

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS –
AGRONOMIA - CAMPUS RIO VERDE

**APLICAÇÃO DE QUALIDADES DE LUZ LEDs NO
DESEMPENHO MORFOFISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO
DE PLÂNTULAS DE *Brosimum gaudichaudii* Tréc. *In vitro***

Autora: Érica Letícia Gomes Costa
Orientador: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

RIO VERDE, GO
Fevereiro, 2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS –
AGRONOMIA - CAMPUS RIO VERDE

**APLICAÇÃO DE QUALIDADES DE LUZ LEDs NO
DESEMPENHO MORFOFISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO
DE PLÂNTULAS DE *Brosimum gaudichaudii* Tréc. *In vitro***

Autora: Érica Letícia Gomes Costa
Orientador: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

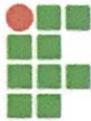
RIO VERDE, GO
Fevereiro, 2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

C837a Costa, Érica Letícia Gomes
Aplicação de qualidades de luz LEDs no desempenho morfofisiológico e bioquímico de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. in vitro / Érica Letícia Gomes Costa; orientador Fabiano Guimarães Silva; co-orientador Aurélio Rubio Neto. -- Rio Verde, 2020.
56 p.

Dissertação (em Mestrado em Ciências Agrárias - Agronomia) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2020.

1. Mama-cadela. 2. qualidade espectral. 3. cultura de tecidos vegetais. 4. taxa fotossintética. 5. furanocumarinas. I. Silva, Fabiano Guimarães, orient. II. Neto, Aurélio Rubio, co-orient. III. Título.



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Érica Letícia Gomes Costa

Matrícula: 2018102310140044

Título do Trabalho: Aplicação de qualidades de luz LEDs no desempenho morfofisiológico e bioquímico de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* tréc. *in vitro*

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: Pesquisa inovadora e com dados exclusivos.

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 15/03/2021

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 10/04/2020.
Local Data

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
CAMPUS RIO VERDE - GO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA

ATA Nº/171 BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte, às 09:00h (nove horas), reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva (Orientador), Dra. Priscila Ferreira Batista (Avaliadora interna) e Prof^a. Dra. Fernanda dos Santos Farnese (Avaliadora externa). Sob A Presidência do Primeiro, em sessão pública realizada no Auditório da DPPG do IF Goiano – Campus Rio Verde, para procederem a avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, de autoria de **ÉRICA LETÍCIA GOMES COSTA** discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida a (o) autor (a) da Dissertação para, em 40 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o (a) examinado (a), tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi **APROVADA**, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA**, na área de concentração Produção Vegetal Sustentável no Cerrado, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCA-AGRO da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, esta ata perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60** (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Dissertação em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e para constar, eu, Vanilda Maria Campos, secretária do PPGCA-AGRO, lavrei a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.

Dra. Priscila Ferreira Batista
Avaliadora interna
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof^a. Dra. Fernanda dos Santos Farnese
Avaliadora externa
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva
Presidente da banca
IF Goiano – Campus Rio Verde

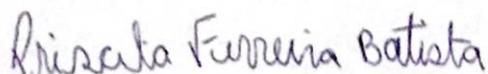
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-AGRONOMIA

APLICAÇÃO DE QUALIDADE DE LUZ LEDs NO
DESEMPENHO MORFOFISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE
PLÂNTULAS DE *Brosimum gaudichaudii* Tréc. *In vitro*

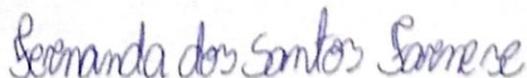
Autora: Érica Letícia Gomes Costa
Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

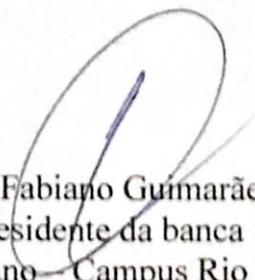
APROVADA em, 20 de fevereiro de 2020.



Dra. Priscila Ferreira Batista
Avaliadora interna
IF Goiano – Campus Rio Verde



Profª. Dra. Fernanda dos Santos Farnese
Avaliadora externa
IF Goiano – Campus Rio Verde


Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva
Presidente da banca
IF Goiano – Campus Rio Verde

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e cada vitória ao longo desse percurso, também por cada dificuldade, as quais me serviram de aprendizado. Obrigada, pois nos tempos de angústia, seu amor e seu conforto se fizeram presentes. Sem o Senhor nada seria possível, és realmente o maior responsável por essa conquista.

Ao meu pai Edmilson, por ser minha inspiração e por ter incentivado desde a infância a seguir os meus sonhos. À minha mãe Eliêne, pelas orações e por compreender que a distância era necessária. A vocês dois, agradeço por dedicarem a vida a mim e minha irmã.

À minha irmã Karoliny, por motivar os meus sonhos e acreditar que tudo daria certo. Obrigada, pelas conversas que aliviavam a saudade quando ela mais apertava. É muito bom saber que posso contar com você.

Ao meu namorado Thales, por todo o apoio, compreensão e auxílio direto em todas as análises laboratoriais.

Ao orientador Prof. Fabiano Guimarães Silva e ao Prof. Aurélio Rúbio Neto, agradeço pela oportunidade, confiança e pelo incentivo o meu crescimento profissional.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Nutrição, Biotecnologia e Anatomia Vegetal, por toda a amizade e companheirismo.

Ao Instituto Federal Goiano, pela colaboração e estrutura do programa de Pós-Graduação. À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Érica Letícia Gomes Costa, filha de Edmilson Aparecido da Costa e Eliêne Gomes Abadio, nasceu no dia 17 de abril de 1996, na cidade de Goianésia-GO.

Em fevereiro de 2014, ingressou no curso de Ciências Biológicas no Instituto Federal Goiano – Campus Ceres, graduando-se em dezembro de 2017.

Em março de 2018, ingressou como estudante de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
REVISÃO DE LITERATURA.....	14
<i>Brosimum gaudichaudii</i> Tréc.....	14
Propagação <i>in vitro</i>	15
A luz no cultivo <i>in vitro</i>	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	18
OBJETIVOS	23
Geral.....	23
Específicos	23
CAPÍTULO I.....	24
Resumo	24
Introdução	26
Materiais e Métodos.....	28
Material vegetal	28
Estabelecimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Brosimum gaudichaudii</i>	28
Condições de crescimento.....	28
Análise de parâmetros biométricos	30
Estimativa do conteúdo de clorofila, flavonóis, antocianinas e índice de balanço de nitrogênio	30
Medições de taxa fotossintética <i>in vitro</i>	30
Medições da fluorescência da clorofila <i>a</i>	31
Caracterização morfoanatômica e histoquímica	31
Análise fitoquímica	32
Análises estatísticas	33
Resultados.....	33

Luz vermelha influência no comprimento da parte aérea de plântulas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> <i>in vitro</i>	33
Luz azul promove o incremento no conteúdo de antocianinas.....	34
Características da fluorescência da clorofila em plântulas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> <i>in vitro</i>	35
Qualidade de luz afeta a morfoanatomia e histoquímica de <i>Brosimum gaudichaudii</i>	36
Luz azul e proporções de azul e vermelha aumentam os níveis de psoraleno e bergapteno.....	40
Relações entre as variáveis	41
Discussão	43
Conclusão.....	48
Referências Bibliográficas	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Comprimento da parte aérea (CPA), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), área foliar (AF), massa seca foliar (MSF), massa seca do caule (MSC), massa seca total (MST) e área foliar específica (AFE) de plântulas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> aos 50 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob diferentes qualidades de luz LEDs.	33
Tabela 2. Características da fluorescência da clorofila. Rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (ΦP_o), rendimento quântico de dissipação de energia na forma de calor (ΦD_o), rendimento quântico de transporte de elétrons (ψE_o), absorção de energia luminosa por centro de reação (ABS/RC), fluxo de transporte de elétrons (além da Qa-) por centro de reação em $t = 0$ ($E_{t=0}/RC$), dissipação de energia na forma de calor por centro de reação (Dio / RC) e índice de desempenho fotossintético (PIABS).	36
Tabela 3. Espessura do mesofilo (Esp. Mes), Epiderme adaxial (Ad ep), Epiderme abaxial (Ab Ep), Parênquima paliçádico (PP), Parênquima esponjoso (SP) e Espessura foliar (Esp. Fol) de plântulas de <i>Brosimum gaudichaudii in vitro</i> após 50 dias de cultivo sob diferentes qualidades de luz	38

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Distribuição relativa do espectro de LEDs utilizados no cultivo *in vitro* de *Brosimum gaudichaudii*..... 29
- Fig. 2.** Conteúdo de antocianinas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (A), conteúdo de clorofila ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (B), conteúdo de flavonóis ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (C) e índice de balanço de nitrogênio (NBI) (D) em folhas de *Brosimum gaudichaudii* desenvolvidas *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz LED. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%. As barras indicam o erro padrão das médias 34
- Fig. 3.** Taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%. As barras indicam o erro padrão das médias 35
- Fig. 4.** Anatomia foliar de *Brosimum gaudichaudii* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. (A, B) branco, (C, D) azul, (E, F) vermelho, (G, H) A/V 1:1, (I, J) A/V 3:1. (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. (Xy) xilema. (Ph) Floema. (Fi) Fibra. (CP) Parênquima clorofiliano. Setas pretas indicam alterações na estrutura celular. 37
- Fig. 5.** Histoquímica de folhas de *Brosimum gaudichaudii* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. (A - C) branco, (D - F) azul, (G - I) vermelho, (J - L) A/V 1:1, (M - O) A/V 3:1. (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas verdes indicam acúmulo de amido. Setas azuis indicam acúmulo de proteínas. Setas amarelas indicam produção de compostos fenólicos..... 39
- Fig. 6.** Acúmulo de amido, proteínas e compostos fenólicos em folhas de *Brosimum gaudichaudii in vitro* após 50 dias de cultivo. (A) Amido (μm^2); (B) proteínas (μm^2) e (C) compostos fenólicos (μm^2). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%. %. As barras indicam o erro padrão das médias 40
- Fig. 8.** Concentração e rendimento de psoraleno (A e B), bergapteno (C e D) em tecidos foliares de *Brosimum gaudichaudii* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%. %. As barras indicam o erro padrão das médias. 41
- Fig. 9.** Análise de componentes Principais em folhas de *Brosimum gaudichaudii* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz por 50 dias..... 43

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÖES E UNIDADES

cm	Centímetro	-
cm ²	Centímetro ao quadrado	-
mm	Milímetro	-
AFE	Área foliar específica	-
°C	Graus Celsius	-
CO ₂	Dióxido de Carbono	-
µmol	Micromol	-
µmol m ⁻² s ⁻¹	Micromol por metro quadrado por segundo	-
µM	Micrômetro	-
NaOCl	Hipoclorito de sódio	-
pH	Potencias de hidrogênio	-
LED	Diodo de emissão de luz	-
A/V 1:1	Azul/vermelho proporção 1:1	-
A/V 3:1	Azul/vermelho proporção 3:1	-
PI _{ABS}	Índice de desempenho fotossintético	-
PhiDo	Rendimento quântico da dissipação de energia na forma de calor	-
Dio/RC	Fluxo específico de dissipação de energia ao nível das clorofilas da antena	-
BAP	6-benzilaminopurina	-
DFFF	Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos	-
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência	-
µL	Microlitro	-
nm	Nanômetro	-
µg g	micrograma por grama	-

RESUMO

COSTA, ÉRICA LETÍCIA GOMES COSTA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano - Campus Rio Verde. Fevereiro de 2020. **Aplicação de qualidades de luz LEDs no desempenho morfofisiológico e bioquímico de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. in vitro.** Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva, Coorientadores: Dr. Aurélio Rubio Neto, Dra. Fernanda dos Santos Farnese e Dra. Ana Helena Januário.

Pertencente à família Moraceae a espécie *Brosimum gaudichaudii* Tréc. possui furanocumarinas com potencial terapêutico no tratamento do vitiligo. Os metabólitos bergapteno e psoraleno presentes principalmente nas raízes dessa espécie destacam-se pelo efeito melanocítico no combate ao vitiligo. Nesse contexto, objetivou-se avaliar e potencializar o crescimento, as características fisiológicas, anatômicas e bioquímicas de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. in vitro sob diferentes de qualidades de luz. Utilizou-se diodos emissores de luz (LEDs), nos comprimentos de onda branco (400-700nm), azul (400-490 nm), vermelho (600-700 nm) e combinações diferentes de iluminação com LED azul (A) e vermelho (V): A/V 1:1 e A/V 3:1. Segmentos nodais foram cultivados em tubos de 50 mL com meio MS 100%, contendo ágar, com adição de 30 µM de benzilaminopurina (BAP), 3% de sacarose, sob fotoperíodo de 16h. Após 50 dias de implantação dos tratamentos as plântulas foram submetidas a avaliações biométricas, de pigmentos, eficiência fotossintética, análises anatômicas, histoquímicas e cromatográficas. Verificou-se que a luz azul e associação de A/V 3:1 são mais satisfatórias para a produção de bergapteno, melhor taxa fotossintética e conteúdo de antocianinas, a qualidade de luz A/V 1:1 influenciou positivamente somente na produção do psoraleno. Para a obtenção de ambos os metabólitos e obtenção de plantas com melhor crescimento indica-se a luz A/V 3:1.

Palavras-chave: Mama-cadela; qualidade espectral; cultura de tecidos vegetais; taxa fotossintética; furanocumarinas.

ABSTRACT

COSTA, ÉRICA LETÍCIA GOMES COSTA. Goiano Federal Institute of Education, Science, and Technology -IF Goiano - Rio Verde Campus. February 2020. **Application of LED light qualities in the morphophysiological and biochemical performance of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. *in vitro*.** Advisor: Dr. Fabiano Guimarães Silva, Co-advisor: Dr. Aurélio Rubio Neto, Dra. Fernanda dos Santos Farnese and Dra. Ana Helena Januário.

Belonging to the family Moraceae the species *Brosimum gaudichaudii* Tréc. has furanocoumarins with therapeutic potential in the vitiligo treatment. The metabolites baptapene and psoralen present mainly in the roots of this species stand out for their melanocytic effect in combating vitiligo. In this context, the objective was to evaluate and enhance the growth, physiological, anatomical and biochemical characteristics of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. *in vitro* under different light qualities. Light-emitting diodes (LEDs) were used in the wavelengths white (400-700nm), blue (400-490 nm), red (600-700 nm) and different lighting combinations with blue (A) and red LEDs (V): A / V 1: 1 and A / V 3: 1. Nodal segments were cultured in 50 mL tubes with 100% MS medium, containing agar, with the addition of 30 µM benzylaminopurine (BAP), 3% saccharose, under a 16h photoperiod. After 50 days of treatment imposition, the seedlings were submitted to biometric, pigment, photosynthetic efficiency, anatomical, histochemical and chromatographic analyzes. It was found that the blue light and A/V 3:1 proportion are more satisfactory for bergaptene production, better photosynthetic rate and anthocinins content, the quality of A/V 1:1 light influenced only the psoralen production. For obtaining both metabolites and obtaining plants with better growth, the A/V 3:1 light is indicated.

Keywords: Mama-cadela; spectral quality; plant tissue culture; photosynthetic rate; furanocoumarins.

INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado brasileiro destaca-se por ser um dos 25 hotspots de biodiversidade globais, apresentando diversidades de espécies endêmicas distribuídas ao longo dos mais de 200 milhões de hectares que ocupam a parte central do Brasil [1]. Apesar de apresentar grande variedade de espécies endêmicas, o Cerrado tem se destacado também pelo aumento da perda de habitat nos últimos 50 anos. Nas últimas décadas, as atividades antrópicas nas áreas naturais do Cerrado aumentaram progressivamente, causando a fragmentação e destruição de extensas áreas de cobertura original desse importante ecossistema [2].

