

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
BACHARELADO EM AGRONOMIA**

**A IMPORTÂNCIA DA CULTURA DE TECIDOS ASSOCIADA
AO USO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) PARA
PRODUÇÃO DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO COM
MAIORES CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS**

ÉRICA LETÍCIA GOMES COSTA

Rio Verde – GO
Novembro de 2023

INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
BACHARELADO EM AGRONOMIA

**A IMPORTÂNCIA DA CULTURA DE TECIDOS ASSOCIADA
AO USO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) PARA
PRODUÇÃO DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO COM
MAIORES CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS**

ÉRICA LETÍCIA GOMES COSTA

Orientador: Prof. Dr. Aurélio Rubio Neto

Trabalho de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharel em Agronomia.

Rio Verde – GO
Novembro de 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

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

C837i Costa, Érica Letícia Gomes
A importância da cultura de tecidos associada ao uso de Diodos Emissores de Luz (LEDs) para produção de plantas nativas do Cerrado com maiores concentrações de metabólitos secundários / Érica Letícia Gomes Costa; orientador Aurélio Rubio Neto. -- Rio Verde, 2023.
40 p.

TCC (Graduação em Bacharelado em Agronomia) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2023.

1. Micropropagação. 2. qualidade espectral. 3. compostos biotivos. I. Neto, Aurélio Rubio , orient. II. 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, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, 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 (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Matrícula:

Título do trabalho:

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 01 / 01 /

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;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autoria, 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;
- Que 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.

Local

/

Data

Érica Letícia Gomes Costa

Assinatura do autor e /ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Arnelo Rubens Neto

Assinatura do orientador

Regulamento de Trabalho de Curso (TC) – IF Goiano - Campus Rio Verde

ANEXO V - ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

Aos 14 de novembro de 2023, às 16 horas, reuniu-se a Banca Examinadora composta por: Prof. Aurélio Rubio Neto (orientador), Prof. Arthur Almeida Rodrigues (membro externo) e Prof. Tainara Leal de Sousa (membro externo), para examinar o Trabalho de Curso (TC) intitulado “A importância da cultura de tecidos associada ao uso de Diodos Emissores de luz LEDs) para produção de plantas nativas do Cerrado com maiores concentrações de metabólitos secundários” de Érica Leticia Gomes Costa, estudante do curso de Bacharelado em Agronomia do IF Goiano – Campus Rio Verde, sob Matrícula nº 2021102200240571. A palavra foi concedida ao(a) estudante para a apresentação oral do TC, em seguida houve arguição do candidato pelos membros da Banca Examinadora. Após tal etapa, a Banca Examinadora decidiu pela APROVAÇÃO, do(a) estudante. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata, que, após apresentação da versão corrigida do TC, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora e Mediador de TC.

Rio Verde, 14 de novembro de 2023.

Aurélio Rubio Neto

Orientador

Dr. Arthur Almeida Rodrigues

Membro da Banca Examinadora



Me. Tainara Leal de Sousa

Membro da Banca Examinadora

Dr. Pablo da Costa Gontijo

Mediador de TC

Documento assinado eletronicamente por:

- **Arthur Almeida Rodrigues, Arthur Almeida Rodrigues - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde (10651417000500)**, em 29/11/2023 15:55:48.
- **Aurelio Rubio Neto, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 20/11/2023 14:47:21.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 20/11/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 548711

Código de Autenticação: ab98d26dbb



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 deste 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 esposo Thales, por todo o apoio, compreensão e auxílio direto em todos os momentos laboratoriais.

Ao orientador Prof. Dr. Aurélio Rúbio Neto, agradeço pela oportunidade, confiança e pelo incentivo o meu crescimento profissional.

Ao Instituto Federal Goiano, pela colaboração e estrutura do programa de Graduação em Agronomia.

RESUMO

As plantas são fontes de muitos metabólitos secundários bioativos que estão presentes em órgãos incluindo folhas, caules, raízes e flores. Os metabólitos secundários são usados em muitas indústrias, incluindo corantes, processamento de alimentos e indústrias cosméticas, e no controle agrícola, além de serem usados como matérias-primas farmacêuticas por seres humanos. Por isso a procura é grande; portanto, é necessário que sejam obtidos em grandes volumes, as grandes produções podem ser alcançadas utilizando métodos biotecnológicos. Para isso, a biotecnologia vegetal pode ser acionada por meio da cultura de tecidos vegetais associada ao cultivo usando Diodos Emissores de Luz (LEDs). Nesse sentido, o presente estágio supervisionado foi realizando junto ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, com acompanhamento do cultivo de plantas nativas *in vitro* associado ao uso de LEDs. Onde os objetivos foram: I) Ampliar o conhecimento prático e conciliar com os conhecimentos teóricos referente ao cultivo de plantas *in vitro* e II) Proporcionar contribuições de suma importância para a compreensão das características morfofisiológicas e o conteúdo de metabólitos secundários das plantas nativas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. O estágio foi de grande valia, uma vez que consolidou os ensinamentos obtidos na academia e possibilitou a oportunidade de relacionamento com profissionais com alto padrão de qualificação.

Palavras-chave: Micropropagação, qualidade espectral, compostos bioativos.

ABSTRACT

Plants are sources of many bioactive secondary metabolites that are present in organs including leaves, stems, roots and flowers. Secondary metabolites are used in many industries, including dyes, food processing and cosmetic industries, and in agricultural control, as well as being used as pharmaceutical raw materials by humans. That's why the demand is great; therefore, it is necessary that they be obtained in large volumes, large productions can be achieved using biotechnological methods. To achieve this, plant biotechnology can be activated through plant tissue culture associated with cultivation using Light Emitting Diodes (LEDs). In this sense, this supervised internship was carried out at the Plant Tissue Culture Laboratory of the Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, with monitoring of the cultivation of native plants *in vitro* associated with the use of LEDs. Where the objectives were: I) Expand practical knowledge and reconcile it with theoretical knowledge regarding the cultivation of plants *in vitro* and II) Provide extremely important contributions to the understanding of the morphophysiological characteristics and the content of secondary metabolites of native plants cultivated *in vitro* under different qualities of light. The internship was of great value, as it consolidated the lessons learned at the academy and provided the opportunity for relationships with professionals with a high standard of qualifications.

Keywords: Micropropagation, spectral quality, bioactive compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. A) Frutos maduros coletados para serem despulpados e as sementes semeadas. B) Bandejas com sementes de espécies nativas do Cerrado para produção de mudas..... 14**
- Figura 2. A e B) Plântulas produzidas em bandejas utilizando a técnica de estiolamento para obtenção de segmentos nodais para estabelecimento *in vitro* 14**
- Figura 3. A) Assepsia de explantes para estabelecimento *in vitro*. B) Inoculação de explantes em meio de cultivo. 16**
- Figura 4. Distribuição relativa do espectro de LEDs utilizados no cultivo *in vitro* de espécies nativas18**
- Figura 5. Mensuração de área foliar usando o software ImageJ.....20**
- Figura 6. A) Acompanhamento das respostas fisiológicas de plântulas produzidas *in vitro*. B) Medições de taxa fotossintética *in vitro* 21**
- Figura 7. Anatomia foliar de espécie nativa cultivada *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. (A, B) branco, (C) azul, (D) vermelho, (E) A/V 1:1, (F) 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.....22**
- Figura 8. Histoquímica de folhas de espécie nativa cultivada *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.....23**
- Figura 9. Cromatografo líquido de alta eficiência (HPLC – high performance liquid chromatography) usado para identificação e quantificação de metabólitos nos extratos obtidos de plantas nativas produzidas *in vitro* 25**
- Figura 10. - Cromatograma obtido por HPLC para plantas nativas produzidas *in vitro*..... 26**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	9
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS E DISCUSSÃO	13
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

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 (Uma et al., 2023). Portanto, é uma ferramenta importante para micropropagação rápida e conservação de espécies de plantas raras, endêmicas ou ameaçadas de extinção (Rather et al., 2022). As técnicas aplicadas *in vitro*, têm a vantagem de produzir compostos em condições ambientais estéreis e controladas, em comparação com cultivos convencionais de plantas (Chai et al., 2023).

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 (Gonçalves et al., 2023). O cultivo *in vitro* nos permite escolher e definir facilmente a qualidade e a intensidade da luz em que as mudas crescerão, bem como a temperatura e o fotoperíodo, visto que as mudas são comumente cultivadas em câmara de crescimento ou sala (da Silva et al., 2022). Vários fatores influenciam o crescimento e a fisiologia das plântulas cultivadas *in vitro*, mas a luminosidade se destaca como o mais influente, o uso de diodos emissores de luz (LEDs) coloridos pode modular a produção de metabólitos secundários (Lauria et al., 2023).

