

ANYELA MARCELA RIOS RIOS

CULTIVO *in vitro* DE *Ruta graveolens* (RUTACEAE): EFEITO DE TROCAS GASOSAS, DE IRRADIÂNCIAS E DE FITORREGULADORES NA MORFOANATOMIA E NO METABOLISMO SECUNDÁRIO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R586r
2014

Rios Rios, Anyela Marcela, 1985-

Cultivo in vitro de *Ruta graveolens* (Rutaceae) : efeito de trocas gasosas, de irradiâncias e de fitorreguladores na morfoanatomia e no metabolismo secundário / Anyela Marcela Rios Rios. – Viçosa, MG, 2014.

xii, 131f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sergio Antonio Fernandes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. *Ruta graveolens*. 3. Cultura *in vitro*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em Agroquímica.
II. Título.

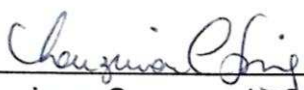
CDD 22. ed. 633.88

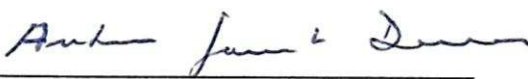
ANYELA MARCELA RIOS RIOS

CULTIVO *in vitro* DE *Ruta graveolens* (RUTACEAE): EFEITO DE TROCAS GASOSAS, DE IRRADIÂNCIAS E DE FITORREGULADORES NA MORFOANATOMIA E NO METABOLISMO SECUNDÁRIO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de fevereiro de 2014.


Luzimar Campos da Silva


Antônio Jacinto Demuner


Wagner Campos Ottoni
(Coorientador)


Sergio Antônio Fernandes
(Orientador)

*A minha mãe e a minha avó,
Luz Nelly e Amanda,
Os maiores exemplos de amor, sabedoria, força e coragem.*

*As minhas irmãs,
Leidy e Lorena.*

*Aos meus professores,
Oscar Marino Mosquera
Jaime Niño Osorio
Que me ensinaram que a pesquisa é um mundo cheio de surpresas e que todo
se pode conseguir com dedicação e esforço.*

*Aos meus conselheiros e amigos,
Sergio Fernandes
Wagner Campos Otoni*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela realização do curso e deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Cláudio Ferreira Lima pela amizade e a oportunidade de fazer o curso de mestrado em Agroquímica.

Aos professores Sergio Antônio Fernandes e Wagner Campos Otoni, pelo profissionalismo, amizade, apoio, conselhos, paciência e confiança depositada em mim.

A todos os professores dos programas de Pós-graduação em Agroquímica, Fisiologia Vegetal e Botânica (UFV) pelos valiosos ensinamentos, especialmente à professora Aristéa Alves Azevedo pelas recomendações feitas durante minha pesquisa.

À Dra. Ana Cláudia, pelo auxílio e o treinamento nas análises de Anatomia Vegetal e ao Doutorando Diego, pela ajuda, os conselhos e o apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao pessoal do Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal, pelo suporte nas análises de microscopia de luz e testes histoquímicos, especialmente a Luana pelo apoio.

Ao Eduardo Rezende Pereira pelas análises cromatográficas.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, pelo suporte nas análises de microscopia de varredura.

Aos professores: Dra. Luzimar Campos Da Silva e Dr. Antônio Jacinto Demuner, por ter aceitado o convite para participar da minha banca.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), Diego, Marcos, Ana, Maria, Leidy, Dona Elcy, Elyabe, Lorena, Lili, Cris, João, Márcia, Ricardo, Gizelly, Andréa, Perácio, Itainá, Evelyn, Jéssica, Débora, Mariana, Jaíza, Brener, Luciana, Camila, Maíra, Samuel, e a todos os colegas que

conheci no LCT, que mais que um grupo de pesquisa é minha grande família brasileira, pela amizade, carinho, ajuda, apoio, conselhos e pelas tardes alegres com um copo de café.

Aos meus colegas do Laboratório de Química Supramolecular e Biomimética (GQSB), pela amizade, ajuda e conselhos, especialmente a Natalia e o Tiago pelo apoio.

À Johanna, por ser minha família, minha irmã e amiga. E a Flavia pelo apoio e a amizade.

Ao meu namorado Manuel, pelo apoio, ajuda nos meus experimentos, conselhos e por lembrar-me que sempre há alguém disposto a escutar e que o Brasil tinha mais uma surpresa para mim.

Aos meus professores, amigos, conselheiros e exemplos de vida, Oscar Mosquera e Jaime Niño, porque sem eles eu não estaria concluindo esta etapa da minha vida.

À minha mãe e as minhas irmãs pelo apoio, o amor e por sempre estarem perto.

A Deus pelas oportunidades dadas.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho e a realização do meu Mestrado.

