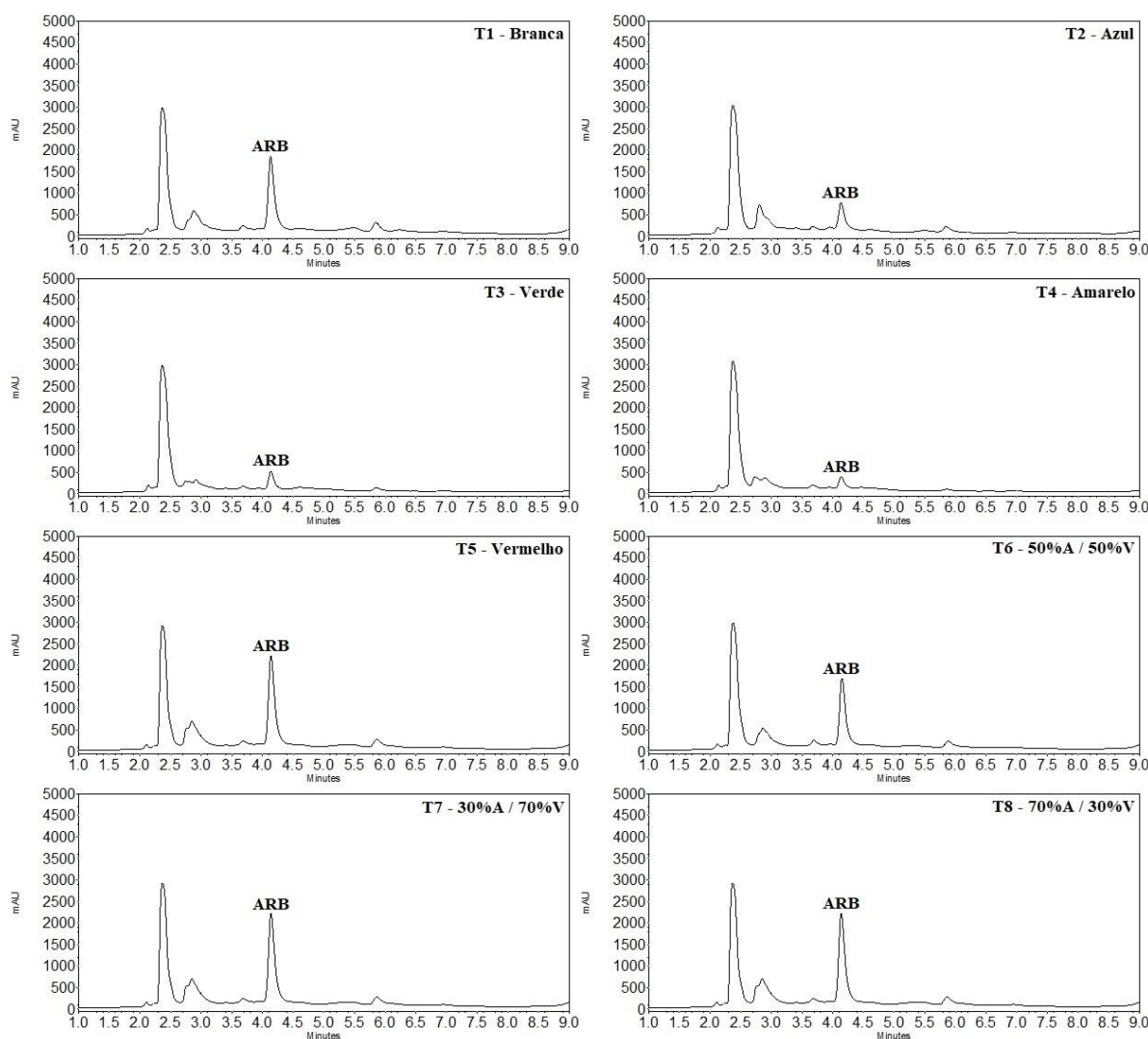
Os espectros de luz vermelha e azul são a fonte de luz primária que afeta o acúmulo de biomassa, alongamento do caule, achatamento das folhas, desenvolvimento do cloroplasto, abertura estomática e metabolismo secundário (DOU et al., 2017), sugerido desta forma que a luz vermelha monocromática e combinação de luz azul e vermelha tenham sido eficientes na produção e aumento de teor de ARB na manjerona.

Figura 8. Quantificação de ARB (mg g^{-1}) nas folhas produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* sob diferentes espectros de luz e sistema de ventilação natural com quatro membranas porosas, Lavras (2022)



Não houve alteração no perfil químico registrado por CLAE-DAD a 220nm (figura 9). No entanto é possível observar a diferença quantitativa da arbutina pela intensidade do seu pico cromatográfico de acordo com os diferentes espectros de luz associado ao sistema de ventilação com quatro membranas. No presente estudo ficou notório que o sistema de ventilação com quatro membranas reduziu o teor de arbutina produzido quando comparado com cultivo sob diferentes espectros de luz e sem sistema de ventilação (artigo 2 descrito anteriormente).