Em geral, lâmpadas fluorescentes costumavam ser utilizadas como padrão no cultivo de plantas *in vitro*, mas a década de 2000 trouxe a tecnologia de diodo emissor de luz (LEDs), que oferecia maior eficiência na conversão de energia elétrica em luz fotossinteticamente ativa do que as lâmpadas convencionais, ao mesmo tempo que facilitava os requisitos de resfriamento (Sanderson and Simons, 2014). O uso de LEDs no cultivo de plantas *in vitro*, portanto, permitiu reduzir o custo de iluminação e refrigeração. Permitindo ainda cultivar as plantas sob condições otimizadas de luz branca e irradiá-las com comprimentos de onda específicos para aumentar a produção de metabólitos específicos (Pang et al., 2023).

Os LEDs foram usados em unidades de crescimento de plantas pela National Aeronautics and Space Administration (NASA) nas câmaras ASTROCULTURE™ do Ônibus Espacial e da Estação Espacial. O projeto apoiou experimentos com plantas como batata, trigo e soja cultivadas sob iluminação LED no espaço (Siatkowska et

al., 2021). A tecnologia tem sido implementada em fábricas que cultivam folhas verdes, vegetais e plantas medicinais (Spiker et al., 2023; Nakayama and Nakazawa, 2023). Em nosso laboratório estamos construindo e otimizando um sistema de iluminação *in vitro* com o uso de LEDs para produção de plantas nativas do Cerrado com maior potencial para produção de metabólitos secundários *in vitro*.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo relatar o estágio supervisionado. Sendo objetivos: I) Ampliar o conhecimento prático e conciliar com os conhecimentos teóricos referente ao cultivo de plantas *in vitro* e II) Proporcionar contribuições de suma importância para a compreensão das características morfofisiológicas e o conteúdo de metabólitos secundários das plantas nativas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades e proporções de luz LEDs.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Potencial farmacológico de plantas nativas do Cerrado

Os estudos sobre a eficiência e o valor de plantas medicinais tem ampliado rapidamente, especialmente em países com ampla diversidade e longa história na medicina tradicional, no entanto a pesquisa a partir de fontes naturais é um desafio, visto que apenas um número limitado de plantas foi avaliado farmacologicamente, portanto o conhecimento etnobotânico torna-se primordial para a descoberta de potenciais terapêuticos para as plantas medicinais (Sarfraz and Ahmad, 2023). A utilização de medicamentos derivados de várias espécies de plantas tem representado uma alternativa no tratamento de diversas doenças, este uso está baseado em conhecimento popular e científico, que tem ganhado destaque graças a descoberta de compostos naturais a base de plantas que podem ser tão eficazes e seguros quanto drogas sintéticas (Suroowan et al., 2023)

Além da sua eficácia, os produtos naturais são, na sua maioria, não tóxicos e, portanto, podem ser utilizados como estratégias terapêuticas seguras. Embora as informações sobre os usos medicinais de diferentes plantas do Cerrado estejam amplamente disponíveis, atualmente não há uma revisão abrangente que relacione seus usos tradicionais como medicamentos com evidências científicas recentes, especialmente no que diz respeito a grande variedade de compostos fitoquímicos produzidos por essas plantas (da Cruz et al., 2022).

Entre os produtos naturais encontrados nas plantas, os metabólitos secundários são particularmente importantes para os humanos. Esses compostos exibem diferentes atividades biológicas e possuem uma ampla gama de utilizações (Ugbogu et al., 2021). Metabólitos secundários têm sido usados como biopesticidas, herbicidas, cosméticos e aditivos alimentares, e têm sido usados para melhorarsignificativamente a saúde humana. Metabólitos secundários têm sido usados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, com aproximadamente 50% de todos os medicamentos atualmente em ensaios clínicos sendo derivados de plantas (Joglekar et al., 2023).

A vasta e única biodiversidade do bioma Cerrado contém muitos compostos bioativos (Ribeiro Neto et al., 2020), que permitem aos pesquisadores brasileiros realizar pesquisas sustentáveis e desenvolver produtos inovadores baseados nesses compostos. O Cerrado brasileiro possui 5% da biodiversidade mundial e 44% da flora brasileira. Este bioma compreende um mosaíco de vários tipos de vegetação composto por formações vegetais que vão desde campos, savanas e até fisionomias florestais, como florestas secas e matas de galeria (Mandova, 2022).

Essa diversidade de ambientes influencia a abundância de plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e videiras, compostas por mais de 12.000 espécies que ocorrem espontaneamente no domínio do Cerrado, com alto grau de endemidade. A flora do Cerrado é utilizada por populações tradicionais (quilombolas, ribeirinhos, curandeiros e indígenas). Diversas plantas do Cerrado, como *Caryocar brasiliense*, *Brosimum gaudichaudii*, *Hancornia speciosa*, *Campomanesia pubescens*, *Dypteryx alata*, *Anacardium othonianum* RIZZ e *Eugenia dysenterica* (Centofante, 2020; Dantas et al., 2020a; Costa et al., 2021), são utilizadas ancestralmente pela população local como alimento e para fins terapêuticos no tratamento de diversas doenças.

2.2 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 (Hasnain et al., 2022). 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 (Velazco et al., 2023). 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 (Costa et al., 2021).

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 (Kulak et al., 2022). 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* (He et al., 2020).

2.3 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* (Cavallaro et al., 2023). 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) (Farrokhzad et al., 2022). 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* (CHEN et al., 2020). 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 (Miranda et al., 2020). 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 (Li et al., 2019). 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 específicas (Ramírez-Mosqueda et al., 2017).

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 (Costa et al., 2021; Huang et al., 2022).

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 (Li et al., 2020, 2021; Jin et al., 2023). 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 (Wang et al., 2022b, 2022a; Liu et al., 2023).

2.4 Produção de plantas nativas *in vitro*

É comum encontrarem-se nas diferentes regiões do Brasil centenas de espécies de valor econômico atual ou potencial aproveitadas no âmbito local e regional. A micropropagação dessas espécies florestais é uma alternativa viável para a produção de mudas em larga escala, bem como exploração de metabólitos secundários por elas produzido, uma vez que há uma crescente demanda desses compostos pela indústria (Heringer et al., 2017; Nowakowska et al., 2023; Chai et al., 2023).

Além disso, a micropropagação está entre as principais técnicas biotecnológicas empregadas na multiplicação de espécies vegetais, e com aplicações práticas comprovadas na micropropagação de espécies nativas (Hass et al., 2022). Por meio desta é possível ainda realizar a conservação de germoplasma *in vitro*, a redução do tempo de programas de melhoramento genético, a produção clonal massiva em curto espaço de tempo e a obtenção de plantas livres de pragas e patógenos (Ribeiro Neto et al., 2020). Dessa forma, os estudos de propagação *in vitro* de espécies nativas do Cerrado poderão ampliar o conhecimento científico dessas espécies e possibilitar a obtenção de um protocolo de produção de mudas em escala comercial, bem como exploração o incremento da produção dos metabólitos secundários de interesse, impulsionando e diversificando a ofertas desses compostos a indústria.

Assim, com foco na produção de plantas nativas que expressem maiores concentrações de metabólitos secundários, o laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO tem investido em projetos que promovam o uso de técnicas sofisticadas e modernas, se beneficiando da biotecnologia vegetal através da possibilidade de produzir metabólitos secundários *in vitro*, associado ao uso de LEDs, produção esta que é mais vantajosa devido à redução de tempo, qualidade e quantidade de material vegetal a ser extraído pela indústria, quando comparado à produção *in natura*. Segundo diversos estudos mostrados na literatura consultada, a produção destes metabólitos pode ser maior *in vitro* do que nos extratos de plantas de campo.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS E DISCUSSÃO

As atividades realizadas durante o estágio supervisionado se pautaram no acompanhamento e condução de experimentos com cultivo das espécies nativas *Brosimum gaudichaudii*, *Hancornia speciosa*, *Campomanesia pubescens*, *Dypteryx alata* e *Anacardium othonianum* RIZZ *in vitro* associado ao uso de LEDs com 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, no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO. As atividades envolveram desde funções simples como a coleta e despolpa de frutos até a manipulação de equipamentos sofisticados para mensurar parâmetros fisiológicos e bioquímicos em plantas.

3.1 Coleta de material vegetal

Frutos maduros de espécies nativas foram coletados entre setembro e novembro 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 despulpados para obtenção das sementes, que foram mantidas por 24 horas em sala fria a ($18 \pm 3^{\circ}\text{C}$) para manter a viabilidade das sementes até a semeadura. Posteriormente, as sementes foram semeadas em bandejas plásticas, contendo substrato comercial Bioplant®. As bandejas foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 45 dias para obtenção dos explantes.