BIOAGRAFIA

Anyela Marcela Rios Rios, filha de Luz Nelly Rios Valencia e José Marino Rios Nieto, nasceu em Pereira, Risaralda - Colômbia, em 12 de março de 1985. Ingressou na Universidade Tecnológica de Pereira em Junho de 2004, onde concluiu o curso de Química Industrial em setembro do 2010.

Durante os anos 2010 - 2012, trabalhou como assistente de pesquisa no Laboratório de Biotecnología - Productos Naturales (GB-PN) da Universidade Tecnológica de Pereira, desenvolvendo pesquisas nas áreas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* e produtos naturais.

No primeiro semestre de 2012, iniciou o mestrado em Agroquímica, no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na linha de pesquisa de produtos naturais. Concluindo o curso com a defesa da dissertação no dia 17 de fevereiro de 2014 sob a orientação do Dr. Sérgio Antônio Fernandes e a coorientação do Dr. Wagner Campos Otoni.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPÍTULO 1	
INFLUÊNCIA DE AUXINAS E CITOCININAS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM <i>RUTA GRAVEOLENS</i> L.....	13
RESUMO	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1 MATERIAL VEGETAL E ESTABELECIMENTO DE VITROPLANTAS	17
2.2 INDUÇÃO DE CALOGÊNESE E ORGANOGÊNESE	17
2.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA	18
2.3.1 Obtenção dos extratos.....	18
2.3.2 Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	19
2.3.3 Perfil cromatográfico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	20
2.4 AVALIAÇÕES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	21
3. RESULTADOS	22
3.1 INDUÇÃO DE CALOGÊNESE E ORGANOGÊNESE	22
3.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA	27
3.1.1 Obtenção dos extratos.....	27
3.1.2 Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	28
3.1.3 Perfil cromatográfico dos extratos (por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE))	30
3.1.3.1 Perfil cromatográfico de alcaloides	30
3.1.3.2 Perfil cromatográfico de cumarinas.....	32
4. DISCUSSÃO	34
4.1 DIFERENTES COMBINAÇÕES E CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D, ANA, KIN E M-TP ESTIMULARAM A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>R. GRAVEOLENS</i> , SENDO A M-TP MAIS EFEITIVA QUE A KIN.	34
4.2 A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM BROTO E CALOS DE <i>R. GRAVEOLENS</i> É AFETADA PELA PRESENÇA DE FITORREGULADORES NO MEIO DE CULTURA E PELA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE LUZ.	35
5. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 2	

INDUÇÃO DE BROTO E BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>RUTA GRAVEOLENS</i> IN VITRO SOB CONDIÇÕES FOTOMIXOTRÓFICAS E FOTOAUTOTRÓFICAS	46
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTURA	50
2.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA	52
2.2.1 <i>Obtenção dos extratos</i>	52
2.2.2 <i>Prospecção fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	52
2.2.3 <i>Perfil cromatográfico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	54
2.3 AVALIAÇÕES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
3. RESULTADOS	57
3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTURA	57
3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA	59
3.2.1 <i>Obtenção dos extratos</i>	59
3.2.2 <i>Perfil cromatográfico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	59
3.2.3 <i>Perfil cromatográfico dos extratos (por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE))</i>	60
3.2.3.1 Perfil cromatográfico de alcaloides	60
3.2.3.2 Perfil cromatográfico de cumarinas.....	61
4. DISCUSSÃO	63
4.1 A PRODUÇÃO DE BIOMASSA A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>R. GRAVEOLENS</i> FOI ESTIMULADA SOB CONDIÇÕES FOTOHETEROTRÓFICAS E FOTOMIXOTRÓFICAS.....	63
4.2 AS DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO AVALIADAS INFLUENCIARAM NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	67
5. CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO 3	
EFEITO DE NÍVEIS DE TROCAS GASOSAS E DA LUZ SOBRE A GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO, MORFOLOGIA E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE PLÂNTULAS IN VITRO DE <i>RUTA GRAVEOLENS</i>.....	76
1. INTRODUÇÃO	78
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1 ESTABELECIMENTO DA GERMINAÇÃO DE PLÂNTULAS DE <i>RUTA GRAVEOLENS</i> ..	80
2.1.1 <i>Desinfestação das sementes</i>	80
2.1.2 <i>Efeito dos níveis de trocas gasosas</i>	80
2.1.3 <i>Efeito da irradiância</i>	81
2.1.4 <i>Efeito dos níveis de trocas gasosas x efeito da irradiância</i>	81
2.2 ANÁLISES DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO.....	82
2.2.1 <i>Pigmentos fotossintéticos</i>	82