Figura 9. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE - DAD (quantificação de arbutina em folhas secas). TR ARB = 4,2 minutos. produzidas no cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* sob diferentes espectros de luz e sistema de ventilação com quatro membranas (SVN4), T1 (Branca), T2 (Azul), T3 (Verde) T4 (Amarelo), T5 (Vermelho), T6 (50A:50V), T7 (30A:70V), T8 (70A:30V)



O aumento de compostos fenólicos em ervas pode ser causado por múltiplas respostas à qualidade da luz, incluindo o aumento das atividades das principais enzimas metabólicas, levando a síntese aprimorada de metabolitos secundários. Portanto, é possível que a aplicação de luz vermelha e/ou azul suplementar possa aumentar o acúmulo de compostos fenólicos em algumas espécies de ervas, mas o efeito de aumento pode depender da espécie e dos compostos específicos (DOU et al., 2017).

O sistema de ventilação natural também apresenta efeito na produção de metabolitos secundários, Lazzarini et al. (2019) no cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis* sob diferentes sistemas de ventilação, onde observaram que o sistema com quatro membranas promoveu maior

acumulo de carvacrol e timol, mas menor teor de γ -terpineno e ρ -cymeno, realçam que o aumento ou diminuição de teor de compostos é específico e depende da espécie.

Plantas respondem ao ambiente de maneira distinta, alocando seus fotoassimilados para a biossíntese de elementos necessários à sua sobrevivência e adaptação às condições ambientais oferecidas pelas diferentes fontes de luz. Lobiuc et al. (2017), ao estudarem o efeito de LEDs vermelho, azul e branco na produção de compostos fenólicos e flavonoides em manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), observaram que os maiores valores foram obtidos com combinação dos LED vermelho e azul (30%A:70%V), corroborando dessa forma com os resultados obtidos na presente pesquisa.

4. CONCLUSÃO

Plântulas *in vitro* de *Origanum majorana* apresentam cultivo fotomixotrófico, sendo meio com 15g de sacarose e em sistema de ventilação natural com 4 membranas promoveu melhor crescimento. No entanto maior acumulo de arbutina foi favorecido em cultivo fotomixotrófico em meio suplementado com 30g de sacarose.

Sistema de ventilação e espectros de luz afetaram a crescimento, concentração de pigmentos fotossintéticos e acumulo de arbutina em plântulas de *Origanum majorana* L. A luz monocromática vermelha proporcionou maior comprimento da parte aérea e maior acumulo de biomassa foi induzido pelo espectro monocromática vermelho e azul e vermelho combinados na proporção de 30%A:70%V.

A produção de pigmentos fotossintéticos foi favorecida pelo espectro monocromática vermelha e acumulo de arbutina pela combinação da luz azul e vermelha 30%A:70%V. No entanto, menor produção e acumulo foi observada sob espectro monocromática azul.

5. REFERÊNCIAS

- ALDREY, A.; BLANCO, B.; BOGO, B.; CUENCA, B.; SÁNCHEZ, C.; LUQUERO, L.; OCAÑA, L.; MANDUJANO, M.; VIDAL, N. Photomixotropic and photoautotrophic micropropagation of *Phytophthora* resistant chestnut genotypes using liquid media. **Acta Horticulturae**. 1220, 2018.
- 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 (PCTOC)**, v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.
- BATISTA, D. S., CASTRO, K. M., SILVA, A. R., TEIXEIRA, M. L., SALES, T. A., SOARES, L. I.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; OTONI, W. C. Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, p. 276-282, 2016.
- BATISTA, D.S.; FELIPE, S.H.S.; SILVA, T.D.; CASTRO, K.M.; RODRIGUES, T.C.M.; MIRANDA, N.A. Light quality in plant tissue culture: does it matter. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 54, n. 3, p. 195-215, 2018.
- DOU, H.; NIU, G.; GU, M.; MASABNI, J. G. Effects of Light Quality on Growth and Phytonutrient Accumulation of Herbs under Controlled Environment. **Horticulturae**, v 3. n. 2, p. 36, 2017
- FU, B., J.I.; X.; ZHAO, M.; HE, F.; WANG, X.; WANG, Y.; PENGFEI, L.; NIU, L. The influence of light quality on the accumulation of flavonoids in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 544-549, 2016.
- KIM, S.; KIM, J.; KIM, N.; LEE, D.; LEE, H.; LEE, D.; KIM, K. H. Metabolomic Elucidation of the Effect of Sucrose on the Secondary Metabolite Profiles in *Melissa officinalis* by Ultraperformance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry his: **ACS Omega** v. 5, p. 33186–33195, 2020
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, p. 188-204, 2010.
- JEONG, B. R & SIVANESAN, I. Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. **Scientia Horticulturae** v. 236, p. 222–228, 2018
- LAREMA, L.; CRUZ, A.C.F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L.L.C.; OLIVEIRA, E.J.; VIEIRA, R.F.; OTONI, W.C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Tissue Org Culture**. 2012
- LOBIUC, A.; VASILACHE, V.; PINTILIE, O.; STOLERU, T.; BURDUCEA, M.; OROIAN, M.; ZAMFIRACHE, M. Blue and red led illumination improves growth and bioactive compounds contents in acyanic and cyanic *Ocimum basilicum* L. microgreens. **Molecules**, v. 22, n.1, p. 1-14, 2017