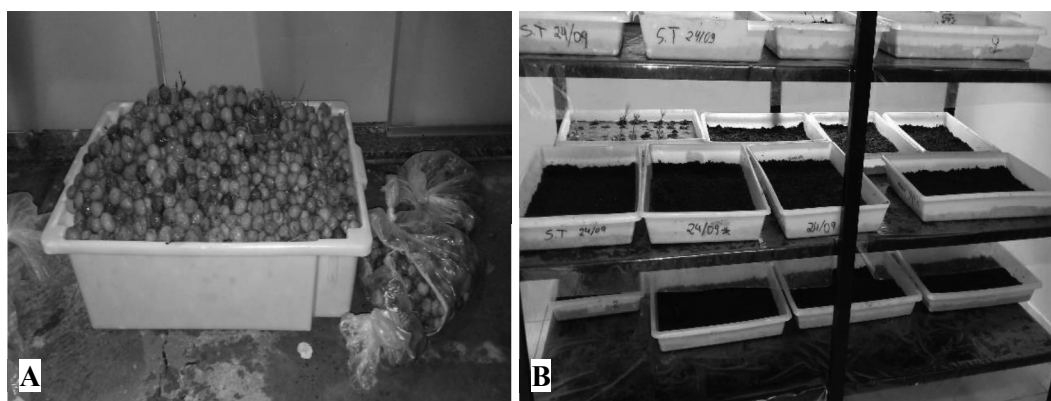


Figura 1. A) Frutos maduros de *Brosimum gaudichaudii* coletados para serem despulpados e as sementes semeadas. B) Bandejas com sementes de espécies nativas do Cerrado *Brosimum gaudichaudii*, *Hancornia speciosa*, *Campomanesia pubescens*,

Dypteryx alata e *Anacardium othonianum* RIZZ para produção de mudas.

3.2 Micropropagação por estiolamento

Aos 45 dias de semeadura, plântulas saudias e homogêneas foram selecionadas e segmentos nodais de aproximadamente 2,0 cm contendo duas brotações foram utilizados para o estabelecimento *in vitro*.

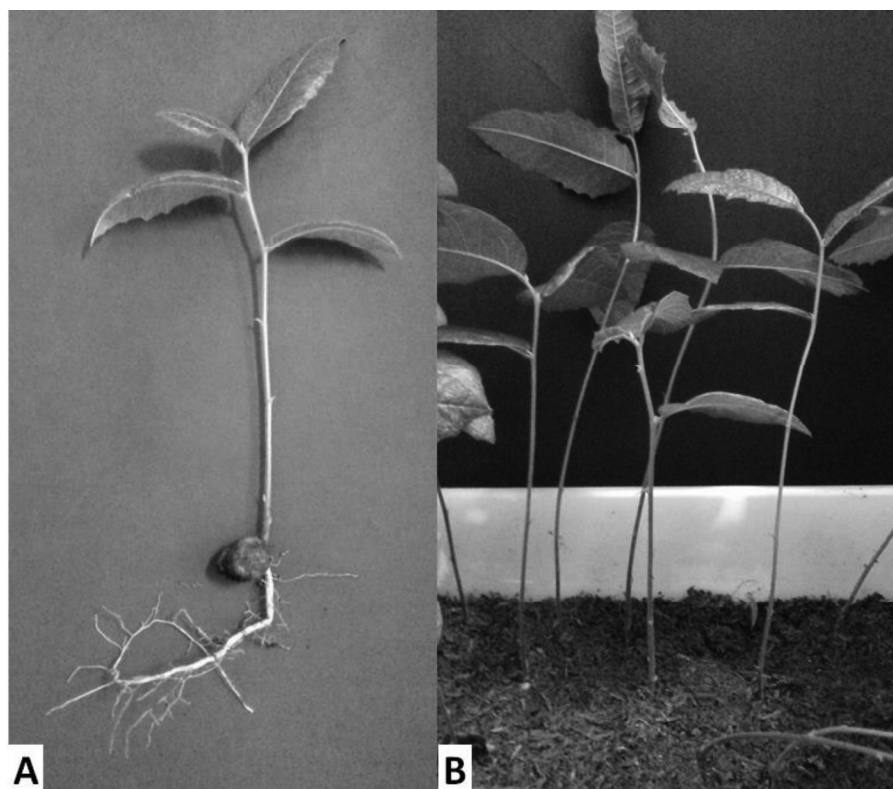


Figura 2. A e B) Plântulas produzidas em bandejas utilizando a técnica de estiolamento para obtenção de segmentos nodais para estabelecimento *in vitro*.

Os métodos convencionais de produção de plantas nativas demandam um longo período, demandando em novas áreas para produção e crescimento lento, além de possibilitar a disseminação de pragas e doenças. Não sendo assim viável para a obtenção de mudas com a finalidade de explantes *in vitro*, ao qual é imprescindível a produção de plantas saudias como fontes de explantes.

Nesse sentido, a técnica adotada para a obtenção dessas mudas foi o processo de estiolamento que é o desenvolvimento de brotos, ramos ou partes deles na ausência de luz, o que causa o crescimento dessas estruturas vegetais, geralmente alongado e com coloração amarela ou branca, em razão da ausência de clorofila (Rodrigues et al., 2017). No escuro, os entrenós da planta se alongam, conforme observados nas Figuras 2 A e B, separando os nós, que, normalmente, sob presença de luz, permaneceriam próximos uns dos outros. Entretanto, não é necessário atingir 100% de escuridão. Um forte sombreamento, superior a 90% é suficiente para a produção de mudas estioladas, no caso do trabalho foi utilizada sala com luminosidade reduzida.

Para fins de micropropagação, a separação dos nós facilita o desenvolvimento de gemas axilares e a manipulação das mudas regeneradas (Costa et al., 2016). Além disso, por apresentar maior alongamento entre os entrenós, a micropropagação por estiolamento proporciona aumento na obtenção de brotos por explante. Esse método, comparado com a propagação tradicional por gemas axilares, tem a vantagem de evitar lesões na zona de regeneração, minimizando a formação de calo e, conseqüentemente, proporcionando baixos níveis de variação somaclonal (Ambrosano, 2023). A redução do risco na obtenção de variantes somaclonais é também devida às baixas concentrações de reguladores de crescimento que são necessárias para favorecer o estiolamento das hastes, e subsequente proliferação das plantas (da Silva et al., 2021).

3.3 Estabelecimento asséptico *in vitro*

O primeiro passo é selecionar os segmentos e manter em água com três gotas de detergente (Tween 20) por 20 minutos. Em seguida, em fluxo laminar imergir em álcool etílico a 70% por um minuto; hipoclorito de sódio comercial - NaClO a 50% por 30 minutos e depois enxaguar três vezes em água autoclavada. Depois da desinfestação, os segmentos nodais devem ser cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio MS (Murashige and Skoog, 1962) 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 µmol de 6-benzilaminopurina (BAP). O pH deve ser ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da adição do agente gelificante. O meio de cultivo deve ser autoclavado a 120°C por 20 min. para posteriormente ser utilizado para a inoculação. Os tubos contendo os segmentos nodais devem ser mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 h a 100 µmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 ± 3°C, durante 30 dias.



Figura 3. A) Assepsia de explantes para estabelecimento *in vitro*. B) Inoculação de explantes em meio de cultivo.

A relevância do processo de desinfestação para o cultivo *in vitro*, ocorre devido a elevada proliferação de bactérias e fungos, que competem por nutrientes do meio de cultura e podem levar à morte da planta. Deste modo, o desenvolvimento de protocolos de assepsia e o controle de contaminação por microrganismos são etapas essenciais para o sucesso da micropropagação de plantas nativas *in vitro*.

A desinfestação é uma etapa problemática, pois o desinfestante deve eliminar ou reduzir os microrganismos do tecido vegetal sem danificar o mesmo. Alguns microrganismos podem ser endógenos ou estarem latentes tanto em sementes como em brotações. Por essa razão, muitas vezes a obtenção de tecidos vegetais livres de microrganismos é difícil. Porém, se apenas os meristemas forem retirados, esses geralmente estão livres de microrganismos (Xavier and Claros, 2021). A desinfestação do material juvenil geralmente não é difícil; entretanto, também são utilizados explantes de material adulto ou de plantas mantidas em campo, tornando difícil a desinfestação do material juvenil proveniente dessa condição, devido a elevada contaminação preexistente. A desinfestação de explantes coletados no campo é mais complicada, pois as percentagens de contaminação são frequentemente altas, quando comparadas com as de explantes juvenis ou retirados de mudas mantidas em casa de vegetação. A contaminação pode ser reduzida por pulverizações com inseticidas e fungicidas, envolvendo as brotações das plantas em sacos plásticos ou mantendo-os em casa de vegetação.

Os desinfetantes mais comumente utilizados são o hipoclorito de cálcio e o hipoclorito de sódio. O hipoclorito em pH 8,0 perde a sua eficiência e pode prejudicar o tecido vegetal provocando sua oxidação, porém em pH próximo de 6,0 é mais efetivo (Bonga and Aderkas, 1992). Geralmente, um surfactante como Tween®, ou um detergente, é adicionado à solução de hipoclorito para facilitar a sua ação, aumentando

o contato da solução com os tecidos (Torres et al., 1998). Porém, a adição deste pode, além de diminuir a contaminação, aumentar a toxicidade do hipoclorito para o tecido vegetal (Bidabadi and Mohan Jain, 2020). Geralmente, no início da desinfestação, é utilizado etanol a 70% durante alguns segundos, para quebrar a tensão superficial, aumentando assim o contato do desinfestante com o material vegetal e aumentar sua ação. Depois, o explante é mergulhado em hipoclorito de sódio em uma concentração que varia de 1 a 2% durante 10 a 30 minutos, com gotas de Tween® 20 ou 80, e em seguida são realizados enxágües em água estéril (Torres et al., 1998).