2.2.2	<i>Índice estomático</i>	83
2.2.3	<i>Aclimatização das plântulas</i>	83
2.3	ANÁLISE ANATÔMICA	83
2.3.1	<i>Análise anatômica da folha por MEV</i>	84
2.3.2	<i>Análise estrutural e histoquímica</i>	84
2.4	ANÁLISE FITOQUÍMICA	85
2.4.1	<i>Obtenção dos extratos</i>	85
2.4.2	<i>Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)</i>	86
2.4.3	<i>Perfil cromatográfico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	87
2.5	. AVALIAÇÕES E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	88
3.	RESULTADOS	89
3.1	EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO AVALIADAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE <i>RUTA GRAVEOLENS</i>	89
3.1.1	<i>Efeito dos níveis de trocas gasosas</i>	89
3.1.2	<i>Efeito da irradiância</i>	90
3.1.3	<i>Efeito dos níveis de trocas gasosas x efeito da irradiância</i>	92
3.2	VARIAÇÕES ANATÔMICAS NA FOLHA INFLUENCIADAS PELO NÍVEL DE TROCAS GASOSAS E A IRRADIÂNCIA	93
3.3	EFEITO DO NÍVEL DE TROCAS GASOSAS E DA IRRADIÂNCIA SOBRE A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS NAS PLÂNTULAS.	97
3.3.1	<i>Testes histoquímicos por microscopia de luz</i>	97
3.3.2	<i>Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)</i>	102
3.3.3	<i>Perfil cromatográfico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	104
4.	DISCUSSÃO	111
4.1	NÍVEIS DE TROCAS GASOSAS ALTERAM O DESENVOLVIMENTO E A MORFOLOGIA DE PLÂNTULAS <i>IN VITRO</i> DE <i>RUTA GRAVEOLENS</i>	111
4.2	IRRADIÂNCIA E O TIPO DE LÂMPADA UTILIZADA AFETAM DIFERENTES PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLÂNTULAS <i>IN VITRO</i> DE <i>RUTA GRAVEOLENS</i>	113
4.3	CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS DAS FOLHAS DE PLÂNTULAS <i>IN VITRO</i> DE <i>RUTA GRAVEOLENS</i> FORAM SIMILARES ÀS DAS FOLHAS DE PLANTAS <i>EX VITRO</i>	114
4.4	CARACTERÍSTICAS HISTOQUÍMICAS DE PLÂNTULAS <i>IN VITRO</i> DE <i>R. GRAVEOLENS</i> VARIAM DEPENDENDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DIFERINDO NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS QUANDO COMPARADAS COM PLANTAS <i>EX VITRO</i>	115
4.5	NÍVEIS DE TROCAS GASOSAS APRESENTAM MAIOR EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS <i>IN VITRO</i> DE <i>R. GRAVEOLENS</i> QUE A IRRADIÂNCIA E O TIPO DE LÂMPADA UTILIZADA	116
4.6	NÍVEIS DE TROCAS GASOSAS E A IRRADIÂNCIA ESTIMULAM A PRODUÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLÂNTULAS <i>IN VITRO</i> DE <i>R. GRAVEOLENS</i>	118
5.	CONCLUSÕES	122
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
	CONCLUSÕES GERAIS	130

RESUMO

RIOS RIOS, Anyela Marcela, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Cultivo *in vitro* de *Ruta graveolens* (Rutaceae): efeito de trocas gasosas, de irradiâncias e de fitorreguladores na morfoanatomia e no metabolismo secundário.** Orientador: Sergio Antônio Fernandes. Coorientador: Wagner Campos Otoni.

A crescente demanda por plantas medicinais, como *Ruta graveolens* L. (Rutaceae), para o isolamento e síntese de compostos de interesse farmacológico levou à superexploração de determinadas culturas, podendo levá-las à extinção e exigindo novas metodologias, como a cultura *in vitro*, para conservar seu germoplasma e induzir simultaneamente a produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico e agroindustrial. No presente estudo avaliou-se o efeito na produção de biomassa e na síntese de metabólitos secundários, como alcaloides e cumarinas em tecidos *in vitro* de *Ruta graveolens*, de fitorreguladores como o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), *meta*-topolina (*m*-TP) e cinetina (Kin); e de condições fotoheterotróficas, fotoautotróficas e fotomixotróficas, com ventilação forçada e atmosfera enriquecida com CO₂. Estabeleceu-se o efeito de diferentes níveis de trocas gasosas e da irradiância na germinação de sementes, no desenvolvimento, na morfologia e na biossíntese de metabólitos de plântulas de *R. graveolens*. Diferentes tipos de explantes de *R. graveolens* induziram alta quantidade de biomassa quando cultivados em meio MS suplementado com ANA, 2,4-D e *m*-TP. As condições fotoheterotróficas favoreceram a formação de brotos, enquanto que as fotomixotróficas estimularam seu alongamento e a diminuição da hiperidricidade. Tanto a variação dos níveis de trocas gasosas, como da irradiância acarretaram diferenças no desenvolvimento das plântulas, no conteúdo de pigmentos fotossintéticos e mudanças morfológicas nas plantas, principalmente na distribuição das células do mesofilo e na epiderme das folhas. Em todos os tecidos cultivados *in vitro* foram detectados alcaloides, cumarinas, compostos antracênicos, terpenóides, saponinas e flavonoides. Neste trabalho são