A flora do Cerrado é a mais rica do mundo, ocupando cerca de 24% das terras brasileiras, constituindo patrimônio imensurável de recursos naturais. Essa diversidade de espécies tem ganhado destaque principalmente pelo potencial econômico, sendo utilizadas para fins alimentícios, ornamentais, artesanais e medicinais [3]. Apesar da diversidade de espécies com finalidades medicinais, ainda existe escassez em estudos sobre os usos terapêuticos dessas espécies, sendo de suma importância o levantamento de informações, visto que essas espécies podem contribuir para a descoberta de princípios ativos que podem ser promissores pelas atividades terapêuticas e suas representatividades [4].

Entre essas espécies, a *Brosimum gaudichaudii* Tréc., conhecida como mamacadeira é uma espécie da família Moraceae, encontrada em todo o Cerrado brasileiro. Essa espécie destaca-se pela produção de compostos fenólicos como taninos e flavonoides que desempenham atividade antioxidante e furanocumarinas incluindo psoraleno e bergapteno, componentes que são encontrados em concentrações mais altas no córtex das raízes e são empregados na fitoterapia para tratar doenças relacionadas à pele, como o vitiligo e a psoríase [5,6]. A obtenção da matéria-prima ocorre através da colheita das raízes resultando na destruição completa da planta, levando a rápida depleção. Além disso, suas sementes são consideradas recalcitrantes, tornando difícil o armazenamento. Sabendo-se do uso extensivo, alta demanda por material vegetal da espécie pela medicina tradicional e as dificuldades encontradas na conservação de sementes, remete a necessidade do investimento em técnicas que visem evitar essa depleção [7].

A aplicação da tecnologia de cultivo de plantas *in vitro* destaca-se por oferecer vantagens sobre o cultivo convencional, apresentando alternativas para o aprimoramento da cultura em curto período de tempo, facilitando a multiplicação e obtenção de matéria-

prima de alta qualidade e controlando fatores ambientais [8]. Entre inúmeros fatores, a luz destaca-se como um dos parâmetros mais importantes para o sucesso da produção de plantas *in vitro*, visto que participa ativamente dos processos metabólicos das plantas [9]. A cultura *in vitro* possibilita alterar a qualidade da luz (comprimento de onda), irradiância (fluxo de fótons) e fotoperíodo sendo importante ferramenta na produção de compostos de interesse, visto que as plantas apresentam diversas respostas de crescimento e produção de metabólitos secundários quando expostas a diferentes condições de luz no cultivo *in vitro* [10].

Em geral, lâmpadas fluorescentes costumavam ser utilizadas como padrão no cultivo de plantas *in vitro*, no entanto, esse sistema apresenta desvantagens como alto consumo de energia elétrica, aumento da temperatura e espectros heterogêneos [11]. Portanto, o uso de diodos emissores de luz (LEDs) como fontes de luz é uma alternativa para melhorar a qualidade do cultivo *in vitro*, visto que são considerados fontes mais potentes, econômicas, duráveis e podem apresentar comprimentos de onda específicos [12].

Foi comprovado que o uso dos LEDs tem se tornado uma fonte de luz, amplamente pesquisada pelas suas vantagens, que impulsionam e controlam diversas respostas de desenvolvimento das plantas [13] tais como germinação de sementes, alongamento da parte aérea, incremento do sistema radicular, expansão foliar, síntese de pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores [14], além de promover incremento na produção de metabólitos secundários em raízes e brotações [15].

Apesar da diversidade de estudos com o uso de LEDs no cultivo de plantas *in vitro*, estudos usando LEDs como principal fonte de luz durante o cultivo de nativas do Cerrado ainda são escassos. Diante do exposto, o presente estudo proporcionará contribuições de suma importância para a compreensão das características morfofisiológicas e o conteúdo de metabólitos secundários das plantas de *Brosimum gaudichaudii* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades e proporções de luz LEDs, promovendo alternativas para a propagação e estimulação da produção de metabólitos secundários importantes.

REVISÃO DE LITERATURA

Brosimum gaudichaudii Tréc.

A espécie *Brosimum gaudichaudii* Tréc. conhecida popularmente como mamacadela, mamica de cadela ou inharé, possui porte arbustivo podendo atingir entre quatro e dez metros de altura. Sua frutificação dá-se de setembro a novembro e caracteriza-se por frutos lactescentes. Nativa do cerrado brasileiro, pertence à família Moraceae, na qual estão inclusos cerca de 75 gêneros e mais de 1550 espécies, podendo ser encontradas nas regiões tropicais [16]. Amplamente distribuída no Cerrado *sensu stricto*, Cerradão, também sendo encontrada em Campo Sujo, Mata Atlântica, Caatinga e Floresta decídua, ganhando destaque por ser a única espécie da família presente no Cerrado [17].

As inflorescências dessa espécie são compostas por pequenas flores, que muito se assemelham aos frutos jovens. O fruto possui de 2,0 a 3,0 cm de diâmetro e quando maduro apresenta coloração amarela, superfície verrucosa e polpa latescente. As sementes possuem tegumento, apresentam alta germinação, embora, expressem comportamento fisiológico do tipo recalcitrante e curta longevidade, que impede a conservação do germoplasma (Fig. 1) [18].



Fig. 1. *Brosimum gaudichaudii*. Inflorescência (A); Planta com fruto (B); Frutos e sementes (C).

As plantas de *Brosimum gaudichaudii* são caracterizadas pela produção abundante de látex. Além disso, as raízes, casca do caule e folhas tem sido amplamente empregadas na medicina tradicional para o tratamento do vitiligo. Estudos fitoquímicos demonstraram que as ações medicinais dessa espécie se deve a presença de duas furanocumarinas, psoraleno e bergapteno. Além do uso no tratamento de doenças cutâneas, há relatos de

que as folhas da espécie apresentam ainda ação depurativa, contribuindo para a melhoria da circulação sanguínea, tratamento de gripes, resfriados, bronquites [6].

A *Brosimum gaudichaudii*, é uma espécie que tem apresentado interesse comercial no cultivo, tanto pela produção de frutos comestíveis, que são empregados na culinária regional na fabricação de sorvetes e geleias, como pela extração dos princípios ativos presentes no córtex da raiz [19]. A demanda pelos compostos produzidos pela espécie ganhou destaque na indústria de fitoterápicos e laboratórios farmacêuticos, acarretando na prática extrativista, diminuindo assim o número de plantas presentes na natureza, visto que, a obtenção destes compostos se dá pela retirada completa da planta. Outro fator limitante a sobrevivência da espécie é a expansão da fronteira agrícola, que tem ganhado cada vez mais espaço nas áreas do Cerrado, podendo com isso corroborar com a extinção da espécie nesse domínio fitogeográfico. Assim, estudos visando desenvolver técnicas que promovam a conservação e propagação desta espécie podem minimizar a perda da biodiversidade [1].

Até o momento, métodos usuais para obtenção de mudas da *B. gaudichaudii* ainda são limitantes, tendo-se pouco conhecimento relacionado ao cultivo e propagação dessa espécie nativa do Cerrado, sendo as informações sobre a propagação imprescindíveis para o sucesso do cultivo. O protocolo de propagação da espécie tem sido um fator limitante na produção de mudas *in vitro* e, dentre os fatores limitantes, cita-se a curta longevidade das sementes, a elevada contaminação endógena e o desenvolvimento lento das plântulas, dificultando a produção de explantes para as demais etapas do cultivo *in vitro* [20].

Propagação *in vitro*

A propagação *in vitro* é uma técnica com grandes aplicações na agricultura, sendo conhecida principalmente por meio da micropropagação, técnica baseada no princípio da totipotência, ao qual, cada célula vegetal possui o potencial genético para regenerar uma planta inteira mantendo o genótipo idêntico da planta matriz, possibilitando assim a propagação em massa de plantas com alta qualidade genética e fitossanitária [21]. O ambiente de cultivo é o fator relevante para a propagação das espécies *in vitro*, visto que possibilita aperfeiçoar a interação entre fatores bióticos (hormonais e genéticos) e abióticos (luminosidade, temperatura, nutrição), resultando na produção de plantas geneticamente superiores.

Nos últimos anos, há interesse crescente pelas técnicas de propagação *in vitro*, visto que oferecem um sistema viável para a multiplicação em massa de espécies de plantas raras e ameaçadas. Em comparação as demais técnicas, a propagação *in vitro* contribui significativamente na produção de mudas de espécies nativas com potencial ecológico, medicinal e industrial que possuem dificuldades de propagação pelos métodos convencionais, visto que possibilita o controle dos fatores abióticos como a temperatura, luz (intensidade, fotoperíodo e comprimento de onda), umidade relativa e composição atmosférica dentro dos frascos de cultivo [22].

Embora a propagação *in vitro* apresente diversas vantagens, o ambiente de cultivo pode ocasionar limitações para o bom desenvolvimento das plântulas, visto que existem vários fatores que regulam crescimento, desenvolvimento, morfogênese e metabolismo fisiológico das plântulas *in vitro*, entre eles a luz é o mais importante [23]. Os sistemas de iluminação das salas de cultivo devem fornecer luz na região espectral envolvida na fotossíntese e nas respostas fotomorfogênicas, no entanto, as lâmpadas comumente utilizadas são fluorescentes e contém comprimentos de onda desnecessários, ocasionando ainda a emissão de calor, acarretando estresse para as plântulas *in vitro* [24].

A luz no cultivo *in vitro*

As características morfológicas e fisiológicas das plantas cultivadas *in vitro* são reguladas por diversos fatores ambientais, como temperatura, umidade, dióxido de carbono e luz. A qualidade de luz (diferentes comprimentos de onda), irradiância (fluxo de fótons) e o fotoperíodo são fatores primordiais para o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* [25]. A luz é percebida pelas plantas através de diferentes tipos de fotorreceptores, incluindo fitocromos (comprimento de onda vermelho e infravermelho próximo), criptocromos e fototropinas (comprimento de onda azul e ultravioleta-A) [26]. Portanto, o desenvolvimento das plântulas *in vitro* pode ser melhorado ajustando a quantidade, qualidade e fotoperíodo no ambiente de crescimento.

As lâmpadas fluorescentes são comumente utilizadas como fonte de luz convencional para o cultivo *in vitro*, no entanto, são muitas vezes ineficientes pela emissão de altas temperaturas, baixa eficiência de fluência da luz e distribuições espectrais inadequadas para o crescimento ideal das plântulas cultivadas *in vitro* [27]. Por outro lado, os LEDs possuem vantagens técnicas sobre os sistemas de iluminação tradicionais, incluindo a capacidade de controlar a composição espectral, superfícies

emissoras relativamente frias e saída de fótons lineares a corrente de entrada elétrica e comprimento de onda único e eficaz para a morfogênese e fotossíntese [28]. Assim, a seleção de uma fonte de luz ideal torna-se essencial no sistema de produção de plantas *in vitro*, que depende totalmente de fontes de luz artificiais.

A luz participa ativamente dos processos metabólicos das plantas. As mesmas não respondem apenas a intensidade da luz, mas também a sua qualidade, sendo importante ferramenta para promover o incremento na produção de compostos de interesse. A qualidade espectral pode ser usada para controlar o crescimento e a morfogênese das plântulas *in vitro* e influência significativa na morfogênese das plantas tem sido observada com uso de luzes LEDs na cultura *in vitro*. No entanto, as respostas das plantas variam muito para as diferentes qualidades de luz, visto que as absorções desse espectro são específica [24].

As luzes LEDs mais usadas na micropropagação de diferentes espécies de plantas são luz branca, azul, vermelha e combinação de azul e vermelho (1:1). Ambas as qualidades de luz produzem efeitos diferentes na morfologia, fisiologia e metabolismo das plantas. Numerosos processos como fotossíntese, fotomorfogênese, germinação, acúmulo de biomassa e síntese fitoquímica podem ser controlados e otimizados modulando esses comprimentos de onda da luz [29].

A absorção do espectro de luz é específica para as plantas. A luz vermelha desempenha papel importante no controle do cloroplasto, crescimento de pecíolos, caule e raízes, promove alterações na anatomia e desempenha papel importante no desenvolvimento do aparelho fotossintético, enquanto a luz azul regula principalmente o crescimento das plantas, a expansão das folhas, abertura estomática, fotossíntese, acúmulo de pigmentos e ácido fenólico [26,30–32]. As combinações de luz azul e vermelha têm promovido crescimento, aumento da massa fresca/seca, crescimento radicular, aumento da área foliar, da biossíntese de carboidratos (amido, sacarose, glicose e frutose), síntese de pigmentos fotossintéticos, conteúdo de proteínas e metabólitos [33–35].

Embora haja relatos sobre a propagação da espécie *B. gaudichaudii* [7], inexistem estudos com ênfase no ambiente de cultivo como alternativa para a estimulação de parâmetros fisiológicos e a produção de metabólitos secundários. Diante do exposto, a utilização de diferentes espectros de luz LEDs no cultivo da espécie torna o presente trabalho de grande relevância para o entendimento do comportamento fisiológico e conteúdo de fitoquímicos em plântulas da espécie cultivadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- [1] S. Rezende Oliveira, M. Souza Lima-Ribeiro, A.O. de Souza, C.E. dos Santos, K. Vergilio Silva, M. Zórtea, F.A. Guimarães Guilherme, F.R. de Melo, S.E. Silva Carneiro, W. Vaz Silva, A. Ribeiro Morais, Are protected areas effective in preserving anurans and promoting biodiversity discoveries in the Brazilian Cerrado?, *J. Nat. Conserv.* 52 (2019) 125734. <https://doi.org/10.1016/J.JNC.2019.125734>.
- [2] G.B. de Azevedo, A.V. Rezende, G.T. de Oliveira Sousa Azevedo, E.P. Miguel, F. de Gois Aquino, J.S.C. Bruzina, L.S.C. de Oliveira, R.S. Pereira, P.E. Teodoro, Woody biomass accumulation in a Cerrado of Central Brazil monitored for 27 years after the implementation of silvicultural systems, *For. Ecol. Manage.* 455 (2020) 117718. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2019.117718>.
- [3] A.R. Nunes, A.L.M. Rodrigues, D.B. de Queiróz, I.G.P. Vieira, J.F.C. Neto, J.T.C. Junior, S.R. Tintino, S.M. de Morais, H.D.M. Coutinho, Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 189 (2018) 119–123. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2018.10.013>.
- [4] D.A. Ribeiro, L.G.S. de Oliveira, D.G. de Macêdo, I.R.A. de Menezes, J.G.M. da Costa, M.A.P. da Silva, S.R. Lacerda, M.M. de A. Souza, Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil, *J. Ethnopharmacol.* 155 (2014) 1522–1533. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2014.07.042>.
- [5] M.C. de Morais, P.H.G. de Almeida, N.L.O. Ferreira, R.L. Arruda, L.L. Borges, O. de Freitas, E.C. da Conceição, Validation of a photostability indicating method for quantification of furanocoumarins from *Brosimum gaudichaudii* soft extract, *Rev. Bras. Farmacogn.* 28 (2018) 118–123. <https://doi.org/10.1016/J.BJP.2017.12.002>.
- [6] W. de S.C. Quintão, T. Alencar-Silva, M. de F. Borin, K.R. Rezende, L.C. Albernaz, M. Cunha-Filho, T. Gratieri, J.L. de Carvalho, L.C.L. Sá-Barreto, G.M. Gelfuso, Microemulsions incorporating *Brosimum gaudichaudii* extracts as a topical treatment for vitiligo: *In vitro* stimulation of melanocyte migration and pigmentation, *J. Mol. Liq.* 294 (2019) 111685. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111685>.