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; CÉLIO, M. M. F.; PINTO, J. E. B. P. Growth regulators affect the dry weight production, carvacrol and thymol content of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial crops and products**, v. 129, p. 35-44, 2019.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V.; DOS SANTOS, J.; SILVA, S. T.; DE CARVALHO, A. A.; 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. 1, p. 1-13, 2018.

MOON, H. K., PARK, S. K., KIM, Y. W., KIM, C.S., “Growth of Tsuru-rindo (*Tripterospermum japonicum*) cultured in vitro under various sources of light-emitting diode (LED) irradiation,” **J Plant Biol** 49, 174-179 (2006)

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

NGUYEN QT, XIAO Y, KOZAI T. Photoautotrophic micropropagation. In: Kozai T, Niu G, Takagaki M (eds) Plant Factory. **Academic Press**, pp 271–283. 2016

NHUT, D. T., TAKAMURA, T., WATANABE, H., MURAKAMI, A., MURAKAMI, K. AND TANAKA, M., “Sugar-free micropropagation of *Eucalyptus citriodora* using light-emitting diode (LEDs) and film-rockwool culture system,” **Environment Control Biol** v. 40, p. 147-155, 2002

PACHECO, F.V.; AVELAR, R.P.; ALVARENGA, I.C.A.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ALVARENGA, A.A.; PINTO, J.E.B.P. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 251-257, 2016.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M.A.; IGLESIAS-ANDREU, L.G.; BAUTISTA-AGUILAR, J.R. The Effect of light quality on growth and development of in vitro plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech**, p. 1-6, 2016.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; AZEVEDO, J.L.F.de; DIAS, L.L.C.; REGO, M.M.do; 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, p. 413-422, 2012.

SILVA, S.T.; PACHECO, F.V.; ALVARENGA, I.C.A.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERREIRA, C.P. Optimization of the protocol for the in vitro cultivation of *Piper aduncum* L. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 23, p. 3474, 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.

SILVA, M. M. A.; OLIVEIRA, A. L. B.; OLIVEIRA-FILHO, R. A.; GOUVEIA-NETO, A. S.; CAMARA, T. J. R.; WILLADINO, L. G. Effect of blue/red LED light combination on growth

and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets in vitro. **Proceedings of SPIE** Vol. 8947 89471X-2

SMEEKENS, S. & HELLMANN, H. A. Sugar sensing and signaling in plants. *Front. Plant Science*. v. 5, p. 113, 2014

SANTOS, G. C.; CARDOSO, F. P.; MARTINS, A. D.; PASQUAL, M.; OSSANI, P. C.; QUEIROZ, J. M.; REZENDE, R. A. L. S.; DÓRIA, J. EFEITO DA LUZ E SACAROSE NA MICROPROPAGAÇÃO FOTOAUTOTRÓFICA E FOTOMIXOTRÓFICA DE *Physalis angulata*. **Bioscience Journal** v. 36, n. 4, p. 1353-1367, 2020.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 105, n. 2, p. 144-158, 2011

XIAO, L.; SHIBUYA, T.; KATO, K.; NISHIYAMA, M.; KANAYAMA, Y. Effects of light quality on plant development and fruit metabolism and their regulation by plant growth regulators in tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 300, 2022

WANG, J.; LU, W.; TONG, Y.; YANG, Q. Leaf Morphology, Photosynthetic Performance, Chlorophyll Fluorescence, Stomatal Development of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Exposed to Different Ratios of Red Light to Blue Light. *Front. Plant Science*. v.7, p. 250. 2016.

ZAREI, A.; BEHDARVANDI, B.; DINANI, E. T.; MACCARONE, J. Cannabis sativa L. photoautotrophic micropropagation: a powerful tool for industrial scale in vitro propagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 57:932–941.