O sucesso da regeneração *in vitro* depende, portanto, de vários fatores, como: desinfestação, genótipo, tipo, idade e tamanho dos explantes, composição dos meios de cultura, condições de cultivo e tipos e dosagens de reguladores de crescimento adicionados ao meio, os quais, são considerados os principais controladores da morfogênese *in vitro*. Os meios de cultivo fornecem substâncias essenciais ao crescimento vegetal e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Neste processo, as vias bioquímicas e metabólicas básicas são conservadas; no entanto, mecanismos como a fotossíntese podem ser inativados pelas condições de cultivo ou pelo estágio de diferenciação celular (Costa et al., 2014a).

A composição desses meios é baseada nas exigências orgânicas e minerais das plantas, as quais buscam juntamente com as substâncias biossintéticas, suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais. Dentre os meios mais utilizados no cultivo *in vitro* se destaca o MS (Murashige and Skoog, 1962), comumente empregado para a indução e formação de brotos meristemáticos e composto por macro e micronutrientes, bem como vitaminas, fonte de carbono, suplementos orgânicos, como água de coco e fitorreguladores. Assim, podemos observar que a deficiência ou o excesso desses elementos pode interferir parcial ou completamente no sucesso do cultivo *in vitro*. Elementos como as vitaminas e os carboidratos também são de grande relevância haja vista que podem atuar como fonte extra de aminoácidos, a exemplo das vitaminas ou ainda atuar no enraizamento vegetal, como os carboidratos.

3.4 Qualidade e intensidade de luz ambiente *in vitro*

Posteriormente os explantes eram 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) (Figura 4) 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.

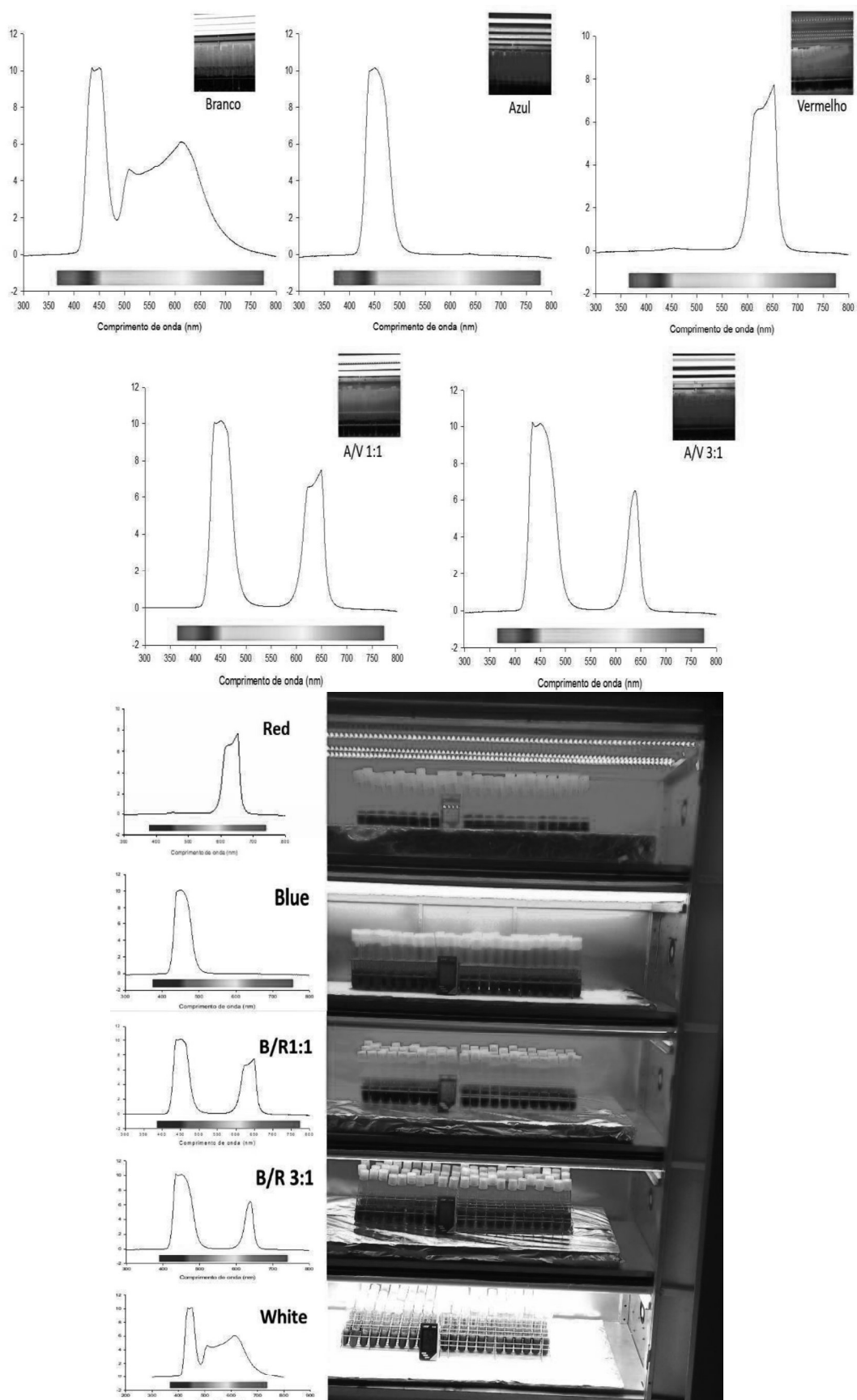


Figura 4. Distribuição relativa do espectro de LEDs utilizados no cultivo *in vitro* de espécies nativas.

A qualidade espectral foi determinada mediante utilização do espectrorradiômetro 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).

O comprimento de onda específico, a densidade de fluxo de fótons e o fotoperíodo influenciam além da morfogênese das plantas cultivadas *in vitro*, também no metabolismo secundário dessas plantas. Podendo, portanto, incrementar a produção de metabólitos secundários de interesse para a indústria farmacêutica, alimentícia, entre outras.

As fontes de luz artificiais comumente utilizadas para o cultivo *in vitro* são lâmpadas fluorescentes, lâmpadas de sódio de alta pressão lâmpadas de haletos metálicos, todas com baixa qualidade e comprimentos desnecessários para melhorar o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Assim como alternativa às fontes de luz utilizadas tradicionalmente, o laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IF Goiano – Campus Rio Verde tem introduzido na propagação de plantas os diodos emissores de luz (LEDs), mais especificamente no cultivo de plantas micropropagadas, uma vez que, diferentes estudos mostram plantas *in vitro* mais vigorosas e com maior produção de metabólitos secundários quando cultivadas sob condições de iluminação por LEDs (Dantas et al., 2020b; Centofante et al., 2020; Costa et al., 2021; Barceló-Muñoz et al., 2021; Nowakowska et al., 2023).

As diferentes qualidade de luz usada na produção de plantas *in vitro* pode induzir certas alterações no metabolismo das plantas, incluindo o incremento da produção de metabólitos secundários como ácido clorogênico, ácido ferúlico, orientina, quercitrina e quercetina, bergapteno e psoraleno. Em estudo realizado no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano – Campus RioVerde com a espécie nativa *Brosimum gaudichaudii* o conteúdo de psoraleno e bergapteno na parte aérea foi aumentado na exposição à qualidade de luz azul e proporção 3:1 (azul:vermelho) (Costa et al., 2021).

3.5 Uso de softwares de processamento e análise de imagens

Determinou-se o área foliar (cm²) das plantas produzidas *in vitro*, onde a área foliar foi analisada usando ImageJ® (Rasband, WS; US ImageJ. Bethesda, MD, EUA).

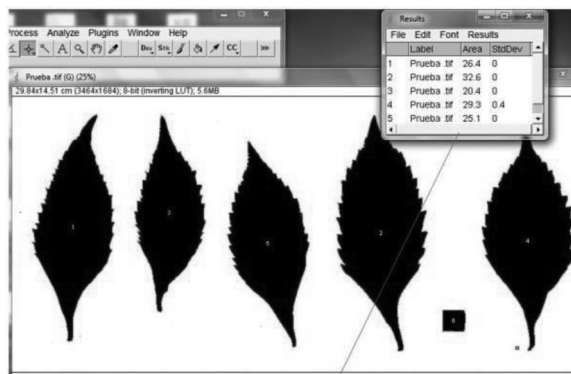


Figura 5. Mensuração de área foliar usando o software ImageJ.

Dos diferentes softwares de processamento e análise de imagens, disponibilizados gratuitamente, destaco o uso do ImageJ® desenvolvido por Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA, em linguagem Java. O ImageJ® atua na imagem pela intensidade, ou nível de cinza dos pixels, permitindo exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 bits (Hannickel et al., 2012). O programa computacional oferece suporte à diversos formatos de imagem como TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM e FITS contribuindo assim para avaliações morfológicas, area foliar e quantificação ou mensurar do componente de plantas produzidas *in vitro*, visto que em muitos casos as folhas apresentam tamanho reduzido dificultando a mensuração.