- [7] M.F. Carneiro, E.F. Duarte, J.C.M. Nogueira, L.M. Vargas, S.T. Sibov, E.C. Conceição, Multiplicação da planta medicinal *Brossimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) em meio de cultura, *Rev. Fitos.* 13 (2019) 61. <https://doi.org/10.17648/2446-4775.2019.671>.
- [8] R. Us-Camas, G. Rivera-Solís, F. Duarte-Aké, C. De-la-Peña, *In vitro* culture: An epigenetic challenge for plants, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 118 (2014) 187–201. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0482-8>.
- [9] N. Miler, D. Kulus, A. Woźny, D. Rymarz, M. Hajzer, K. Wierzbowski, R. Nelke, L. Szeffs, Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: a study on plant quality and cost reduction, *In Vitro. Cell. Dev. Biol. - Plant.* 55 (2019) 99–108. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9939-5>.
- [10] I.C.A. Alvarenga, F.V. Pacheco, S.T. Silva, S.K.V. Bertolucci, 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 Cult.* 122 (2015) 299–308. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>.
- [11] K. Kepenek, Photosynthetic Effects of Light-emitting Diode (LED) on *in Vitro*-derived Strawberry (*Fragaria x Ananassa* cv. Festival) Plants Under *in Vitro* Conditions, *Erwerbs-Obstbau.* 61 (2019) 179–187. <https://doi.org/10.1007/s10341-018-00414-0>.
- [12] M. Cioć, A. Szewczyk, M. Żupnik, A. Kalisz, B. Pawłowska, LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 132 (2018) 433–447. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1340-2>.
- [13] Y. Shen, S. Guo, G. Zeng, Effects of a new-type inner-canopy illuminant and light quality on spring wheat growth in CELSS, *Acta Astronaut.* 166 (2020) 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2019.07.031>.
- [14] F. Bantis, S. Smirnakou, T. Ouzounis, A. Koukounaras, N. Ntagkas, K. Radoglou, Current status and recent achievements in the field of horticulture with the use of light-emitting diodes (LEDs), *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 235 (2018) 437–451. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.058>.
- [15] Z. Ghaffari, M. Rahimmalek, M.R. Sabzalian, Variation in the primary and secondary metabolites derived from the isoprenoid pathway in the *Perovskia* species in response to different wavelengths generated by light emitting diodes

- (LEDs), Ind. Crops Prod. 140 (2019) 111592. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111592>.
- [16] G.L. Pozetti, *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento, Rev. Ciências Farm. Básica e Apl. (2005) 159–166.
- [17] W. de S.C. Quintão, T. Alencar-Silva, M. de F. Borin, K.R. Rezende, L.C. Albernaz, M. Cunha-Filho, T. Gratieri, J.L. de Carvalho, L.C.L. Sá-Barreto, G.M. Gelfuso, Microemulsions incorporating *Brosimum gaudichaudii* extracts as a topical treatment for vitiligo: *In vitro* stimulation of melanocyte migration and pigmentation, J. Mol. Liq. 294 (2019) 111685. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.111685>.
- [18] R.C. Mayrinck, T. Arantes, A. Vaz, A.C. Davide, Classificação fisiológica de sementes florestais quanto à tolerância à dessecação e ao comportamento no armazenamento, CERNE. 22 (2016) 85–92. <https://doi.org/10.1590/01047760201622012064>.
- [19] M.R. Lima, P.D.A. Santos, C.E.S. Silveira, D. Palhares, L.A.R. Pereira, Cultivo in vitro de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae), Rev. Bras. Plantas Med. (2014). https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_005.
- [20] D.B. Silva, R.F. Vieira, M.C.T. Cordeiro, E.B.C. Pereira, A. V. Pereira, Propagação vegetativa de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (mama-cadela) por estacas de raízes, Rev. Bras. Plantas Med. 13 (2011) 151–156. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000200005>.
- [21] E. Martínez-Estrada, B. Islas-Luna, J.A. Pérez-Sato, J.J. Bello-Bello, Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreanum* Lind., Sci. Hortic. (Amsterdam). 249 (2019) 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.053>.
- [22] A.M. Mali, N.S. Chavan, *In vitro* rapid regeneration through direct organogenesis and *ex-vitro* establishment of *Cucumis trigonus* Roxb.-An underutilized pharmaceutically important cucurbit, Ind. Crops Prod. 83 (2016) 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.036>.
- [23] L. Chen, K. Zhang, G. Xiao-chen, H. Wang, Y. Gao, X. Wang, Z. Zeng, Y. Hu, Effects of different LEDs light spectrum on the growth , leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of potato plantlets *in vitro* and minituber production after transplanting in the greenhouse, J. Integr. Agric. 18 (2020) 108–119. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62633-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62633-X).

- [24] D.S. Gupta, B. Jatothu, Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis, *Plant Biotechnol. Rep.* 7 (2013) 211–220. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>.
- [25] X. Ma, Y. Wang, M. Liu, J. Xu, Z. Xu, Effects of green and red lights on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*, *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 190 (2015) 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.006>.
- [26] M.T. Naznin, M. Lefsrud, M.O.K. Azad, C.H. Park, Effect of different combinations of red and blue led light on growth characteristics and pigment content of *in vitro* tomato plantlets, *Agriculture.* 9 (2019) 196. <https://doi.org/10.3390/agriculture9090196>.
- [27] I. Monostori, M. Heilmann, G. Kocsy, M. Rakszegi, M. Ahres, S.B. Altenbach, G. Szalai, M. Pál, D. Toldi, L. Simon-Sarkadi, N. Harnos, G. Galiba, É. Darko, LED lighting – modification of growth, metabolism, yield and flour composition in wheat by spectral quality and intensity, *Front. Plant Sci.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00605>.
- [28] M. Dogan, The effectiveness of light emitting diodes on shoot regeneration *in vitro* from shoot tip tissues of *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. and *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne, *Biotech. Histochem.* (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1670359>.
- [29] C. Arena, T. Tsonev, D. Doneva, V. De Micco, M. Michelozzi, C. Brunetti, M. Centritto, S. Fineschi, V. Velikova, F. Loreto, The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.), *Environ. Exp. Bot.* 130 (2016) 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.014>.
- [30] Y. Xu, Y. Liang, M. Yang, Effects of Composite LED Light on Root Growth and Antioxidant Capacity of *Cunninghamia lanceolata* Tissue Culture Seedlings, *Sci. Rep.* 9 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46139-2>.
- [31] H. Li, Z. Xu, C. Tang, Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 103 (2010) 155–163. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9763-z>.
- [32] A.P. Gazolla, F.M.L.M.J. Curado, R.C.N. Pedroso, L.C.K. Filho, J. de F. Sales, M.

- Rosa, A.C. Costa, P.M. Pauletti, A.H. Januário, F.G. Silva, The influence of light quality on phenolic acid and biflavonoid production in *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings grown *in vitro*, Aust. J. Crop Sci. 11 (2017) 528–534. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.05.p314>.
- [33] L.G. Izzo, C. Arena, V. De Micco, F. Capozzi, G. Aronne, Light quality shapes morpho-functional traits and pigment content of green and red leaf cultivars of *Atriplex hortensis*, Sci. Hortic. (Amsterdam). 246 (2019) 942–950. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.076>.
- [34] K.S. Shin, H.N. Murthy, J.W. Heo, E.J. Hahn, K.Y. Paek, The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants, Acta Physiol. Plant. 30 (2008) 339–343. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0128-0>.
- [35] M.A. Ramírez-Mosqueda, L.G. Iglesias-Andreu, I.J. Luna-Sánchez, Light quality affects growth and development of *in vitro* plantlet of *Vanilla planifolia* Jacks, South African J. Bot. 109 (2017) 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.01.205>.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar e potencializar as respostas morfoanatômicas, fisiológicas, biométricas e o processo de produção de metabólitos por meio do cultivo *in vitro* de plântulas de *Brosimum gaudichaudii*, verificando o efeito de diferentes qualidades e proporções de luz LED, para determinar a melhor alternativa de potencialização na produção de plântulas e metabólitos nas condições *in vitro*.

Específicos

- Analisar o comportamento das plântulas de *B. gaudichaudii* cultivadas sob diferentes qualidades e proporções de luz LED subsidiando futuros estudos com a propagação *in vitro* e *ex vitro* da espécie;
- Relacionar o crescimento e o desempenho fisiológico das plantas em resposta as diferentes qualidades e proporções de luz LED;
- Investigar como as qualidades e proporções de luz LED afetam a modulação das respostas anatômicas e histoquímicas;
- Relacionar a produção dos metabólitos bergapteno e psoraleno em resposta as faixas espectrais utilizadas;
- Determinar a melhor qualidade luminosa para o cultivo das plantas de *B. gaudichaudii in vitro*;

CAPÍTULO I

Aplicação de qualidades de luz LEDs no desempenho morfofisiológico e bioquímico de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. *in vitro*

Resumo: A *Brosimum gaudichaudii* conhecida como mama-cadela, é uma espécie de relevância para área medicinal frente a presença de furanocumarinas. O cultivo *in vitro* dessa espécie representa uma estratégia para a produção em larga escala e obtenção de matéria-prima de qualidade. A combinação de diferentes qualidades de luz LEDs pode influenciar o crescimento, morfofisiologia e a produção de metabólitos secundários desta espécie em condições de cultivo *in vitro*. Sendo assim, objetivou-se investigar como a aplicação de diferentes qualidades de luz LEDs pode impactar nas características morfofisiológicas e bioquímicas desta espécie sob LEDs branco, azul, vermelho e combinações de azul e vermelho nas proporções 1:1 e 3:1 nas condições *in vitro*. Para isso, segmentos nodais foram cultivados em tubos de 50 mL com meio MS 100%, sob $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16h por 50 dias e, posteriormente, submetidos a avaliações biométricas, de pigmentos, eficiência fotossintética, análises anatômicas, histoquímicas e cromatográficas. Verificou-se que as plântulas sob luz azul e A/V 3:1 apresentaram evidências de mecanismos antioxidantes e maior taxa fotossintética, bem como maior produção e rendimento de bergapteno. Quanto a produção e rendimento de psoraleno foi maximizado quando plântulas foram cultivadas sob luz A/V 1:1. Plântulas sob luz branca apresentaram comprometimento da funcionalidade do aparato fotossintético e plântulas sob luz vermelha apresentaram as menores taxas fotossintéticas e características de síndrome da luz vermelha. Assim sendo, o cultivo *in vitro* com espectros de azul e A/V 3:1 são os mais adequados por possibilitar o equilíbrio entre o comportamento fisiológico, morfológico, histoquímico e bioquímico em plântulas de *B. gaudichaudii* nas condições *in vitro*.

Palavras-chave: Cultura de tecidos; Cerrado; Qualidade espectral; Aparato fotossintético; Metabolismo secundário.

CHAPTER 1

LED light qualities application in the morphophysiological and biochemical performance of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. *in vitro*

Abstract: *Brosimum gaudichaudii*, known as mama-cadela, is a species of relevance for the medical field because of its furanocoumarins presence. The *in vitro* cultivation of this species represents a strategy for large-scale and obtaining quality raw material. The combination of different LED light qualities can influence the growth, morphophysiology and secondary metabolites production of this species under *in vitro* culture conditions. Thus, the objective was to investigate how different LED light qualities application can impact the morphophysiological and biochemical characteristics of this species under white, blue, red LEDs and combinations of blue and red in the proportions 1:1 and 3:1 under the conditions *in vitro*. For this, nodal segments were grown in 50 mL tubes with 100% MS medium, under $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 16h for 50 days and, subsequently, subjected to biometric, pigment, photosynthetic efficiency, anatomical analysis, histochemical and chromatographic. It was found that seedlings under blue and A/V 3: 1 light showed evidence of antioxidant mechanisms and higher photosynthetic rate, as well as higher bergaptene production and yield. The psoralen production and yield was maximized when seedlings were grown under A/V light 1: 1. Seedlings under white light showed a compromise in the photosynthetic apparatus functionality and seedlings under red light showed the lowest photosynthetic rates and characteristics of red light syndrome. Therefore, *in vitro* cultivation with blue and A / V 3: 1 spectra are the most suitable for allowing the balance between the physiological, morphological, histochemical and biochemical behavior in seedlings of *B. gaudichaudii* under *in vitro* conditions.

Keywords: Tissue culture; Cerrado; Spectral quality; Photosynthetic apparatus; Secondary metabolism.

Introdução

No Brasil, abordagens científicas sobre o cultivo de espécies medicinais do Cerrado ainda são limitadas, mesmo sendo um bioma brasileiro extremamente diversificado e heterogêneo, apenas 8% das 55.000 espécies de plantas catalogadas foram estudadas para compostos bioativos e apenas 1.100 dessas espécies foram avaliadas por suas propriedades medicinais [1,2]. Dentre as espécies endêmicas pouco estudadas, destaca-se a *Brosimum gaudichaudii*, espécie com propriedades medicinais e que corre risco de extinção, por suas sementes serem recalcitrantes, limitando assim a conservação do germoplasma. A espécie *B. gaudichaudii* Trecul. pertence à família Moraceae, popularmente conhecida como mama-cadela, tem apresentado interesse comercial no cultivo, por suas propriedades medicinais. O uso da espécie destaca-se pela presença de compostos fenólicos, tais como taninos, flavonoides e furanocumarinas, sendo as furanocumarinas (psoraleno e bergapteno) empregadas no tratamento de doenças cutâneas como o vitiligo [3,4].

Com base na informação que as furanocumarinas são compostos presentes principalmente nas raízes da *B. gaudichaudii* e que a obtenção desses compostos acarretam na extração da planta por completa, buscar a aplicação de novos métodos biotecnológicos no cultivo dessa espécie pode ser uma alternativa plausível para a obtenção do material vegetal *in vivo* [5]. Provando que órgãos não usuais como folhas, podem apresentar aumento da produção de metabólitos secundários quando estratégias bem conhecidas de biotecnologia de plantas são aplicadas, visando assim, aumentar a produção desses metabólitos secundários de interesse, não sendo necessário a retirada da planta por completa, tornando a obtenção desses compostos mais sustentável.

A técnica do cultivo *in vitro*, além da produção de mudas, também possibilita o incremento na produção de compostos bioativos a partir de material vegetal *in vitro* promovendo a conservação *ex situ*, visto que o material vegetal *in vitro* pode ajudar a reduzir a destruição de plantas naturais para obtenção de material natural [6]. A luz é um fator que participa ativamente nesse processo metabólico das plantas, sendo possível alterar a qualidade da luz (comprimentos de onda, fluxo de fótons e fotoperíodo) para que as plantas apresentem diferentes respostas ao crescimento e produção de metabólitos de acordo com as diferentes condições de luz no ambiente de cultivo [7]. A irradiância com fótons de diferentes comprimentos de onda é um componente abiótico essencial

exigido pelas plantas para fotossíntese, crescimento e o acúmulo de produtos do metabolismo secundário [8].

Recentemente, estudos focados no efeito da qualidade da luz na fotomorfogênese das plantas e em informações sobre os fotorreceptores envolvidos nesse processo têm ganhado destaque. Desta forma, a luz não serve apenas como fonte de energia para a fixação de CO₂ por fotossíntese, mas também como entrada de sinalização complexa para modular a fisiologia e o desenvolvimento das plantas, sendo necessário que as plantas interpretem corretamente as informações da luz através da ação de fotorreceptores [9]. Para a obtenção de informações detalhadas dos diferentes comprimentos de onda de luz que entra, as plantas utilizam classes de fotorreceptores, incluindo os fitocromos (PHYs) que percebem luzes vermelha/vermelha distante (600-750 nm); criptocromos (CRYs), fototropinas (PHOTs), proteínas de ligação à flavina (ZEITLUPE) para luz azul/ UV-A (320-500) e UVRs para luz UV-B (280-320), que regulam distintas respostas fotomorfogênicas das plantas à qualidade de luz, recebendo e traduzindo sinais [10,11].

As características morfológicas, anatômicas e metabólicas têm se diferido com a utilização das luzes LEDs, e com isso modulando as respostas de acordo com cada espécie analisada [12,13]. Deste modo, tem-se a hipótese que plântulas de *B. gaudichaudii* cultivadas *in vitro* possam apresentar transformações em suas características morfofisiológicas e metabólicas frente as diferentes qualidades de luz. Dado todo o exposto e a escassez de estudos *in vitro* sobre esta espécie, objetivou-se investigar a implicação da qualidade de luz obtida por LEDs sobre as características morfofisiológicas e metabólicas de plântulas de *B. gaudichaudii* cultivadas *in vitro*.

Sendo assim, testou-se o efeito do uso de lâmpadas LEDs monocromáticas e combinações delas como componente da qualidade de luz no ambiente de cultivo. O respectivo trabalho visa proporcionar contribuições que ampliam o entendimento do comportamento de plântulas da espécie *B. gaudichaudii* no ambiente *in vitro*, visando aumentar a produção de furanocumarinas em órgãos que não são atrativos para a extração dos compostos, promovendo assim incremento da produção desses metabólitos em órgão como folhas. Além disso, o trabalho apresenta resultados inéditos referente a produção de bergapteno e psoraleno em órgãos perenes e de fácil coleta e o entendimento do comportamento morfofisiológico de uma espécie nativa do Cerrado cultivada em ambiente *in vitro*, promovendo assim, informações científicas relevantes sobre a capacidade das plântulas de *B. gaudichaudii* em adaptarem-se às variações da qualidade de luz fornecidas por lâmpadas LEDs no ambiente *in vitro*.

Materiais e Métodos

Material vegetal

Frutos maduros de mama-cadela foram coletados entre setembro e novembro de 2018 de plantas adultas, no município de Montes Claros de Goiás (16° 10'8 "S, 51° 27' 12" W, 412 m de altitude). Após a coleta dos frutos, os mesmos foram despolidos para obtenção das sementes, que foram mantidas por 24 horas em sala fria a (18 ± 3°C) até a semeadura. Posteriormente, as sementes foram semeadas em bandejas plásticas, contendo substrato comercial Bioplant®. As bandejas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 3°C durante 45 dias para obtenção dos explantes.

Estabelecimento *in vitro* de plântulas de *Brosimum gaudichaudii*

Aos 45 dias de semeadura, plântulas de *B. gaudichaudii* sadias e homogêneas foram selecionadas e segmentos nodais de aproximadamente 2,0 cm contendo duas brotações foram utilizados para o estabelecimento *in vitro*. Os segmentos foram mantidos em água com três gotas de detergente (Tween 20) por 20 minutos. Em seguida, em fluxo laminar foram imersos em álcool etílico a 70% por um minuto; hipoclorito de sódio comercial - NaOCl a 50% por 30 minutos e depois enxagues três vezes em água autoclavada.

Depois da desinfestação, os segmentos nodais foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio MS [14] com 100% da concentração de sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de ágar, 2 g L⁻¹ de carvão ativado e 30 µM de 6-benzilaminopurina (BAP). O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da adição do agente gelificante. O meio de cultivo foi autoclavado a 120°C por 20 min. para posteriormente ser utilizado para a inoculação. Os tubos contendo os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 h a 50 µmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 ± 3°C, durante 30 dias.

Condições de crescimento

Após 30 dias, os explantes foram selecionados e cultivados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio MS 100% da concentração de sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de ágar, 2 g L⁻¹ de carvão ativado e 30 µM de 6-benzilaminopurina (BAP).

Posteriormente foram transferidos para um ambiente exposto à irradiação contínua de diferentes faixas espectrais: branca (400-700nm), azul (400-490 nm), vermelho (600-700 nm) e combinações diferentes de iluminação com LED azul (A) e vermelho (V): A/V 1:1 e A/V 3:1. As condições específicas de luz foram fornecidas por tubos de diodos emissores de luz (LED's) de 20W (Lanao serie Tubes, China) (Fig. 1) com densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) fixada em $100 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e $40 \pm 10\%$ de umidade relativa.

A qualidade espectral foi determinada mediante utilização do espectroradiômetro portátil USB2000 (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA), e os dados coletados foram processados pelo *software* SpectraSuite. A radiação fotossinteticamente ativa foi determinada pela utilização do sensor PAR, modelo APG-SQ-316 (Apogee, North Logan, UT, USA).

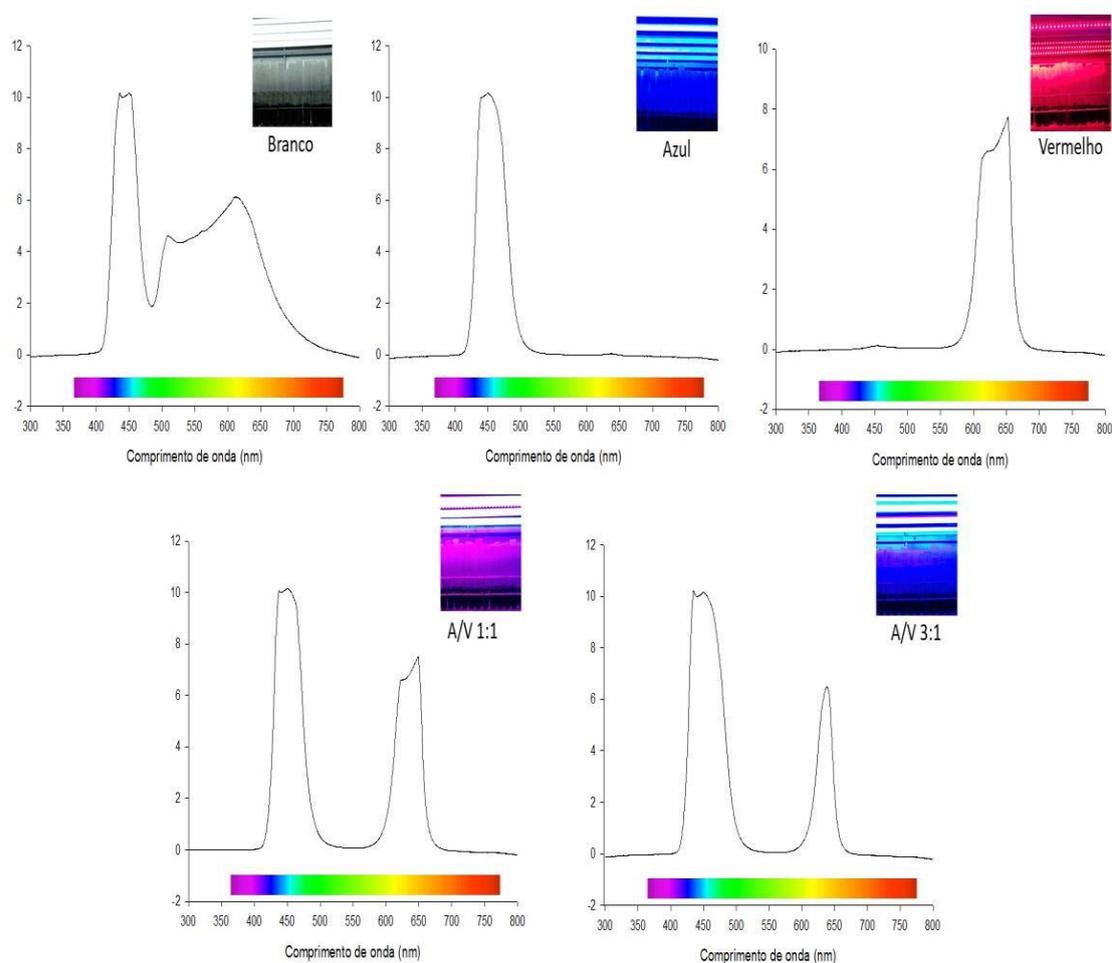


Fig. 1. Distribuição relativa do espectro de LEDs utilizados no cultivo *in vitro* de *Brosimum gaudichaudii*.

As plântulas foram cultivadas por 50 dias sob as condições de diferentes qualidades de luz. As avaliações biométricas e fisiológicas foram realizadas após 50 dias de cultivo utilizando 5 repetições por tratamento.

Análise de parâmetros biométricos

Determinou-se o comprimento da parte aérea (cm), diâmetro do caule (mm), número de folhas, área foliar (cm²), área foliar específica (AFE) e matéria seca de folhas, caules e total. A área foliar foi analisada usando ImageJ[®] (Rasband, WS; US ImageJ. Bethesda, MD, EUA). Para determinação das variáveis de biomassa, as plântulas foram secas a 35°C até atingirem peso constante. A AFE foi obtida a partir de área foliar em cm² / matéria seca foliar (g).

Estimativa do conteúdo de clorofila, flavonóis, antocianinas e índice de balanço de nitrogênio

Os índices de clorofilas e de flavonoides (flavonóis e antocianinas) foram determinados por meio do sensor Dualex 4 Scientific (Force-A, Orsay, França), com base nos espectros de excitação da fluorescência da clorofila [15]. O sensor opera com feixes UV de excitação a 357 nm (absorção máxima para os flavonóis), verde a 520 nm (absorção para antocianinas) e um feixe vermelho de referência a 650 nm (máximo para clorofila). Adicionalmente foi estimado o índice de balanço de nitrogênio (IBN), obtido pela relação entre clorofilas e flavonóis [16]. Para esta avaliação foram realizadas leituras em pontos do terço médio da porção adaxial das folhas.

Medições de taxa fotossintética *in vitro*

As avaliações de taxa fotossintética foram realizadas conforme a metodologia proposta por Costa et al. [17] para plantas *in vitro*, sendo o próprio recipiente de cultivo a câmara de medição, que permitiu a mensuração de toda a planta. Plântulas foram mantidas por oito horas no escuro (durante a noite) antes da análise, foram expostas por 60 minutos na irradiância de crescimento e imediatamente avaliadas. As medições foram realizadas em sala climatizada, utilizando o conjunto analisador de trocas gasosas da Qubit Systems (Kingston, ON, Canadá). Sendo o ar de referência obtido a partir de um cilindro de CO₂/N₂, com concentração padrão de 400 µmol mol⁻¹. O fluxo de ar ajustado para 300 mL min⁻¹, temperatura do ar de referência mantida em 25 ± 1°C e a umidade

relativa foi ajustada para $60 \pm 5\%$. A irradiância de medição utilizada foi de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Medições da fluorescência da clorofila *a*

As medições da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas usando o fluorômetro portátil FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments; Drasov, Czech Republic). As plântulas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos para oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons das folhas. Posteriormente, sob ausência de radiação fotossinteticamente ativa, as plântulas foram rapidamente retiradas dos tubos e submetidas a pulso de $3000 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz azul (450 nm) medindo-se a fluorescência mínima (F_o) em 50 μs quando todos os centros de reação FSII estão abertos e definido como o passo O, seguida pelo passo J (a 2 ms), o passo I (a 30 ms) e a fluorescência máxima (F_m) quando todos os centros de reação PSII estão fechados, conhecido como passo P. Estes valores foram utilizados para calcular vários índices bioenergéticos do fotossistema II, como rendimento quântico efetivo de conversão da energia fotoquímica (F_v/F_o), rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (ΦP_o), rendimento quântico: a probabilidade, $t=0$, de um excitón aprisionado mover um elétron pela cadeia transportadora de elétrons após Q_a^- (ψ_o), rendimento quântico do transporte de elétrons (ψE_o), rendimento quântico da dissipação de energia na forma de calor (ΦD_o), rendimento quântico médio de fotoquímica primária (ΦP_{av}), índice de desempenho fotossintético (PIABS), fluxo específico de absorção de energia luminosa (ABS/RC), taxa de captura máxima do FSII (TR_o/RC), fluxo de transporte de elétrons (além da Q_a^-) por centro de reação em $t = 0$ (ET_o/RC), fluxo específico de dissipação da energia ao nível das clorofilas da antena (Dio/RC) conforme Strasser; Tsimilli-Michael; Srivastava (2004).

Caracterização morfoanatômica e histoquímica

Para as análises morfoanatômicas e micromorfométricas, foram coletadas amostras da região central da última folha totalmente expandida das plântulas de *B. gaudichaudii* de todos os tratamentos. As amostras foram fixadas em FAA (40% formaldeído: ácido acético glacial: 50% de etanol) por 24 horas. Após o período, o material vegetal foi pré-lavado em tampão fosfato e desidratado em série etílica crescente, pré-infiltrado e infiltrado em historesina (Leica, Alemanha). Posteriormente, as amostras

foram seccionadas transversalmente a 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen scientific, China) e os cortes corados com azul de toluidina [19]. As imagens obtidas foram fotografadas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão), acoplado com câmera DP-72 utilizando opção de 22 campo claro. Foram realizadas observações morfoanatômicas da epiderme das faces adaxial e abaxial, dos parênquimas paliádico e esponjoso e do mesofilo. As medidas de micromorfometria foram obtidas a partir das imagens capturadas usando o software ImageJ (Processamento e Análise de Imagem em Java, v. 1.47, EUA). A quantificação do amido foi realizada por coloração histoquímica com solução de lugol [20].

Para a detecção histoquímica de proteínas e compostos fenólicos totais em plântulas de *B. gaudichaudii*, fragmentos foliares foram corados com Xilidine Ponceau [21] para identificação de proteínas e solução de cloreto férrico [22] para identificação de compostos fenólicos totais e as imagens capturadas em microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão). Através das imagens obtidas foi realizado o cálculo da área marcada com amido, proteínas e compostos fenólicos pelo teste histoquímico através da diferença de contraste, utilizando o software ImageJ (Processamento e Análise de Imagem em Java, v. 1.47, EUA).

Análise fitoquímica

Após 50 dias de cultivo, folhas de plântulas de *B. gaudichaudii* foram submetidas a secagem a 35°C em estufa de ventilação forçada até peso constante. Na extração utilizou-se 0,2 g de folhas secas em 4 mL de metanol de grau HPLC (Neon®) em banho ultrassônico (30 min) e posterior filtração em filtros Millipore 0,45 µm, o filtrado foi acondicionado em geladeira em frascos tipo vials para aguardar as análises. A separação de bergapteno e psoraleno (grau analítico (≥98%, HPLC), Sigma-Aldrich) foi obtida em uma coluna de fase reversa LC18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm Supelcosil® Supelco). A fase móvel consistiu em água Milli-Q (A) e acetonitrila (B) a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C, o volume de injeção da amostra foi de 20 µL e a detecção a 254 nm. A separação foi feita de maneira isocrática com 55% A / 45% B por 25 minutos, seguida por uma lavagem de 5 minutos, conforme metodologia adaptada de Moraes et al. [23]. Os espectros de absorção e o tempo de retenção de padrões autênticos foram utilizados para identificar furanocumarinas (psoraleno e bergapteno) nos extratos. A regressão linear da equação foi utilizada para quantificação das

furanocumarinas e os resultados foram expressos em microgramas de metabólito por grama de extrato ($\mu\text{g g}^{-1}$). A concentração por frasco foi obtida a partir da massa (g) das folhas secas multiplicado pela produção do metabólito ($\mu\text{g g}$).

Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, compostos por 66 repetições e cinco qualidades de luz. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias calculadas pelo teste Skott-Knott, a 5% de probabilidade. Com o objetivo de reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados e identificar as variáveis que explicam a maior proporção da variância total, de modo a descrever as estratégias pelas quais as qualidades de luz contribuíram para a produção de metabólitos e comportamento morfofisiológico das plântulas, foi empregada a técnica de análise multivariada em componentes principais. Todas as análises foram realizadas no R v.3.5.1 [24].

Resultados

Luz vermelha influência no comprimento da parte aérea de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* *in vitro*

As diferentes qualidades de luz não induziram efeitos variados no crescimento de plântulas de *B. gaudichaudii* cultivadas *in vitro*. Sendo observado diferença apenas para o comprimento da parte aérea, especialmente em plântulas cultivadas sob luz vermelha, as quais apresentaram a média de 4,9 cm de comprimento (Tabela 1).

Tabela 1. Comprimento da parte aérea (CPA), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), área foliar (AF), massa seca foliar (MSF), massa seca do caule (MSC), massa seca total (MST) e área foliar específica (AFE) de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* aos 50 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes qualidades de luz LEDs.