3.6 Estudos fisiológicos em plantas *in vitro*

Após 50 dias sob as condições de diferentes qualidades de luz as plântulas de espécies nativas são avaliadas para avaliação do comportamento fisiológico, visto que a fisiologia ou seja, o seu funcionamento trata dos processos vitais que ocorrem ao longo do seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Assim, as pesquisas envolvendo a fotossíntese, o comportamento do aparato fotossintético e a produção de pigmentos, possuem uma importância vital para compreender o comportamento das plantas produzidas, visto que a depender desse comportamento da planta ela pode produzir mais ou menos metabólitos secundários que seja de interesse. Nossos resultados mostraram que a proporção de luz A/V 1:1 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 das espécies nativas avaliadas *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.



Figura 6. A) Acompanhamento das respostas fisiológicas de plântulas produzidas *in vitro*. B) Medições de taxa fotossintética *in vitro*.

A medição das taxas de assimilação de CO₂ utilizando analisadores de gases infravermelhos (IRGAs) é o método mais comumente utilizado em estudos de plantas *ex vivo*, incluindo culturas agrícolas (Calzadilla et al., 2022) e espécies florestais (Sanchez Fonseca et al., 2023); o uso deste método também foi relatado em alguns estudos *in vitro* (Costa et al., 2014b, 2021; Silva et al., 2020). No entanto, faltam protocolos funcionais e confiáveis para medir as taxas fotossintéticas de plantas cultivadas *in vitro* utilizando métodos que não alterem o ambiente *in vitro*, por exemplo, evitando a desidratação e minimizando lesões nas mudas.

Os sistemas de propagação *in vitro* são caracterizados por baixas taxas de transpiração e fotossíntese, absorção restrita de água e nutrientes e altas taxas de respiração no escuro, o que reduz a taxa de crescimento do explante (TILKAT et al., 2020). Além disso, a alta umidade relativa (UR) no interior do recipiente de cultura reduz a deposição de ceras epicuticulares, bem como o desenvolvimento de estômatos funcionais, o que pode levar a perdas durante a aclimação (Zein El Din et al., 2020).

A fluorescência da clorofila (chl) também é uma avaliação que pode ser usada para determinar a eficiência fotoquímica e a fotoinibição em plantas (Krause and

Weis, 2003), pois este parâmetro reflete o desempenho e a capacidade fotossintética (Janeeshma et al., 2022). Medindo a fluorescência de chl *a*, pode-se determinar o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) (F_v/F_m), o rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F_m'$) (Genty et al., 1989), a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) e os coeficientes de extinção para extinção fotoquímica e não fotoquímica (Maxwell¹ and Johnson², 2000).

Dois fatores adicionais que refletem a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, o crescimento e a adaptabilidade a diferentes ambientes, são os conteúdos de clorofila e carotenóides. O teor de clorofila foliar pode ser utilizado para estimar o potencial fotossintético das plantas devido à sua relação direta com a absorção de luz e transferência de energia (Zhou et al., 2023). A quantificação precisa dos pigmentos cloroplastídicos é relativamente simples e, quando avaliada em combinação com outros parâmetros fisiológicos, como fluorescência e trocas gasosas, pode ampliar nossa compreensão do aparelho fotossintético e sua função nas plantas.

3.7 Estudos morfoanatômicos e histoquímicos em plantas *in vitro*

O emprego de análises anatômicas e histoquímicas permitem a visualização detalhada das alterações celulares e a confirmação do desenvolvimento regular de tecidos relacionada ao processo da indução de novas brotações durante o cultivo *in vitro*.

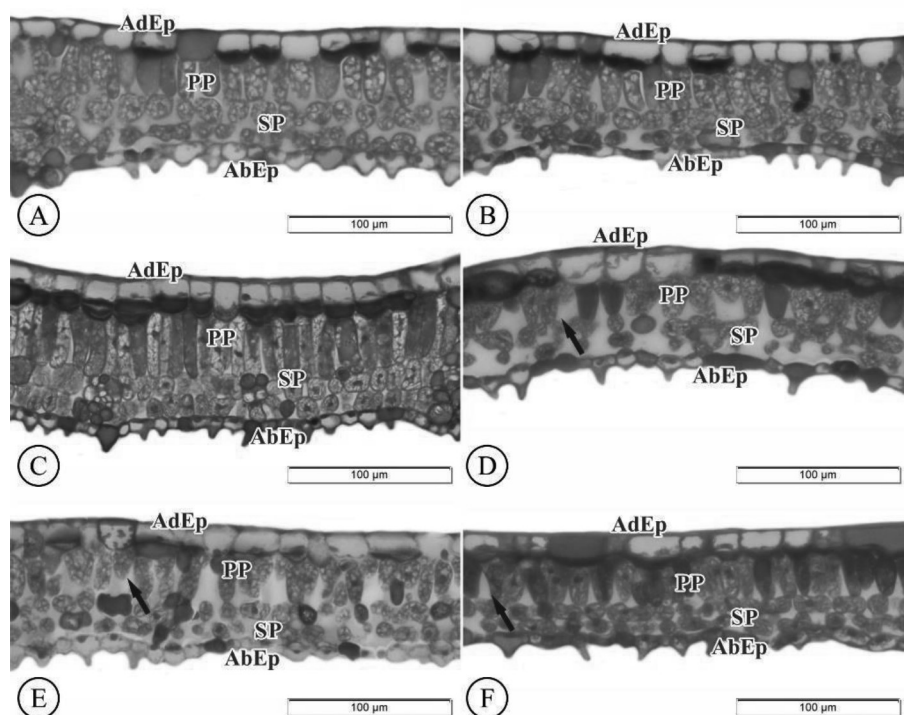


Figura 7. Anatomia foliar da espécie nativa *Brosimum gaudichaudii* cultivada *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. (A, B) branco, (C) azul, (D) vermelho, (E) A/V 1:1, (F) A/V 3:1. (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. (Xy) xilema. (Ph) Floema. (Fi) Fibra. (CP) Parênquima clorofiliano. Setas pretas indicam alterações na estrutura celular.

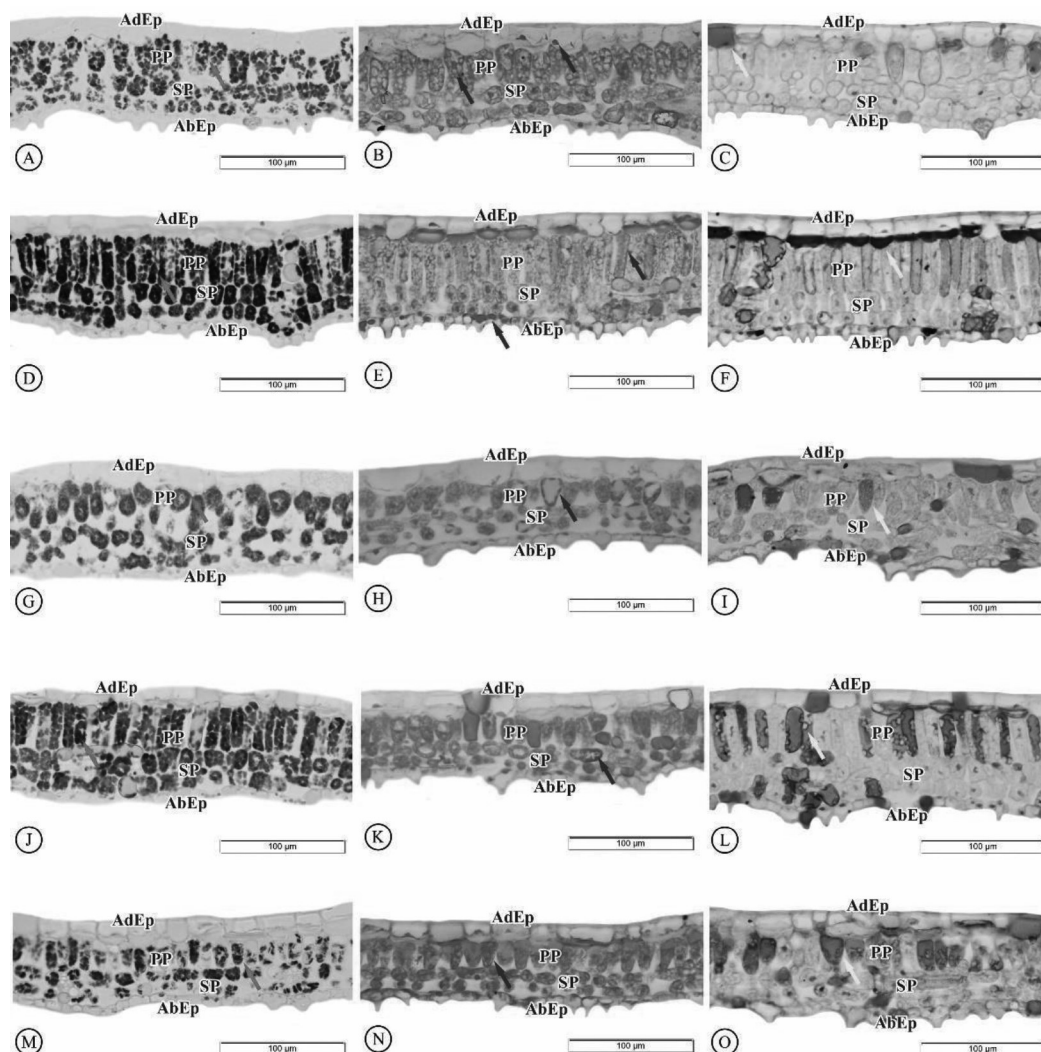


Figura 8. Histoquímica de folhas da espécie nativa *Brosimum gaudichaudii* cultivada *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. (A - C) branco, (D - F) azul, (G - I) vermelho, (J - L) A/V 1:1, (M - O) A/V 3:1. (AdEp) epiderme adaxial. (AbEp) epiderme abaxial. (PP) parênquima paliçádico. (SP) parênquima esponjoso. Setas verdes indicam acúmulo de amido. Setas azuis indicam acúmulo de proteínas. Setas amarelas indicam produção de compostos fenólicos.