Qualidade de Luz	CPA (cm)	DC (mm)	NF	AF (cm ²)	MSF (mg)	MSC (mg)	MST (mg)	AFE (cm ² g ⁻¹)
Branco	3,7±0,24B	1,9±0,24 ^{ns}	2,8±0,20 ^{ns}	4,9±0,51 ^{ns}	23,6±3,42 ^{ns}	36,2±2,21 ^{ns}	62,3±4,92 ^{ns}	0,2±0,04 ^{ns}
Azul	3,3±0,37B	1,7±0,19	1,8±0,20	4,5±0,48	17,9±2,03	25,0±2,35 ^{ns}	43,8±4,19	0,2±0,04
Vermelho	4,9±0,27A	1,3±0,08	2,2±0,20	6,2±1,09	21,4±1,42	27,9±2,21 ^{ns}	51,9±3,70	0,2±0,06
A/V 1:1	2,8±0,31B	1,6±0,15	2,4 ±0,24	3,8±0,48	20,3±1,61	23,4±2,87 ^{ns}	45,8±3,74	0,2±0,02
A/V 3:1	3,6±0,28B	1,7±0,18	2,4±0,51	3,8±0,48	25,0±4,30	28,7±4,82 ^{ns}	56,1±9,21	0,1±0,05

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%.
± Erro padrão, ^{ns} = Não significativo.

Luz azul promove o incremento no conteúdo de antocianinas

O conteúdo de antocianina nas folhas das plântulas de *B. gaudichaudii* foi influenciado pela luz azul e proporção A/V 3:1. Esse parâmetro maior em folhas de plântulas cultivadas sob luz vermelha, branca e A/V 1:1 (Fig. 2 A). O uso das diferentes qualidades de luz não promoveu alterações nos parâmetros teor de clorofila e flavonóis e razão entre o teor de clorofila e flavonóis, expresso em NBI (Fig. 2 B, C e D).

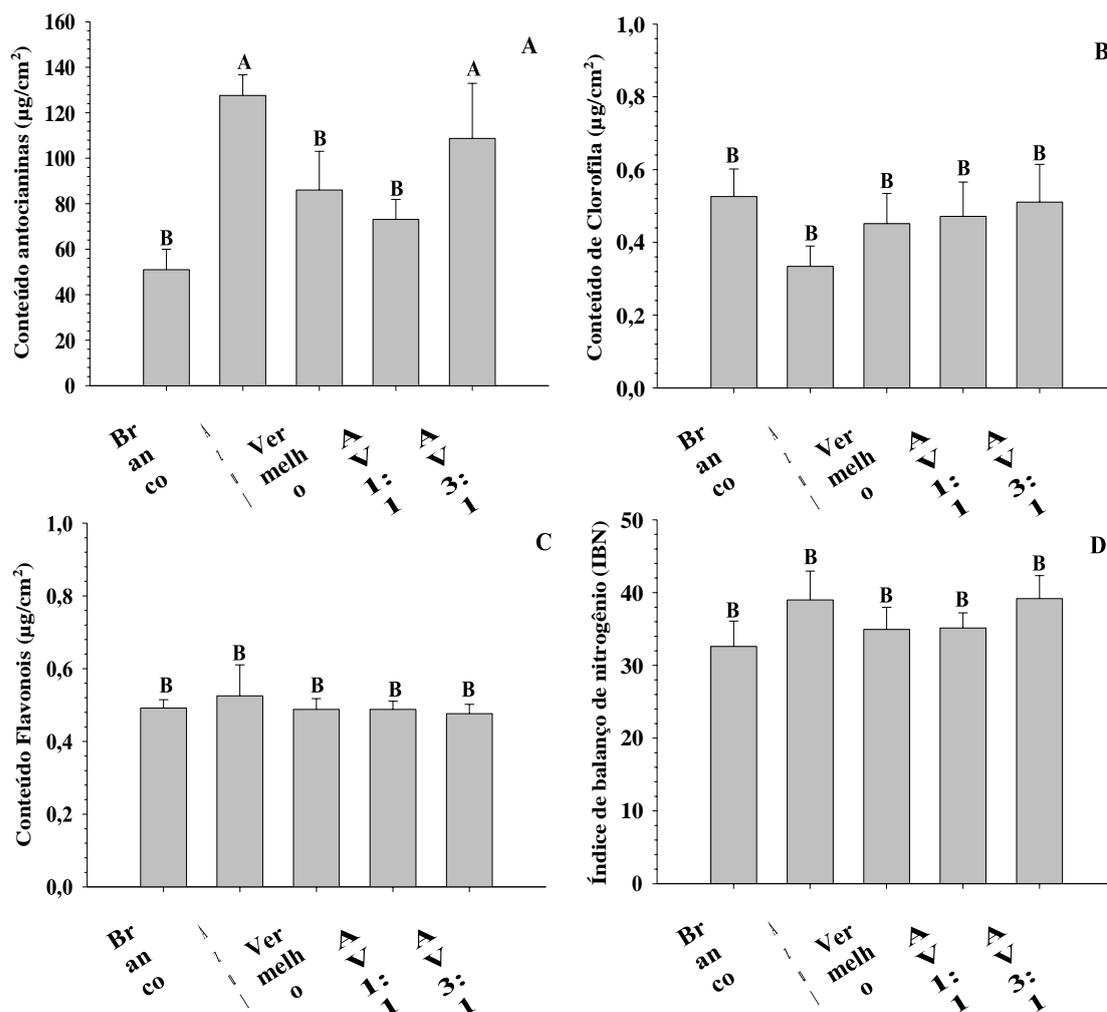


Fig. 2. Conteúdo de antocianinas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (A), conteúdo de clorofila ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (B), conteúdo de flavonóis ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (C) e índice de balanço de nitrogênio (NBI) (D) em folhas de *Brosimum gaudichaudii* desenvolvidas *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz LED. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%. As barras indicam o erro padrão das médias.

Predominância de luz azul promove o desempenho fotossintético em plântulas de *Brosimum gaudichaudii* *in vitro*

A taxa fotossintética *in vitro* das plântulas de *B. gaudichaudii* apresentou aumento crescente quando cultivadas sob maiores incidências de luz na proporção A/V 3:1 e azul,

com médias de $6,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e azul $6,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3). Esses resultados indicam interação significativa entre a taxa fotossintética e o uso de proporções crescente de luz azul.

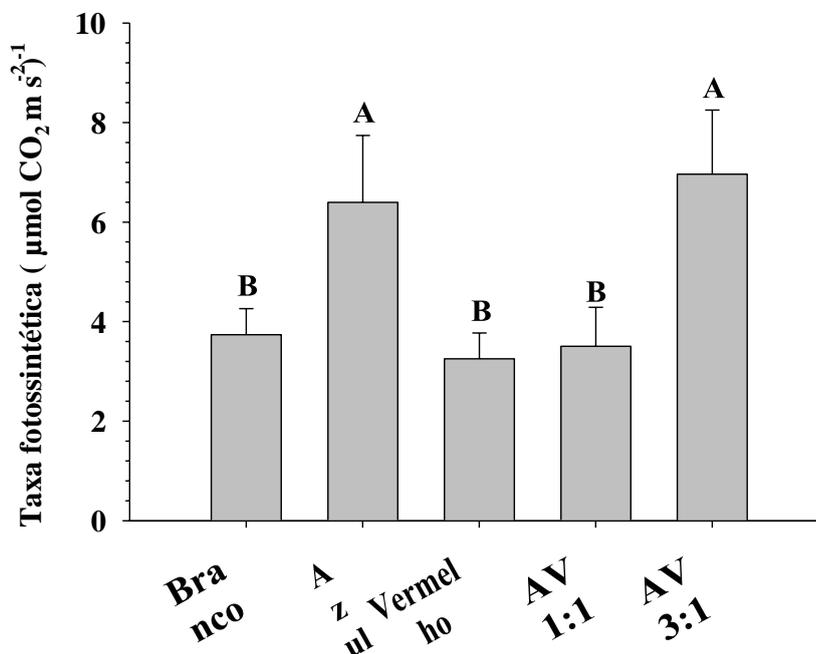


Fig. 3. Taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%. As barras indicam o erro padrão das médias.

Características da fluorescência da clorofila em plântulas de *Brosimum gaudichaudii* *in vitro*

Verificou-se que os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* não foram influenciados pelo uso das distintas condições de luminosidade (Fig. 4).

Tabela 2. Características da fluorescência da clorofila. Rendimento quântico máximo de fotoquímica primária (ϕP_o), rendimento quântico de dissipação de energia na forma de calor (ϕD_o), rendimento quântico de transporte de elétrons (ψE_o), absorção de energia luminosa por centro de reação (ABS/RC), fluxo de transporte de elétrons (além da Qa-) por centro de reação em $t = 0$ (Eto/RC), dissipação de energia na forma de calor por centro de reação (Dio / RC) e índice de desempenho fotossintético (PIABS).

Qualidade de Luz	ϕP_o	ϕD_o	ψE_o	Dio/RC	ABS/RC	Eto/RC	Pi _{ABS}
Branco	0,73±0,02 ^{ns}	0,27±0,02 ^{ns}	0,32±0,02 ^{ns}	0,80±0,12 ^{ns}	2,91±0,25 ^{ns}	0,92±0,05 ^{ns}	0,89±0,21 ^{ns}
Azul	0,74±0,030	0,26±0,03	0,37±0,37	0,72±0,20	2,68±0,32	0,94±0,03	1,33±0,30
Vermelho	0,76±0,01	0,24±0,01	0,35±0,02	0,71±0,09	2,96±0,16	1,03±0,02	1,00±0,15
A/V 1:1	0,75±0,01	0,25±0,01	0,36±0,02	0,65±0,05	2,62±0,11	0,94±0,08	1,10±0,16
A/V 3:1	0,75±0,01	0,25±0,01	0,38±0,02	0,62±0,04	2,54±0,12	0,97±0,07	1,29±0,19

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%.

± Erro padrão, ^{ns} = Não significativo.

Qualidade de luz afeta a morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii*

Os efeitos de diferentes qualidades luminosas nas estruturas anatômicas das folhas das plântulas de *B. gaudichaudii* foram observadas com relação à morfologia e organização das células do parênquima paliçádico. As folhas após os tratamentos com diferentes qualidades de luz demonstraram alterações nas células mesofílicas (Fig. 4 A, C, E, G e I). Visivelmente foi observado espaços intracelulares maiores do parênquima paliçádico em folhas submetidas aos tratamentos, vermelho, A/V 1:1 e A/V 3:1 (Fig. 4. E, G e I). As nervuras de plântulas cultivadas sob luz vermelha apresentaram retração e aumento dos espaços entre as células (Fig. 4 F), nervuras de folhas cultivadas sob luz A/V 1:1 apresentaram apenas aumento do espaço entre as células (Fig. 4 H).

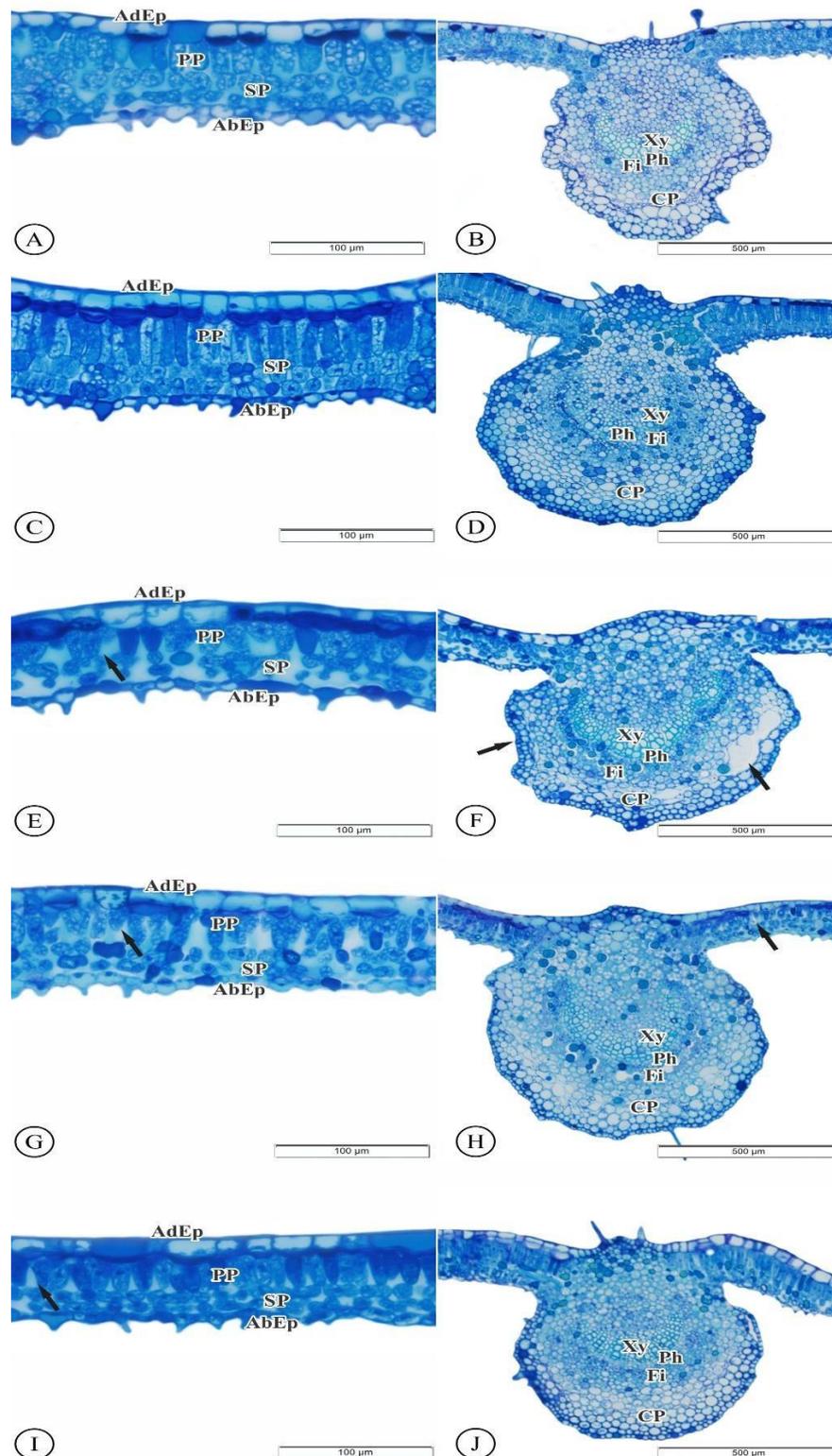


Fig. 4. Anatomia foliar de *Brosimum gaudichaudii* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. (A, B) branco, (C, D) azul, (E, F) vermelho, (G, H) A/V 1:1, (I, J) A/V 3:1. (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. (Xy) xilema. (Ph) Floema. (Fi) Fibra. (CP) Parênquima clorofiliano. Setas pretas indicam alterações na estrutura celular.

Aumentos na espessura do mesófilo, parênquima paliçádico e espessura foliar, foram observados em plântulas cultivadas sob qualidade de luz azul e não diferindo quando cultivadas sob luz branca, vermelha e proporções A/V 1:1 e A/V 3:1 (Fig. 4). Não houve diferença para a espessura adaxial, abaxial e parênquima esponjoso entre plântulas cultivadas sob as diferentes qualidades de luz (Tabela 2).

Tabela 3. Espessura do mesofilo (Esp. Mes), Epiderme adaxial (Ad ep), Epiderme abaxial (Ab Ep), Parênquima paliçádico (PP), Parênquima esponjoso (SP) e Espessura foliar (Esp. Fol) de plântulas de *Brosimum gaudichaudii in vitro* após 50 dias de cultivo sob diferentes qualidades de luz.

Qualidade de luz	Esp. Mes (µm)	Ad Ep (µm)	Ab Ep (µm)	PP (µm)	SP (µm)	Esp. Fol (µm)
Branco	51,2±2,30B	19,1±0,57 ^{ns}	10,1±0,84 ^{ns}	25,8±0,73B	26,7±2,29 ^{ns}	79,5±3,41B
Azul	64,9±1,37A	20,5±1,79	9,5±0,59	37,0±0,96A	30,4±0,57	94,1±1,06A
Vermelho	43,7±3,16B	21,4±0,76	11,2±0,46	22,0±0,81B	23,0±2,18	77,5±3,62B
A/V 1:1	53,7±4,39B	21,5±1,73	11,5±1,05	23,0±0,57B	26,7±2,28	74,5±3,67B
A/V 3:1	46,7±1,50B	20,2±0,29	10,3±0,52	24,1±0,50B	23,0±1,02	76,4±1,97B

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%.

± Erro padrão, ^{ns} = Não significativo.

Foi observado a presença de amido, proteínas e compostos fenólicos nas células das folhas de *B. gaudichaudii* (Fig. 5). O teste histoquímico evidenciou a presença de amido diante das qualidades de luz azul e A/V 1:1, ocasionando maior acúmulo de amido nas folhas (Fig. 6), o maior acúmulo de proteínas nas folhas foi evidenciado sob as qualidades de luz azul, branco e A/V 3:1 (Fig. 6 B) e o acúmulo de compostos fenólicos foi evidenciado em folhas de *B. gaudichaudii* cultivadas sob as qualidades A/V 1:1, A/V 3:1 e azul (Fig. 6 C).

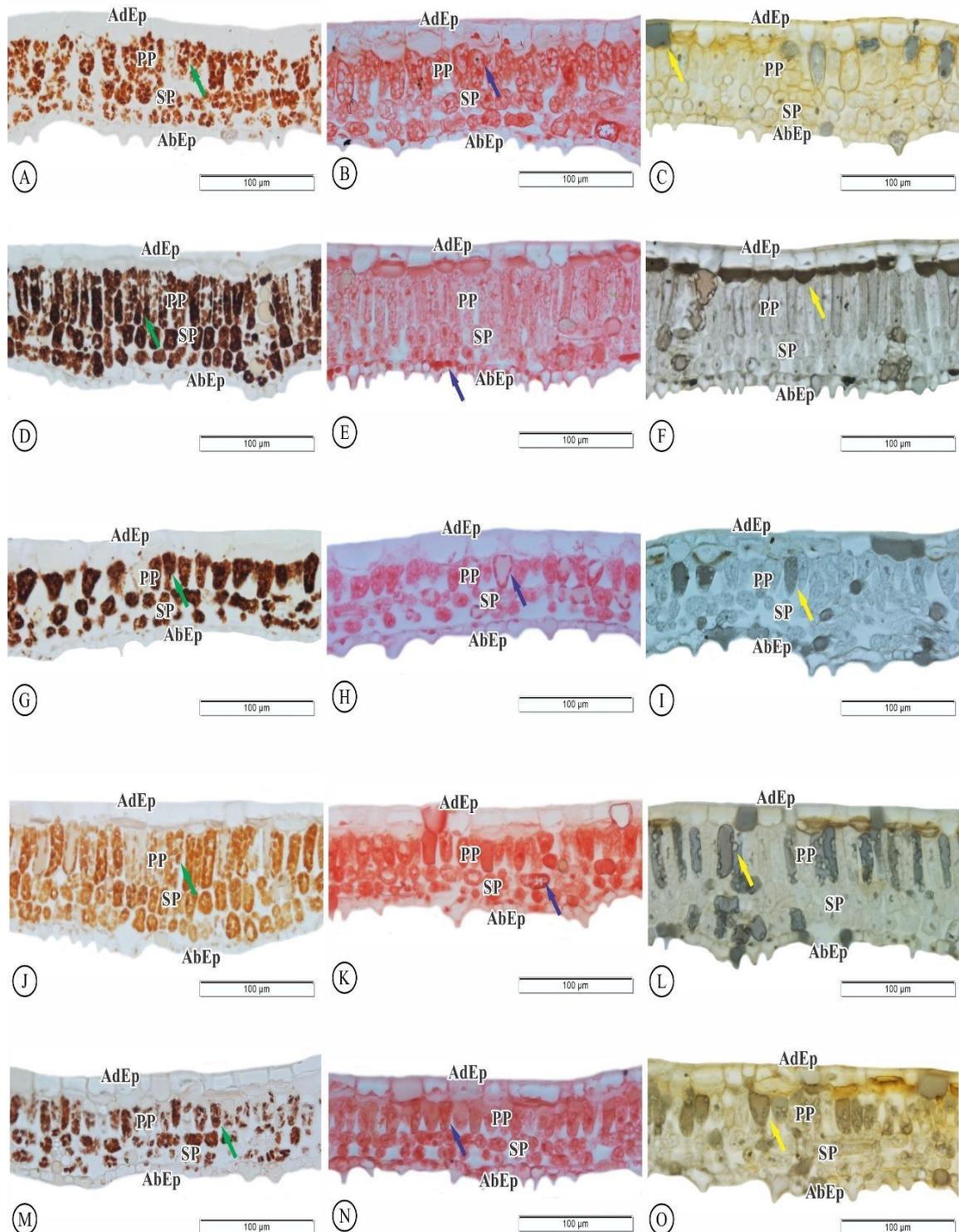


Fig. 5. Histoquímica de folhas de *Brosimum gaudichaudii* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. (A - C) branco, (D - F) azul, (G - I) vermelho, (J - L) A/V 1:1, (M - O) A/V 3:1. (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas verdes indicam acúmulo de amido. Setas azuis indicam acúmulo de proteínas. Setas amarelas indicam produção de compostos fenólicos.

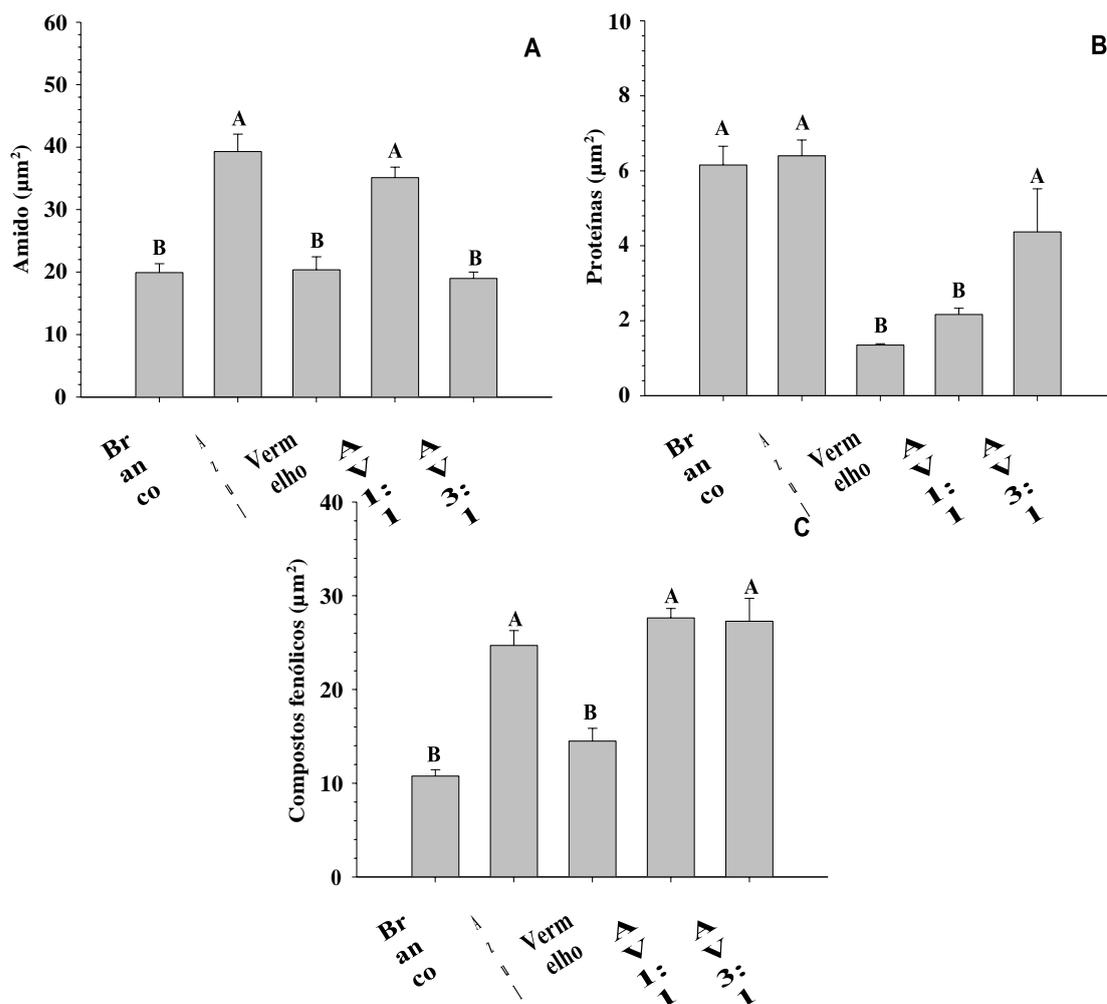


Fig. 6. Acúmulo de amido, proteínas e compostos fenólicos em folhas de *Brosimum gaudichaudii* *in vitro* após 50 dias de cultivo. (A) Amido (μm^2); (B) proteínas (μm^2) e (C) compostos fenólicos (μm^2). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%. As barras indicam o erro padrão das médias.

Luz azul e proporções de azul e vermelha aumentam os níveis de psoraleno e bergapteno

Foi observado que a concentração do metabólito psoraleno destacou-se nos tecidos foliares de plântulas cultivadas sob luz A/V 1:1 ($14,52 \mu\text{g/g}$) (Fig. 7 A), em termos de rendimento os resultados mostraram que esses tecidos foliares apresentaram rendimento de $4,39 \mu\text{g/frasco}$ de psoraleno (Fig. 7 B). Já o metabólito bergapteno foi produzido em maior concentração em tecidos foliares de plântulas que foram cultivadas sob as qualidades de luz azul e A/V 3:1 ($17,86$ e $14,21 \mu\text{g/frasco}$) (Fig. 7 C) a maior média de rendimento do metabólito bergapteno foi observada somente em plântulas cultivadas sob luz A/V 3:1 sendo $4,37 \mu\text{g/frasco}$ (Fig. 7 D).

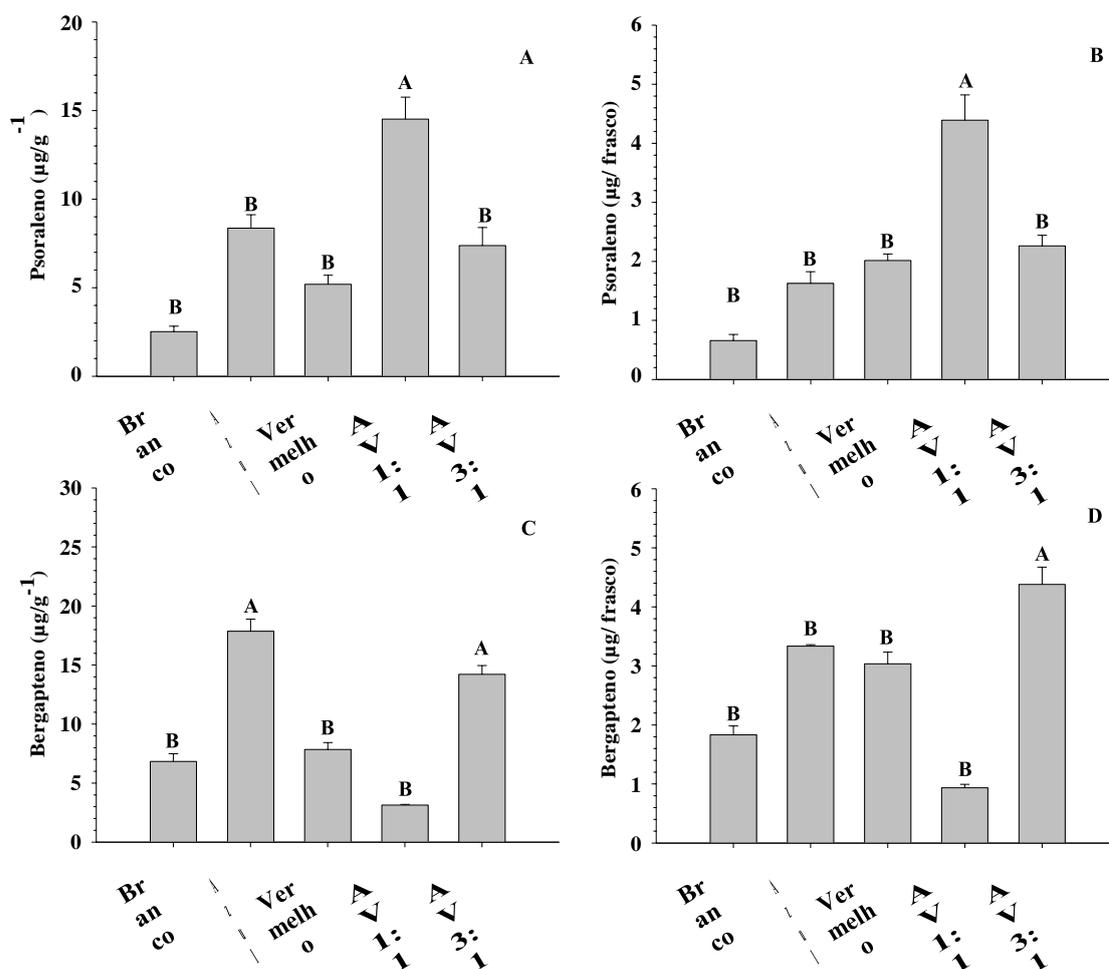


Fig. 7. Concentração e rendimento de psoraleno (A e B), bergapteno (C e D) em tecidos foliares de *Brosimum gaudichaudii* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5%. As barras indicam o erro padrão das médias.

Relações entre as variáveis

Por meio da análise de componentes principais obteve-se a visão integrada das alterações no âmbito morfofisiológico e bioquímico desencadeados pelas qualidades de luz branca, azul, vermelha, A/V 1:1 e A/V 3:1, observando comportamentos morfofisiológico e metabólico diferenciados. Os dois primeiros componentes (PC1 e PC2) explicam 68,9% da variância total observada. Os resultados dessa análise permitiram observar alta similaridade entre a qualidade de luz azul e A/V 3:1. No entanto, é importante salientar, que apesar do padrão comum de resposta entre os tratamentos azul e A/V 3:1, algumas particularidades foram observadas entre eles. No tratamento azul, por

exemplo, foi possível observar maior espessura foliar, flavonoides e massa foliar específica (Fig. 8).

Nas plântulas de *B. gaudichaudii* submetidas aos tratamentos com luz azul e A/V 3:1, compostos de metabolismo primário (flavonóis e antocianinas), metabolismo secundário (bergapteno) e espessura foliar se relacionaram mais fortemente e, provavelmente, foram os principais responsáveis pela adaptação das plântulas a essas qualidades de luz. Maior taxa fotossintética e melhor índice de desempenho fotossintético (PI_{ABS}) também contribuíram para a diferenciação metabólica das plantas nesse tratamento, como pode ser observado pela forte relação entre bergapteno e compostos fenólicos. O metabólito psoraleno correlacionou-se negativamente com a qualidade de luz vermelha, provavelmente pelo fato desse metabólito ser um composto fotoativado, com faixa de comprimento de onda ultravioleta A (320-380 nm) (Fig. 8).

Indicadores de maiores estresse e danos ao fotossistema II, como fluxo específico de dissipação de energia ao nível das clorofilas da antena (Dio/RC) e rendimento quântico da dissipação de energia na forma de calor (PhiDo) estavam mais fortemente relacionados às plantas submetidas a luz branca. Evidências da “síndrome da luz vermelha”, como maior comprimento da parte aérea e área foliar específica, baixa taxa fotossintética e baixa massa foliar específica estavam mais fortemente relacionadas a luz vermelha (Fig. 8).