Os parâmetros físico-químicos controlados *in vitro* são os principais fatores que afetam o crescimento das plantas, a forma e a morfologia das folhas, a caracterização microestrutural e bioquímica, a eficiência fotossintética e outras atividades fisiológicas (Heringer et al., 2017; Manokari et al., 2021). As folhas respondem altamente às mudanças do ambiente externo. A cutícula subdesenvolvida e seus componentes, estômatos não funcionais e anormalidades estruturais, sistemas vasculares pouco desenvolvidos, pigmentos fotossintéticos reduzidos e localização de metabólitos primários e secundários são encontrados nas plantas cultivadas *in vitro*. As plântulas com tais distúrbios geralmente apresentam uma alta taxa de

mortalidade e provaram ser difíceis de estabelecer *in vivo*.

Assim, a avaliação ultraestrutural foliar fornece uma possível solução para identificar os distúrbios anatômicos e fisiológicos de plântulas micropropagadas. Este conhecimento poderia ajudar a reduzir o risco de mortalidade, melhorar a aclimação em estufas e o estabelecimento bem-sucedido de plantas no solo (Manokari et al., 2021). Além disso, a avaliação detalhada dos parâmetros anatômicos e histoquímicos foliares contribui para a ampliação do conhecimento existente sobre o crescimento e desenvolvimento durante a micropropagação de espécies nativas, e identificar possível localização de metabólitos secundários e transições estruturais para o processo de aclimação (de Almeida et al., 2023).

3.8 Análises fitoquímicas plantas *in vitro*

Estudos da fitoquímica e farmacologia de várias espécies de nativas do Cerrado forneceram uma visão preliminar sobre o seu potencial valor terapêutico. Novas abordagens baseadas em práticas de cultura de tecidos vegetais fornecem disposições que promovem facilmente a modificação da fonte e a extração de compostos secundários em qualidades e quantidades mais elevadas (Mohaddab et al., 2022). Os métodos de cultura de tecidos para plantas, incluindo calos e propagação *in vitro*, garantem a taxa de produção de compostos secundários em maiores quantidades sem necessidade de obtenção de plantas em seu ambiente natural.

Conforme mencionado acima, os sistemas adaptados a partir de técnicas de cultura de tecidos devem ser utilizados para produzir diferentes compostos como produtos biotecnológicos. Para produzir metabólitos secundários, as técnicas de cultura de tecidos mais bem-sucedidas para aplicações biotecnológicas incluem o uso de cultura de calos, cultura de raízes secundárias, cultura de protoplastos, folhas e caules e abordagens de micropropagação.

Neste estudo, em vez de outros estudos, a ênfase não foi nos sistemas de transferência de genes, mas nos sistemas de cultura de tecidos, e foram fornecidas informações sobre metabólitos secundários obtidos usando cultura de tecidos clássica associada ao uso de LEDs nas espécies nativas.



Figura 9. Cromatografo líquido de alta eficiência (HPLC – high performance liquid chromatography) usado para identificação e quantificação de metabólitos nos extratos obtidos de plantas nativas produzidas *in vitro*.

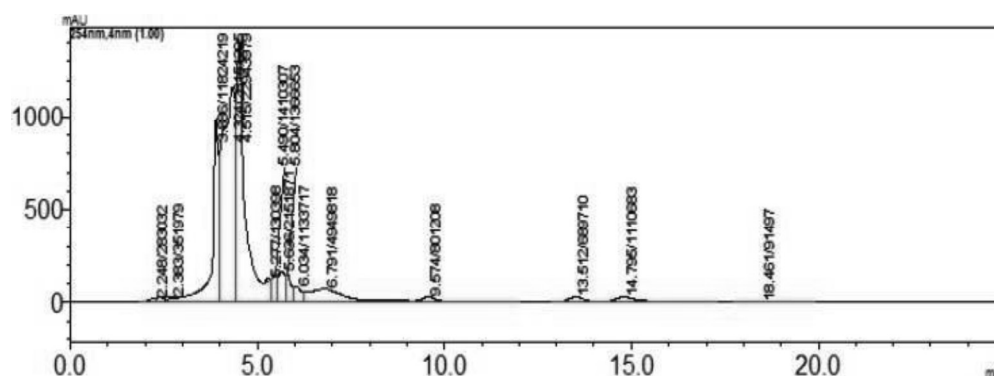


Figura 10. - Cromatograma obtido por HPLC para plantas nativas produzidas *in vitro*

O estudo morfológico das plantas, e o estudo das suas estruturas químicas, associadas aos processos cromatográficos (HPLC) tem sido cada vez mais utilizadas para a avaliação dos compostos naturais. A associação destas técnicas permite a identificação de milhares de substâncias nas plantas, dentre outras fontes naturais, levando em conta também a pesquisa de novas ferramentas de prospecção para novos fitoterápicos (Shhreiner, 2019).

Especialmente os métodos de cultura de tecidos vegetais têm uma base substancial na produção de metabólitos secundários de plantas que são usados em uma ampla gama de diferentes indústrias, incluindo agricultura, tinturaria, processamento de alimentos e indústrias cosméticas, além de serem usados como

matérias-primas farmacêuticas por seres humanos em geral (Fazili et al., 2022). Vários compostos bioativos foram identificados por meio das análises de HPLC e alguns deles puderam ser quantificados utilizando padrões: ácido clorogênico, ácido ferúlico, orientina, quercitrina e quercetina, bergapteno e psoraleno.

Gostaria de enfatizar a importância da participação nos trabalhos envolvendo as avaliações fitoquímicas das plantas produzidas *in vitro* para identificação dos metabólitos secundários, especialmente para pesquisadores que trabalham na área de cultura de tecidos, visto que essas análises promovem o real conhecimento do grande potencial da produção de plantas *in vitro* para obtenção de metabólitos secundários.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio supervisionado é de grande importância para todo e qualquer estudante pois é a melhor maneira de consolidar os ensinamentos obtidos na academia e vivenciar a teoria na prática. A oportunidade que me foi concedida de realizar o estágio em um laboratório altamente tecnológico e organizado, foi uma experiência incrível.

O relacionamento com profissionais com alto padrão de qualificação, apresentou e ensinou postura e atitudes diante de circunstâncias indesejadas e inesperadas para tomadas de decisões, deixando-me munida de experiências que só poderiam ser adquiridas através desse convívio, além da convivência com os demais profissionais, permitindo aprimorar o networking na área e acrescentando no conhecimento profissional e pessoal.

Observando o conduzimento de um grande laboratório de pesquisa, pode-se observar a grande responsabilidade que o Engenheiro Agrônomo possui na realização de suas funções, o acompanhamento técnico e o acréscimo de seus conhecimentos técnicos colaboram com a inserção de novas tecnologias, inovação e ganhos de produtividades independente da área de atuação ao qual decidir seguir.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

de Almeida, V. P., Monchak, I. T., da Costa Batista, J. V., Grazi, M., Ramm, H., Raman, V., Baumgartner, S., Holandino, C., and Manfron, J. 2023. Investigations on the morpho-anatomy and histochemistry of the European mistletoe: *Viscum album* L. subsp. *album*. *Scientific Reports* 2023 13:1 13(1):1–13.

Ambrosano, M. N. 2023. Marcelo_Nalin_Ambrosano_versao_revisada.

Barceló-Muñoz, A., Barceló-Muñoz, M., and Gago-Calderon, A. 2021. Effect of LED Lighting on Physical Environment and Microenvironment on In Vitro Plant Growth and Morphogenesis: The Need to Standardize Lighting Conditions and Their Description. *Plants* 2022, Vol. 11, Page 60 11(1):60.

Bidabadi, S. S. and Mohan Jain, S. 2020. Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 702 9(6):702.