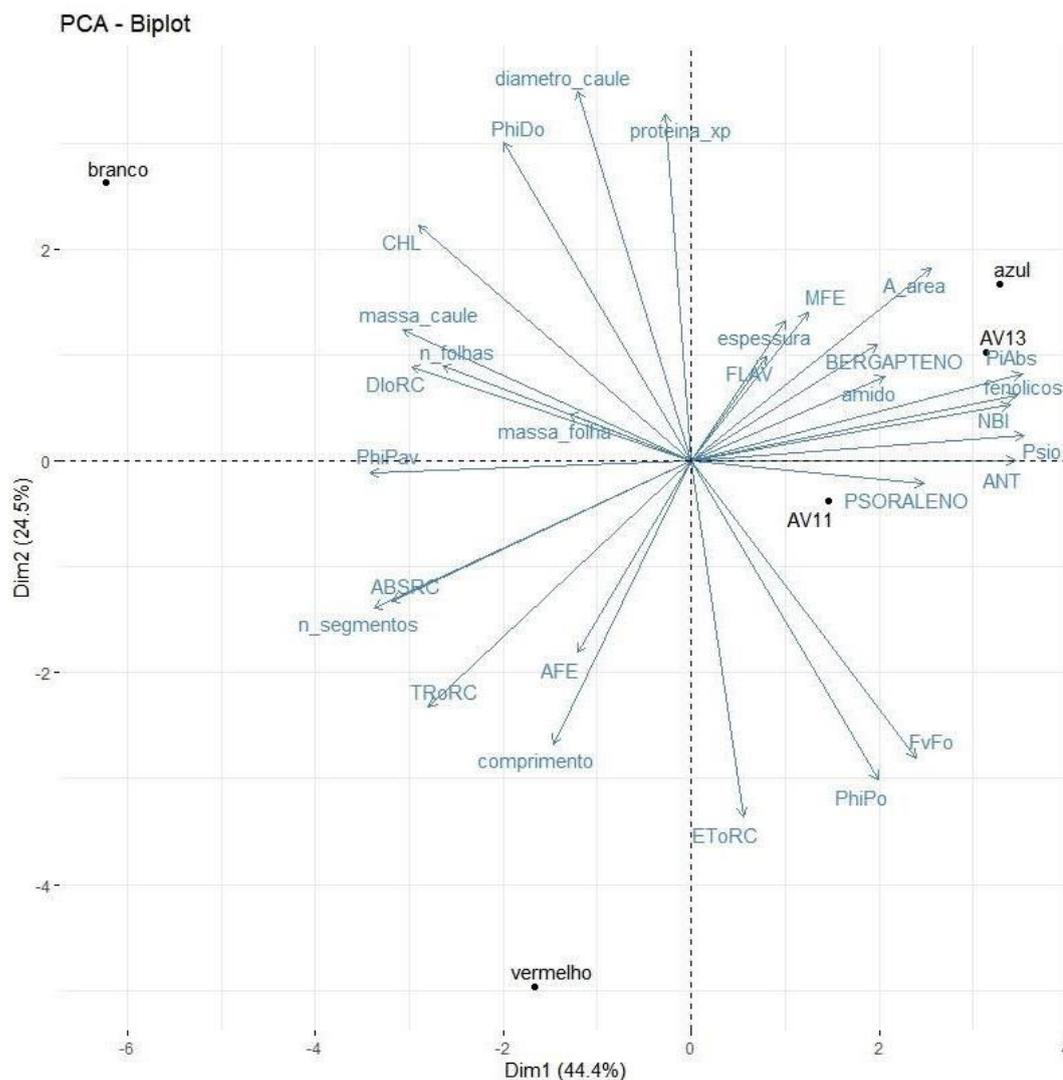


Fig. 8. Análise de componentes Principais em folhas de *Brosimum gaudichaudii* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz por 50 dias.

Discussão

Este estudo buscou investigar o efeito da qualidade da luz na morfofisiologia e produção de furanocumarinas em *B. gaudichaudii* cultivada *in vitro*. O espectro de diferentes comprimentos de onda, está entre os principais moduladores do metabolismo, crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando nas respostas bioquímicas e morfofisiológicas das plantas [8,25].

O uso da luz vermelha influenciou o maior comprimento da parte aérea (CPA) em *B. gaudichaudii*. Resultados semelhantes foram relatados em outras espécies, incluindo *Solanum lycopersicum* L., *Scrophularia takesimensis* e *Myrtus communis* L. Nakai [26–28]. O aumento do comprimento da parte aérea em plantas expostas à luz vermelha tem sido associado ao controle do equilíbrio da atividade da enzima AIA oxidase, em que a

ativação do pigmento vermelho desencadeia os sistemas de enzimas oxidativas que convertem os cofatores da enzima AIA oxidase que servem como inibidores, provendo aumento de auxinas endógenas [29]. É possível, ainda, que a luz vermelha tenha aumentado a capacidade de resposta das giberelinas endógenas, induzindo o aumento da capacidade de resposta do tecido celular e das regiões meristemáticas [30,31]. Além disso, a luz azul pode ter desencadeado a redução do conteúdo ativo de giberelina com alterações consistentes nos níveis de transcrição dos genes relacionados com a biossíntese e inativação da giberelina, suprimindo assim alongamento do caule [32,33].

Conforme observado na PCA (Fig. 8), a exposição das plântulas à luz vermelha monocromática estimulou alguns efeitos negativos, que são chamados de “síndrome da luz vermelha”, sendo essa característica atribuída a alta estimulação do fitocromo em resposta a adaptação à baixa razão vermelho/vermelho distante, sendo caracterizada pelo aumento do comprimento da parte aérea, área foliar específica e baixa capacidade fotossintética. Miao et al. [34] também observaram respostas similares em plantas de *Cucumis sativus* cultivadas em ambiente interno em resposta à qualidade de luz, indicando que tais modificações morfológicas ocorrem para capturar mais energia luminosa para impulsionar a fotossíntese dessas plantas. No entanto, em plântulas de *B. gaudichaudii*, essas modificações morfológicas não foram suficientes para impulsionar a fotossíntese das plântulas cultivadas sob luz vermelha. As antocianinas são compostos do grupo dos flavonoides, relacionadas a ação protetora contra a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) [35]. Observou-se as maiores concentrações de antocianina em tratamentos nos quais foram utilizadas maiores proporções de luz azul durante o crescimento, como azul e A/V 3:1. O aumento de antocianinas nessas plantas pode ter sido ocasionado como múltiplas respostas à qualidade de luz, dentre elas estratégia fotoprotetora adicional, que é realizada pelo aparato fotossintético quando as plantas são submetidas a luz intensa [36]. A acumulação de antocianina tem sido relacionada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Xu et al. [36], ao investigar se as EROs induziam a promoção de antocianina em *Arabidopsis*, concluíram que o sinal da presença de EROs induzia o acúmulo de antocianinas e, como uma regulação de feedback, as antocianinas modulavam o nível de EROs e mantinham a capacidade fotossintética das plantas de *Arabidopsis*.

A fotossíntese das folhas depende não apenas da quantidade, mas também da qualidade da luz incidente. A atividade fotossintética instantânea das folhas sob os tratamentos com luz A/V 3:1 foram estimuladas (Fig. 3), indicando que a ação de

regulação de feedback das antocianinas foi eficiente para manter a capacidade fotossintética dessas plântulas.

O conhecimento sobre o comportamento fotossintético da espécie *B. gaudichaudii in vitro* ainda é incipiente, visto que este é o primeiro relato de taxa fotossintética para a espécie nessas condições. Plantas cultivadas sob luz A/V 3:1 ou azul apresentaram maiores médias de taxa fotossintética, provavelmente pelo efeito estimulante da abertura estomática acionada pela luz azul, sendo associado com a absorção mais alta da luz azul pelos pigmentos fotossintéticos, contribuindo para a manutenção da fotossíntese líquida eficiente [37]. Cabe ressaltar, ainda, que a luz azul induz aumentos na biossíntese [38] e na regulação da Rubisco [39], contribuindo, assim, para maior eficiência da fixação de carbono. Essas plântulas cultivadas sob luz azul são estimuladas a expressão de folhas com aspecto de folhas do tipo “sol”, sendo caracterizadas pelo alto desempenho fotossintético, conforme também observado por Matsuda et al [40] ao analisar as características fotossintéticas de folhas de arroz.

A exposição das plantas apenas a luz vermelha isoladamente ou a luz A/V 1:1 não alterou a fotossíntese em comparação a luz branca, embora saiba-se que a luz vermelha coincide com o pico de absorção da fotossíntese, além de apresentar maior eficiência quântica do que a luz azul nas respostas instantâneas fotossintéticas [41]. Apesar disso, tem sido demonstrado que a luz vermelha monocromática causa desbalanço de fótons disponíveis para o fotossistema I e fotossistema II [42], além de afetar as subunidades dos fotossistemas I e II, e reduzir a expressão da subunidade menor da Rubisco [41], alterando a performance fotossintética.

As características estruturais das folhas refletem os fatores ambientais das plantas ou a adaptabilidade dessas plantas ao ambiente [43]. Diferentes qualidades espectrais proporcionam variações na espessura total das folhas, bem como nos parênquimas paliçádico e esponjoso. Notavelmente, a luz azul promoveu aumento da espessura foliar, espessura do parênquima paliçádico e mesófilo. Resultados semelhantes foram relatados para plântulas de batata *in vitro*, em que a espessura foliar e parênquima paliçádico foram aumentadas quando as plantas foram cultivadas sob luz azul [13]. Além disso, foi demonstrado que a luz azul promoveu a formação de células paliçádicas mais alongadas verticalmente, que minimiza a dispersão da luz, permitindo a penetração mais profunda, enquanto o tecido esponjoso aprimora a captura da luz [42].

A variação na espessura foliar em plântulas de *B. gaudichaudii* foi influenciada pela luz azul e correlacionou-se positivamente com o maior desempenho fotossintético

das plântulas, visto que o aumento da espessura foliar traduz alto custo de energia para as plantas, refletindo em taxa fotossintética elevada. Araújo et al. [46], demonstraram que isso ocorre porque a disponibilidade de CO₂ se torna maior nas lacunas do mesófilo próximo à superfície da célula, facilitando assim a carboxilação pela Rubisco, uma vez que a difusão de CO₂ no meio líquido é menor. Além disso, o aumento da espessura foliar, observada em plântulas sob luz azul, também tem papel na diminuição dos efeitos fotooxidativos, aumentando assim a área de dissipação de energia [45].

Outra característica aumentada pelos tratamentos azul e A/V 1:1 é o acúmulo de amido nas folhas de *B. gaudichaudii*, que pode ser pelas induções na taxa fotossintética. O aumento no teor de amido pode ser consequência da redução do conteúdo ativo de giberelina, promovido por alterações consistentes nos níveis de transcrição dos genes relacionados à biossíntese e inativação da giberelina por sinal da luz azul [33]. Foi observado que há correlação inversa entre o acúmulo de amido nas folhas cultivadas sob luz azul e A/V 1:1 e o crescimento da parte aérea das cultivadas sob luz vermelha, visto que plantas que apresentam crescimento lento apresentam concentrações mais altas de amido transitório. Assim, Jacobsen e Chandler [46] relataram que as giberelinas inibem o acúmulo de amido, promovendo a sua decomposição. Portanto, a persistência desse amido assimilado como composto de armazenamento pode ter comprometido seu uso na síntese de novos tecidos de biomassa, levando ao crescimento mais lento [47].

Outra característica observada nas folhas de plântulas cultivadas sob luz azul, branca e A/V 3:1, foi maiores acúmulos de proteínas. A exposição a essas qualidades de luz pode ter induzido respostas protetoras ao estresse fotooxidativo nas plantas, sendo portanto associado ao acúmulo de proteínas nas folhas como mecanismo de proteção [48]. A qualidade espectral da luz afeta a biossíntese de metabólitos secundários associados as respostas de defesa das plantas ao estresse biótico e abiótico, incluindo os compostos fenólicos. Por exemplo, o conteúdo de composto fenólico em folhas de *B. gaudichaudii* cultivadas sob diferentes qualidades de luz aumenta com a luz azul e as suas proporções, e indica que os compostos fenólicos podem estar funcionando como “filtros solares”, pois se acumulam na epiderme, formando um filtro que absorve ou dissipa a energia luminosa, protegendo os tecidos internos dos possíveis danos causados pela radiação [49]. Estes resultados são consistentes com os resultados obtidos para *Agastache rugosa* e *Rehmannia glutinosa* [50,51]. O maior conteúdo de compostos fenólicos totais foi observado em folhas de plantas que cresceram sob luz azul, e esses compostos representavam um dos grupos de metabólitos secundários que está associada com a

capacidade de reduzir ou eliminar a geração de radicais livres através da doação de elétrons ou hidrogênio [52]. O aumento do acúmulo desses compostos fenólicos nas folhas de plantas cultivadas sob luz azul, pode ser explicado pela maior atividade de enzimas da rota Biosintética dos fenilpropanoides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase) as quais podem ter sua expressão gênica induzida pela luz [53,54].

A maioria das plantas que acumulam furanocumarinas possuem uma via biossintética altamente induzível, que pode ser desencadeada por fatores bióticos e abióticos [55]. A biossíntese das furanocumarinas (psoraleno e bergapteno) nas folhas de *B. gaudichaudii* foi eficientemente estimulada pela luz azul e suas proporções, visto que, as furanocumarinas têm seu comprimento de onda máximo na faixa de 320-380 nm, mais próximo do comprimento de onda da luz azul [56]. A baixa concentração de psoraleno e bergapteno em plântulas cultivadas sob luz branca e vermelha pode estar relacionada a possível inibição das enzimas do citocromo P450, visto que a parte prenil das furanocumarinas é adicionada às cumarinas simples como a umbeliferona sob as funções enzimáticas da isopreniltransferase localizada nos plastídeos de enzimas do citocromo P450 [57]. As enzimas do citocromo P450 são enzimas essenciais da biossíntese de furanocumarinas, visto que podem promover a inativação enzimática das furanocumarinas e essa inativação enzimática pode ser letal para as plantas, a menos que adaptações rápidas possam ser realizadas [58]. O aumento das furanocumarinas em plântulas sob luz azul e proporções pode ser associado a ação de metabólitos antioxidantes como foi o caso dos compostos fenólicos, que estão ligados a rota biossintética dos fenilpropanoides, sendo os fenilpropanoides sintetizados a partir da fenilalanina na 1ª etapa da cumarina [55]. Além disso, o fato das plantas sob luz azul apresentarem maior taxa fotossintética, gerou maior quantidade energia e carbono que pode ter sido desviado do metabolismo primário e direcionado ao metabolismo secundário, resultando, assim, na maior produção do psoraleno e bergapteno.

Sabe-se que a raiz da *B. gaudichaudii* apresenta a maior produção das furanocumarinas, Cardoso et al. [59] ao analisar os teores destes compostos em plantas dessa espécie observaram que cerca de 99% desses compostos estão presentes na raiz das plantas, valores menores que 0,003% estavam presentes no caule e em folhas havia a ausência, ressaltando na necessidade da retirada por completo da planta, porque os demais órgãos não supriam a demanda. Diferentemente, neste trabalho ao promover o cultivo da espécie em ambiente *in vitro* sob condições de luz foi possível promover a produção desses compostos em órgãos que no momento não são usuais, como as folhas. Ressalta-

se que o cultivo dessa espécie no ambiente *in vitro* sob espectros de luz azul, possibilita a obtenção sustentável das furanocumarinas, pois o uso das folhas apresenta uma série de vantagens, como o fato de não destruir a planta, pois é um órgão que pode ser rapidamente substituído.

A luz A/V 1:1 só aumentou o conteúdo de psoraleno, não tendo nenhum efeito sobre o bergapteno, além disso, essa qualidade de luz não promoveu incremento da fotossíntese, antocianinas ou adaptações anatômicas. Já o bergapteno apresentou as maiores concentrações sob luz azul e A/V 3:1, no entanto não houve grande diferença para essas qualidades de luz. Portanto, a indicação da melhor qualidade de luz para a obtenção desses metabólitos vai depender do composto desejado, visto que um tipo de luz pode ser mais adequado que outro, caso se deseje a obtenção dos dois e plântulas com maior capacidade de crescimento, a qualidade de luz 3:1 seria a mais indicada.

As maiores taxas fotossintéticas foram observadas nas plântulas sob associações de LED A/V 3:1 e azul, no entanto não houve muita diferença entre ambas. Apesar da proporção maior de azul ter promovido o aumento da taxa fotossintética, não houve incremento da biomassa, essa resposta pode estar relacionada a atuação da luz azul sobre a redução dos metabólitos primários disponíveis para o crescimento [60,61]. Em contrapartida essas plantas que apresentaram maior taxa fotossintética, geraram maior quantidade de energia e carbono que pode ser desviada do metabolismo primário e direcionada para o metabolismo secundário, resultando, assim, na maior produção de psoraleno e bergapteno.

Conclusão

Em conclusão, estes resultados mostraram que a proporção de luz A/V 1:1 somente influenciou na produção do metabólito psoraleno, já a proporção de luz A/V 3:1 e luz azul influenciaram na maior produção de bergapteno juntamente com maior taxa fotossintética e conteúdo de antocianina. Por outro lado, ambientes sob LEDs vermelho e branco representaram condições limitadoras para o cultivo de *B. gaudichaudii in vitro*. Portanto, para a obtenção de ambos os metabólitos e plantas com maior capacidade de crescimento a proporção A/V 3:1 é a qualidade de luz mais indicada.

Referências Bibliográficas

- [1] J.A. Ribeiro Neto, B.R. Pimenta Tarôco, H. Batista dos Santos, R.G. Thomé, E.

- Wolfram, R.I. Maciel de A. Ribeiro, Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach, *J. Ethnopharmacol.* (2020) 112547. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112547>.
- [2] A.R. Nunes, A.L.M. Rodrigues, D.B. de Queiróz, I.G.P. Vieira, J.F.C. Neto, J.T.C. Junior, S.R. Tintino, S.M. de Moraes, H.D.M. Coutinho, Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 189 (2018) 119–123. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2018.10.013>.
- [3] W. de S.C. Quintão, T. Alencar-Silva, M. de F. Borin, K.R. Rezende, L.C. Albernaz, M. Cunha-Filho, T. Gratieri, J.L. de Carvalho, L.C.L. Sá-Barreto, G.M. Gelfuso, Microemulsions incorporating *Brosimum gaudichaudii* extracts as a topical treatment for vitiligo: *In vitro* stimulation of melanocyte migration and pigmentation, *J. Mol. Liq.* 294 (2019) 111685. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.111685>.
- [4] G.L. Pozetti, *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento, *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.* (2005) 159–166.
- [5] M.R. Lima, P.D.A. Santos, C.E.S. Silveira, D. Palhares, L.A.R. Pereira, Cultivo *in vitro* de *Brosimum gaudichaudii* Tréc (Moraceae), *Rev. Bras. Plantas Med.* 16 (2014) 462–466. https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_005.
- [6] V. Veraplakorn, Micropropagation and callus induction of *Lantana camara* L. – A medicinal plant, *Agric. Nat. Resour.* 50 (2016) 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.12.002>.
- [7] I.C.A. Alvarenga, F.V. Pacheco, S.T. Silva, S.K.V. Bertolucci, 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 Cult.* 122 (2015) 299–308. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>.
- [8] Y. Li, D. Kong, Y. Fu, M.R. Sussman, H. Wu, The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants, *Plant Physiol. Biochem.* 148 (2020) 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>.

- [9] Y. Tian, H. Wang, P. Sun, Y. Fan, M. Qiao, L. Zhang, Z. Zhang, Response of leaf color and the expression of photoreceptor genes of *Camellia sinensis* cv. Huangjinya to different light quality conditions, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 251 (2019) 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.032>.
- [10] I. Paik, E. Huq, Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks, *Semin. Cell Dev. Biol.* 92 (2019) 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.03.007>.
- [11] S.G. Kong, K. Okajima, Diverse photoreceptors and light responses in plants, *J. Plant Res.* 129 (2016) 111–114. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0792-5>.
- [12] C. Silvestri, M.E. Caceres, M. Ceccarelli, A.L. Pica, E. Rugini, V. Cristofori, Influence of Continuous Spectrum Light on Morphological Traits and Leaf Anatomy of Hazelnut Plantlets, *Front. Plant Sci.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01318>.
- [13] L. Chen, K. Zhang, G. Xiao-chen, H. Wang, Y. Gao, X. Wang, Z. Zeng, Y. Hu, Effects of different LEDs light spectrum on the growth, leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of potato plantlets *in vitro* and minituber production after transplanting in the greenhouse, *J. Integr. Agric.* 18 (2020) 108–119. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62633-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62633-X).
- [14] T. Murashige, F. Skoog, A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures, *Physiol. Plant.* 15 (1962) 474–497.
- [15] Z.G. Cerovic, G. Masdoumier, N. Ben Ghazlen, G. Latouche, A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids, *Physiol. Plant.* 146 (2012) 251–260. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x>.
- [16] F.S. Coelho, P.C.R. Fontes, F.L. Finger, P.R. Cecon, Avaliação do estado nutricional do nitrogênio em batateira por meio de polifenóis e clorofila na folha, *Pesqui. Agropecu. Bras.* 47 (2012) 584–592. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000400015>.
- [17] A.C. Costa, M. Rosa, C.A. Megguer, F.G. Silva, F.D. Pereira, W.C. Otoni, A

- reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 117 (2014) 443–454. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0455-y>.
- [18] R.J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, A. Srivastava, Analysis of the Chlorophyll *a* Fluorescence Transient, in: *Chlorophyll a Fluoresc.*, 2004: pp. 321–362. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12.
- [19] T.P. O'Brien, N. Feder, M.E. McCully, Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O, *Protoplasma.* 59 (1964) 368–373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>.
- [20] W.A. Jensen, *Botanical histochemistry: principles and practice*, A Ser. Biol. Books. (1962) 408.
- [21] B.C. Vidal, Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R., *Ann. d"histochimie.* 15 (1970) 289–296.
- [22] D.A. Johansen, *Plant Microtechnique*, *Trans. Am. Microsc. Soc.* 59 (1940) 405. <https://doi.org/10.2307/3222557>.
- [23] M.C. Morais, P.H.G. De Almeida, N.L.O. Ferreira, R.L. Arruda, L.L. Borges, O. De Freitas, E.C. Da Conceição, Validation of a photostability indicating method for quantification of furanocoumarins from *Brosimum gaudichaudii* soft extract, *Brazilian J. Pharmacogn.* 28 (2018) 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.12.002>.
- [24] R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, *R Found. Stat. Comput.* (2019). <https://doi.org/10.16373/j.cnki.ahr.150049>.
- [25] D.S. Batista, S.H.S. Felipe, T.D. Silva, K.M. de Castro, T.C. Mamedes-Rodrigues, N.A. Miranda, A.M. Ríos-Ríos, D.V. Faria, E.A. Fortini, K. Chagas, G. Torres-Silva, A. Xavier, A.D. Arencibia, W.C. Otoni, Light quality in plant tissue culture: does it matter?, *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant.* 54 (2018) 195–215. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>.

- [26] M.T. Naznin, M. Lefsrud, M.O.K. Azad, C.H. Park, Effect of different combinations of red and blue led light on growth characteristics and pigment content of *in vitro* tomato plantlets, *Agriculture*. 9 (2019) 196. <https://doi.org/10.3390/agriculture9090196>.
- [27] B.R. Jeong, I. Sivanesan, Direct adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 123 (2015) 607– 618. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0864-6>.
- [28] M. Cioć, A. Szewczyk, M. Żupnik, A. Kalisz, B. Pawłowska, LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 132 (2018) 433–447. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1340-2>.
- [29] P.R. Poudel, I. Kataoka, R. Mochioka, Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 92 (2008) 147–153. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9317-1>.
- [30] A. Manivannan, P. Soundararajan, Y.G. Park, H. Wei, S.H. Kim, B.R. Jeong, Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of *in vitro*-grown carnations ‘Green Beauty’ and ‘Purple Beauty,’ *Hortic. Environ. Biotechnol.* 58 (2017) 12–20. <https://doi.org/10.1007/s13580-017-0051-2>.
- [31] N. Olszewski, T.P. Sun, F. Gubler, Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways, *Plant Cell.* 14 (2002). <https://doi.org/10.1105/tpc.010476>.
- [32] S. Matsuo, K. Nanya, S. Imanishi, I. Honda, E. Goto, Effects of blue and red lights on gibberellin metabolism in tomato seedlings, *Hortic. J.* 88 (2019) 76–82. <https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-005>.
- [33] F. Hirose, N. Inagaki, A. Hanada, S. Yamaguchi, Y. Kamiya, A. Miyao, H. Hirochika, M. Takano, Cryptochrome and phytochrome cooperatively but independently reduce active gibberellin content in rice seedlings under light irradiation, *Plant Cell Physiol.* 53 (2012) 1570–1582. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs097>.

- [34] Y. Miao, Q. Chen, M. Qu, L. Gao, L. Hou, Blue light alleviates 'red light syndrome' by regulating chloroplast ultrastructure, photosynthetic traits and nutrient accumulation in cucumber plants, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 257 (2019) 108680. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108680>.
- [35] J. Moustaka, E. Panteris, I.D.S. Adamakis, G. Tanou, A. Giannakoula, E.P. Eleftheriou, M. Moustakas, High anthocyanin accumulation in poinsettia leaves is accompanied by thylakoid membrane unstacking, acting as a photoprotective mechanism, to prevent ROS formation, *Environ. Exp. Bot.* 154 (2018) 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.01.006>.
- [36] A.M. Hoffmann, G. Noga, M. Hunsche, Alternating high and low intensity of blue light affects PSII photochemistry and raises the contents of carotenoids and anthocyanins in pepper leaves, *Plant Growth Regul.* 79 (2016) 275–285. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0132-0>.
- [37] L. Huché-Thélier, L. Crespel, J. Le Gourrierec, P. Morel, S. Sakr, N. Leduc, Light signaling and plant responses to blue and UV radiations-Perspectives for applications in horticulture, *Environ. Exp. Bot.* 121 (2016) 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.009>.
- [38] N. Su, Q. Wu, Z. Shen, K. Xia, J. Cui, Effects of light quality on the chloroplastic ultrastructure and photosynthetic characteristics of cucumber seedlings, *Plant Growth Regul.* 73 (2014) 227–235. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9883-7>.
- [39] M. Košvancová-Zitová, O. Urban, M. Navrátil, V. Špunda, T.M. Robson, M. V. Marek, Blue radiation stimulates photosynthetic induction in *Fagus sylvatica* L., *Photosynthetica*. 47 (2009) 388–398. <https://doi.org/10.1007/s11099-009-0060-1>.
- [40] R. Matsuda, K. Ohashi-Kaneko, K. Fujiwara, E. Goto, K. Kurata, Photosynthetic Characteristics of Rice Leaves Grown under Red Light with or without Supplemental Blue Light, *Plant Cell Physiol.* 45 (2004) 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch203>.
- [41] M. Landi, M. Zivcak, O. Sytar, M. Brestic, S.I. Allakhverdiev, Plasticity of photosynthetic processes and the accumulation of secondary metabolites in plants in response to monochromatic light environments: A review, *Biochim. Biophys.*

- Acta - Bioenerg. 1861 (2020) 148131.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2019.148131>.
- [42] L. Zheng, M.-C. Van Labeke, Long-Term Effects of Red- and Blue-Light Emitting Diodes on Leaf Anatomy and Photosynthetic Efficiency of Three Ornamental Pot Plants, *Front. Plant Sci.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00917>.
- [43] L. Zheng, M.C. Van Labeke, Effects of different irradiation levels of light quality on *Chrysanthemum*, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 233 (2018) 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.033>.
- [44] R.P. de Araújo, A.A.F. de Almeida, J.P. Barroso, R.A. de Oliveira, F.P. Gomes, D. Ahnert, V. Baligar, Molecular and morphophysiological responses cocoa leaves with different concentrations of anthocyanin to variations in light levels, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 224 (2017) 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.008>.
- [45] J. Santini, J. Giannettini, S. Herbette, O. Pailly, P. Ollitrault, F. Luro, L. Berti, Physiological and biochemical response to photooxidative stress of the fundamental citrus species, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 147 (2012) 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.014>.
- [46] J. V. Jacobsen, P.M. Chandler, Gibberellin and Abscisic Acid in Germinating Cereals, in: *Plant Horm. Their Role Plant Growth Dev.*, Springer Netherlands, 1987: pp. 164–193. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3585-3_10.
- [47] E. Kharshiing, S.P. Sinha, Deficiency in phytochrome A alters photosynthetic activity, leaf starch metabolism and shoot biomass production in tomato, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 165 (2016) 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.10.026>.
- [48] S. Huyskens-Keil, I. Eichholz-Dündar, K. Hassenberg, W.B. Herppich, Impact of light quality (white, red, blue light and UV-C irradiation) on changes in anthocyanin content and dynamics of PAL and POD activities in apical and basal spear sections of white asparagus after harvest, *Postharvest Biol. Technol.* 161 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111069>.

- [49] D. Solecka, Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors, *Acta Physiol. Plant.* 19 (1997) 257–268. <https://doi.org/10.1007/s11738-997-0001-1>.
- [50] A. Manivannan, P. Soundararajan, N. Halimah, C.H. Ko, Blue LED Light Enhances Growth , Phytochemical Contents , and Antioxidant Enzyme Activities of *Rehmannia glutinosa* Cultured *In Vitro*, 56 (2015) 105–106. <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0114-1>.
- [51] S. Zielińska, A. Dryś, E. Piątczak, J. Kolniak-Ostek, M. Podgórska, J. Oszmiański, A. Matkowski, Effect of LED illumination and amino acid supplementation on phenolic compounds profile in *Agastache rugosa in vitro* cultures, *Phytochem. Lett.* 31 (2019) 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.02.029>.
- [52] L. Zheng, M.C. Van Labeke, Chrysanthemum morphology, photosynthetic efficiency and antioxidant capacity are differentially modified by light quality, *J. Plant Physiol.* 213 (2017) 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.03.005>.
- [53] A. Bach, A. Kapczyńska, K. Dziurka, M. Dziurka, The importance of applied light quality on the process of shoot organogenesis and production of phenolics and carbohydrates in *Lachenalia* sp. cultures in vitro, *South African J. Bot.* 114 (2018) 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.015>.
- [54] L. Gobbo-Neto, N.P. Lopes, Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, *Quim. Nova.* 30 (2007) 374–381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.
- [55] F. Bourgaud, A. Hehn, R. Larbat, S. Doerper, E. Gontier, S. Kellner, U. Matern, Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes, *Phytochem. Rev.* 5 (2006) 293–308. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9040-2>.
- [56] N. Kitamura, S. Kohtani, R. Nakagaki, Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 6 (2005) 168–185. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2005.08.002>.

- [57] J. Xu, L. Ma, D. Jiang, S. Zhu, F. Yan, Y. Xie, Z. Xie, W. Guo, X. Deng, Content evaluation of 4 furanocoumarin monomers in various citrus germplasms, *Food Chem.* 187 (2015) 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.007>.
- [58] W.L. Hung, J.H. Suh, Y. Wang, Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit, *J. Food Drug Anal.* 25 (2017) 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.008>.
- [59] A.E. Pires, Desenvolvimento e validação de metodologias para determinação de furanocumarinas em medicamentos fitoterápicos, (2004).
- [60] M.T. Terfa, K.A. Solhaug, H.R. Gislerød, J.E. Olsen, S. Torre, A high proportion of blue light increases the photosynthesis capacity and leaf formation rate of *Rosa* × *hybrida* but does not affect time to flower opening, *Physiol. Plant.* 148 (2013) 146–159. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01698.x>.
- [61] C.-X. Li, Z.-G. Xu, R.-Q. Dong, S.-X. Chang, L.-Z. Wang, M. Khalil-Ur-Rehman, J.-M. Tao, An RNA-Seq Analysis of Grape Plantlets Grown in vitro Reveals Different Responses to Blue, Green, Red LED Light, and White Fluorescent Light, *Front. Plant Sci.* (2017). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00078>.