Bonga, J. M. and Aderkas, P. 1992. *Cultura in vitro de árvores*. [Internet]. Available at https://books.google.ca/books?hl=en&lr=&id=vjI5KXFZlcoC&oi=fnd&pg=IA9&ots=bCw8e7H1qt&sig=CmyPxCahY6rxOvv_FErJYwTrVNg#v=onepage&q&f=false Website

Calzadilla, P. I., Carvalho, F. E. L., Gomez, R., Lima Neto, M. C., and Signorelli, S. 2022. Assessing photosynthesis in plant systems: A cornerstone to aid in the selection of resistant and productive crops. *Environmental and Experimental Botany* 201:104950.

Cavallaro, V., Avola, G., Fascella, G., Pellegrino, A., and Ierna, A. 2023. Effects of Spectral Quality and Light Quantity of LEDs on In Vitro Shoot Development and Proliferation of *Ananas comosus* L. Merr. *Agronomy* 2023, Vol. 13, Page 1072 13(4):1072.

Centofante, A. R. 2020. Light quality on the morphoanatomy and physiology of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. seedlings. *Scientia Horticulturae* 259:108765.

Centofante, A. R., Rubio Neto, A., Vasconcelos Filho, S. C., Oliveira, É. A., Assis, E. S. de, Rosa, M., and Silva, F. G. 2020. Corrigendum to “Light quality on the morphoanatomy and physiology of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. Seedlings” [*Scientia Horticulturae* 259 (2019) 108765]. *Scientia Horticulturae* 267:109083.

Chai, W. Y., Goh, J. K., Kalavally, V., Rahman, S., Lim, Y. Y., and Choo, W. S. 2023. Enhancing rosmarinic acid production and regulating enzyme activity in *Melissa officinalis* L. using spectrally tunable light-emitting diodes. *Industrial Crops and Products* 204:117332.

CHEN, L. li, ZHANG, K., GONG, X. chen, WANG, H. ying, GAO, Y. hui, WANG, X. quan, ZENG, Z. hai, and HU, Y. gao. 2020. 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. *Journal of Integrative Agriculture* 19(1):108–119.

Costa, A. C., Rosa, M., Megguer, C. A., Silva, F. G., Pereira, F. D., and Otoni, W. C. 2014a. A reliable methodology for assessing the in vitro photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117(3):443–454.

Costa, A. C., Rosa, M., Megguer, C. A., Silva, F. G., Pereira, F. D., and Otoni, W. C. 2014b. A reliable methodology for assessing the in vitro photosynthetic competence of two Brazilian savanna species : *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*.:443–454.

Costa, É. L. G., Farnese, F. dos S., de Oliveira, T. C., Rosa, M., Rodrigues, A. A., Resende, E. C., Januario, A. H., and Silva, F. G. 2021. Combinations of Blue and Red LEDs Increase the Morphophysiological Performance and Furanocoumarin Production of *Brosimum gaudichaudii* Trécul in vitro. *Frontiers in Plant Science* 12:680545.

Costa, O. C., Oliveira, D. L., Silva, A. R., Barradas, A., Crespo, J. P., Duque, A. S., and Fevereiro, P. 2016. Reducing etiolation-like effect and flowering in an in vitro micropropagated *Trifolium resupinatum* elite genotype. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 125(1):177–181.

da Cruz, J. E. R., Saldanha, H. C., Freitas, G. R. O. e., and Morais, E. R. 2022. A review of medicinal plants used in the Brazilian Cerrado for the treatment of fungal and bacterial infections. *Journal of Herbal Medicine* 31:100523.

Dantas, L. A., Rosa, M., Resende, E. C., Silva, F. G., Pereira, P. S., Souza, A. C. L., de Lima e Silva, F. H., and Neto, A. R. 2020a. Spectral quality as an elicitor of bioactive compound production in *Solanum aculeatissimum* JACQ cell suspension. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 204:111819.

Dantas, L. A., Rosa, M., Resende, E. C., Silva, F. G., Pereira, P. S., Souza, A. C.

- L., de Lima e Silva, F. H., and Neto, A. R.** 2020b. Spectral quality as an elicitor of bioactive compound production in *Solanum aculeatissimum* JACQ cell suspension. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 204:111819.
- Farrokhzad, Y., Babaei, A., Yadollahi, A., Kashkooli, A. B., and Mokhtassi-Bidgoli, A.** 2022. In vitro rooting, plant growth, monosaccharide profile and anatomical analysis of Phalaenopsis regenerants under different regions of visible light. *South African Journal of Botany* 149:622–631.
- Fazili, M. A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U., and Geelani, S. N.** 2022. In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bulletin of the National Research Centre* 46(1):35.
- Genty, B., Briantais, J. M., and Baker, N. R.** 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 990(1):87–92.
- Gonçalves, D. S., Souza, D. M. S. C., Fernandes, S. B., Molinari, L. V., Dorigan, A. F., Konzen, E. R., Teixeira, G. L., and Brondani, G. E.** 2023. Effect of light spectra on in vitro multiplication, elongation and adventitious rooting stages of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J. C. Wendl. *Advances in Bamboo Science* 4:100035.
- Hannickel, A., Henrique, M., Lins, H., Barros, D., and Sigaud, R. X.** 2012. Image J como ferramenta para medida da área de partículas de magnetita em três escalas nanométricas. *Cit* 4:16–26.
- Hasnain, A., Naqvi, S. A. H., Ayesha, S. I., Khalid, F., Ellahi, M., Iqbal, S., Hassan, M. Z., Abbas, A., Adamski, R., Markowska, D., Baazeem, A., Mustafa, G., Moustafa, M., Hasan, M. E., and Abdelhamid, M. M. A.** 2022. Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Frontiers in Plant Science* 13:1009395.
- Hass, O. O., Ornellas, T. S., and Bittencourt, R.** 2022. In vitro propagation of *Colubrina glandulosa* Perkins: a potential native species for reforestation programs. *Ciencia Florestal* 32(1):287–308.
- He, C., Zeng, Y., Fu, Y., Wu, J., and Liang, Q.** 2020. Light quality affects the proliferation of in vitro cultured plantlets of *Camellia oleifera* Huajin. *PeerJ* 8.
- Heringer, A. S., Reis, R. S., Passamani, L. Z., de Souza-Filho, G. A., Santa-Catarina, C., and Silveira, V.** 2017. Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. *Acta*

Physiologiae Plantarum 39(2):1–14.

Huang, W., Yang, G., Liu, D., Li, Q., Zheng, L., and Ma, J. 2022. Metabolomics and transcriptomics analysis of vitro growth in pitaya plantlets with different LED Light spectra treatment. *Industrial Crops and Products* 186:115237.

Janeeshma, E., Johnson, R., Amritha, M. S., Noble, L., Raj Aswathi, K. P., Telesiński, A., Kalaji, H. M., Auriga, A., and Puthur, J. T. 2022. Modulations in Chlorophyll a Fluorescence Based on Intensity and Spectral Variations of Light. *International Journal of Molecular Sciences* 23(10).

Jin, D., Su, X., Li, Y., Shi, M., Yang, B., Wan, W., Wen, X., Yang, S., Ding, X., and Zou, J. 2023. Effect of Red and Blue Light on Cucumber Seedlings Grown in a Plant Factory. *Horticulturae* 2023, Vol. 9, Page 124 9(2):124.

Joglekar, S. S., Soman, Y., and Kale, A. A. 2023. Natural compounds for health and environment: past, present, and future. *New Horizons in Natural Compound Research*:1–15.

Krause, G. H. and Weis, E. 2003. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525> 42(1):313–349.

Kulak, V., Longboat, S., Brunet, N. D., Shukla, M., and Saxena, P. 2022. In Vitro Technology in Plant Conservation: Relevance to Biocultural Diversity. *Plants* 11(4).

Lauria, G., Lo Piccolo, E., Ceccanti, C., Paoli, L., Giordani, T., Guidi, L., Malorgio, F., Massai, R., Nali, C., Pellegrini, E., Remorini, D., Sanità Di Toppi, L., Vernieri, P., and Landi, M. 2023. Supplemental red light more than other wavebands activates antioxidant defenses in greenhouse-cultivated *Fragaria × ananassa* var. Elsanta plants. *Scientia Horticulturae* 321:112319.

Li, S., Zhou, L., Wu, S., Liu, L., Huang, M., Lin, S., and Ding, G. 2019. Effects of LED light on *Acacia melanoxylon* bud proliferation in vitro and root growth ex vitro. *Open Life Sciences* 14(1):349–357.

Li, Y., Liu, Z., Shi, Q., Yang, F., and Wei, M. 2021. Mixed red and blue light promotes tomato seedlings growth by influencing leaf anatomy, photosynthesis, CO₂ assimilation and endogenous hormones. *Scientia Horticulturae* 290:110500.

Li, Y., Xin, G., Liu, C., Shi, Q., Yang, F., and Wei, M. 2020. Effects of red and blue light on leaf anatomy, CO₂ assimilation and the photosynthetic electron transport capacity of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings. *BMC Plant Biology* 20(1):1–16.

Liu, M., Zhao, Y., Fan, P., Kong, J., Wang, Y., Xu, X., Xu, M., Wang, L., Li, S.,

- Liang, Z., Duan, W., and Dai, Z.** 2023. Grapevine plantlets respond to different monochromatic lights by tuning photosynthesis and carbon allocation. *Horticulture Research* 10(9).
- Mandova, T.** 2022. Natural Products Research & The Wealth of Brazilian Biodiversity (NPR & WBB). *Phytochemistry Letters* 47:180–186.
- Manokari, M., Priyadharshini, S., and Shekhawat, M. S.** 2021. Microstructural and histochemical variations during in vitro to in vivo plant developments in *Aloe vera* (L.) Burm.f (Xanthorrhoeaceae). *Industrial Crops and Products* 160:113162.
- Maxwell¹, K. and Johnson², G. N.** 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345):659–668.
- Miranda, N. A., Xavier, A., Otoni, W. C., Gallo, R., Gatti, K. C., de Moura, L. C., Souza, D. M. S. C., Maggioni, J. H., and Suellen, S. S.** 2020. Quality and Intensity of Light in the In Vitro Development of Microstumps of *Eucalyptus urophylla* in a Photoautotrophic System. *Forest Science* 66(6):754–760.
- Mohaddab, M., El Goumi, Y., Gallo, M., Montesano, D., Zengin, G., Bouyahya, A., and Fakiri, M.** 2022. Biotechnology and In Vitro Culture as an Alternative System for Secondary Metabolite Production. *Molecules* 27(22):1–20.
- Murashige, T. and Skoog, F.** 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473–497.
- Nakayama, M. and Nakazawa, Y.** 2023. Effects of environmental control and LED supplemental lighting on strawberry growth and yield in a subtropical climate. *Scientia Horticulturae* 321:112349.
- Nowakowska, K., Kowalczyk, K., Pawelczak, A., and Gajc-Wolska, J.** 2023. Energy Efficiency of LEDs during Micropropagation of *Helleborus* ‘Molly’s White.’ *Agriculture* 2023, Vol. 13, Page 1265 *13*(6):1265.
- Pang, W. Q., Tan, S. T., Mad’ Atari, M. F., Yoong, I. C. K., and Subramaniam, S.** 2023. Establishment of an efficient micropropagation protocol for Cameron Highlands White Strawberry (*Fragaria x ananassa*) using a light emitting diode (LED) system. *South African Journal of Botany* 157:189–200.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., and Luna-Sánchez, I. J.** 2017. Light quality affects growth and development of in vitro plantlet of *Vanilla planifolia* Jacks. *South African Journal of Botany* 109:288–293.
- Rather, G. A., Verma, R., Sharma, B., Sharma, A., and Kumar, A.** 2022. Tissue culture: A perpetual source for the conservation of medicinally important endangered

plant species. *Advances in Plant Tissue Culture: Current Developments and Future Trends* Elsevier.

Ribeiro Neto, J. A., Pimenta Tarôco, B. R., Batista dos Santos, H., Thomé, R. G., Wolfram, E., and Maciel de A Ribeiro, R. I. 2020. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology* 260:112547.

Rodrigues, A. A. de J., Santos, E. de O., Takane, R. J., and de Carvalho, A. C. P. P. 2017. Artificial light and growth regulators on the in vitro etiolation of *Cattleya labiata*. *Revista Ciencia Agronomica* 48(2):296–302.

Sanchez Fonseca, C. L., Silva, D. M., dos Santos Gasparini, T. A., and Cuzzuol, G. R. F. 2023. Photosynthesis of plants of shade-tolerant ecotype of *Paubrasilia echinata* are more tolerance to drought than the sun-tolerant ecotype. *Plant Stress* 8:100157.

Sanderson, S. W. and Simons, K. L. 2014. Light emitting diodes and the lighting revolution: The emergence of a solid-state lighting industry. *Research Policy* 43(10):1730–1746.

Sarfraz, H. and Ahmad, I. Z. 2023. A systematic review on the pharmacological potential of *Linum usitatissimum* L.: a significant nutraceutical plant. *Journal of Herbal Medicine* 42:100755.

Shhreiner, G. E. 2019. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *ALOYSIA GRATISSIMA* (GILLIES & HOOK.) TRONC. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology* 224(11):122–130.

Siatkowska, K., Chraniuk, M., Bollin, P., and Banasiuk, R. 2021. Light emitting diodes optimisation for secondary metabolites production by *Droseraceae* plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 224:112308.

da Silva, B. de F. B., de Souza, E. H., de Oliveira, R. S., Ledo, C. A. da S., and Souza, F. V. D. 2021. Strategies for vegetative propagation and viral cleaning of a miniature ornamental pineapple hybrid. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 43(1):e53097.

da Silva, S. T., Coelho, A. D., de Assis, R. M. A., de Carvalho, A. A., Bertolucci, S. K. V., and Pinto, J. E. B. P. 2022. Influence of light quality and some growth regulators in inducing the production of Podophyllotoxin, a bioactive compound against cancer, in adventitious roots formed in the leaves of *Hyptis suaveolens*.

Industrial Crops and Products 188:115710.

Silva, T. D., Batista, D. S., Fortini, E. A., Castro, K. M. de, Felipe, S. H. S., Fernandes, A. M., Sousa, R. M. de J., Chagas, K., Silva, J. V. S. da, Correia, L. N. de F., Farias, L. M., Leite, J. P. V., Rocha, D. I., and Otoni, W. C. 2020. Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of in vitro *Pfaffia glomerata* accessions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 203:111761.

Spiker, M. L., Welling, J., Hertenstein, D., Mishra, S., Mishra, K., Hurley, K. M., Neff, R. A., Fanzo, J., and Lee, B. Y. 2023. When increasing vegetable production may worsen food availability gaps: A simulation model in India. *Food Policy* 116:102416.

Suroowan, S., Llorent-Martínez, E. J., Fakurazi, S., Zengin, G., Khalid, A., Ahmed, I. E., Makeen, H. A., Alhazmi, H. A., Albratty, M., Mohan, S., Najmi, A., Van, B., Abdallah, H. H., and Mahomoodally, M. F. 2023. Unveiling the phytochemical and pharmacological potential of *Mimusops maxima* (Poiret) Vaughan-an endemic plant with potential therapeutic effects. *Process Biochemistry* 132:157–165.

TİLKAT, E. A., HOŞGÖREN, H., KAPLAN, A., and TİLKAT, E. 2020. Influence of in vitro Micropropagation Growth Conditions on Stomatal and Morphological Characteristics of Mature *Pistacia vera* L. *Journal of the Institute of Science and Technology* 10(2):799–807.

Torres, A. C., Caldas, L. S., and Buso, J. A. 1998. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*.

Ugbogu, E. A., Emmanuel, O., Dike, E. D., Agi, G. O., Ugbogu, O. C., Ibe, C., and Iweala, E. J. 2021. The Phytochemistry, Ethnobotanical, and Pharmacological Potentials of the Medicinal Plant-*Vernonia amygdalina* L. (bitter Leaf). *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology* 1(1):100006.

Uma, S., Karthic, R., Kalpana, S., and Backiyarani, S. 2023. A comparative assessment of photosynthetic pigments and defense enzymes in ex vitro and in vitro propagated plants of banana (*Musa* spp.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 51:102799.

Velazco, S. J. E., Villalobos, F., Galvão, F., and De Marco Júnior, P. 2023. Transboundary conservation opportunities for Cerrado's plant species. *Biological Conservation* 284:110194.

Wang, S., Liu, X., Liu, X., Xue, J., Ren, X., Zhai, Y., and Zhang, X. 2022a. The red/blue light ratios from light-emitting diodes affect growth and flower quality of *Hippeastrum hybridum* ‘Red Lion.’ *Frontiers in Plant Science* 13:1048770.

Wang, S., Meng, X., Tang, Z., Wu, Y., Xiao, X., Zhang, G., Hu, L., Liu, Z., Lyu, J., and Yu, J. 2022b. Red and Blue LED Light Supplementation in the Morning Pre-activates the Photosynthetic System of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Leaves and Promotes Plant Growth. *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 897 12(4):897.

Xavier, M. A. and Claros, M. 2021. Propagação Vegetativa e conservação in vitro de *Astronium fraxinifolium* Schott.

Zein El Din, A. F. M., Ibrahim, M. F. M., Farag, R., Abd El-Gawad, H. G., El-Banhawy, A., Alaraidh, I. A., Rashad, Y. M., Lashin, I., Abou El-Yazied, A., Elkesh, A., and Abd Elbar, O. H. 2020. Influence of polyethylene glycol on leaf anatomy, stomatal behavior, water loss, and some physiological traits of date palm plantlets grown in vitro and ex vitro. *Plants* 9(11):1–18.

Zhou, Z., Struik, P. C., Gu, J., van der Putten, P. E. L., Wang, Z., Yin, X., and Yang, J. 2023. Enhancing leaf photosynthesis from altered chlorophyll content requires optimal partitioning of nitrogen. *Crop and Environment* 2(1):24–36