reportados pela primeira vez para *R. graveolens*: o efeito da *m*-TP na indução de calos e brotos; o crescimento de brotos sob condições fotomixotróficas e fotoautotróficas com ventilação forçada e atmosfera enriquecida com CO₂; a influencia dos níveis de trocas gasosas e de luminosidade na morfofisiologia de plântulas *in vitro* de *R. graveolens*. Contribuindo ao conhecimento sobre o efeito destas variáveis na micropropagação e na produção *in vitro* de metabólitos secundários de interesse em esta planta medicinal.

ABSTRACT

RIOS RIOS, Anyela Marcela, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. ***In vitro* culture of *Ruta graveolens* (Rutaceae): effect of gas exchange, irradiances and growth regulators in morphoanatomy and secondary metabolism.** Adviser: Sergio Antônio Fernandes. Co-Adviser: Wagner Campos Otoni.

The increasing demand for medicinal plants such as *Ruta graveolens* L. (Rutaceae), for the isolation and synthesis of compounds of pharmacological interest led to overexploitation of certain crops, which can lead them to extinction, requiring new methodologies, such as *in vitro* culture to conserve their germplasm and simultaneously induce the production of secondary metabolites of pharmacological and agribusiness interest. In the present study was evaluated the effect on biomass production and the synthesis of secondary metabolites, such as alkaloids and coumarins, in *in vitro* culture of *Ruta graveolens*, of growth regulators such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), naphthalene acetic acid (ANA), *meta*-topolina (*m*-TP) and kinetin (Kin); and photoheterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic conditions with forced ventilation and CO₂-enriched atmosphere. Established the effect of different levels of gas exchange and irradiance on seed germination, development, morphology and biosynthesis of metabolites of seedlings of *R. graveolens*. Different types of explants of *R. graveolens* induced high amounts of biomass when grown on MS medium supplemented with NAA, 2,4-D and *m*-TP. The photoheterotrophic conditions favored the formation of buds, while photomixotrophic stimulated elongation and decreased vitrification. Variations in the levels of gas exchange, as the irradiance led to differences in seedling development in photosynthetic pigments contents and morphological changes in plants, especially in the distribution of cells in the epidermis and mesophyll of leaves. In all *R. graveolens* tissues cultured, alkaloids, coumarins, antracenic compounds, terpenoids, saponins and flavonoids were detected. This paper first reported for *R. graveolens*: effect of *m*-TP on callus induction and shoots; growth of shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions with

forced ventilation and CO₂-enriched atmosphere; influences the levels of gas exchange and light in morphophysiology seedling *in vitro* of *R. graveolens*. Contributing to knowledge about the effect of these variables in micropropagation and *in vitro* production of secondary metabolites of interest in this medicinal plant.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas utilizam a maior parte do carbono, nitrogênio e nutrientes assimilados para produzir metabólitos primários necessários para seu crescimento e desenvolvimento, que participam em processos fotossintéticos e respiratórios, na assimilação de nutrientes e no transporte de solutos. Dentre estes compostos se encontram os carboidratos, polissacarídeos (celulose e amido), polifenóis, lignina, ácidos graxos, lipídeos, proteínas, enzimas, componentes estruturais da membrana celular e nucleotídeos (DNA e RNA) (Briemann et al. 2006; Mazid et al. 2011).

No entanto, as plantas sintetizam também compostos que não estão diretamente relacionados a seu crescimento e desenvolvimento, mas nas interações alelopáticas com outras plantas ou organismos benéficos e em mecanismos de defesa frente a estresses bióticos (ataque de herbívoros e/ou patógenos) e abióticos (radiação UV-B, disponibilidade hídrica, poluição atmosférica e deficiência de nutrientes do solo). Esses compostos constituem o metabolismo secundário das plantas, são sintetizados em menores quantidades e sua biossíntese é restrita a determinado gênero, família ou espécie vegetal comparados com os metabólitos primários (Paré e Tumlinson, 1999; Bourgaud et al. 2001; da Silva et al. 2007; Elizalde et al. 2009; Mazid et al. 2011; Bos e Hogenhout, 2011; Whitney e Federle, 2012).

Entre os metabólitos secundários encontram-se tetrapirróis (clorofilas localizadas nos cloroplastos de tecidos fotossintéticos), fenóis (flavonoides, taninos e quinonas); fenilpropanoides (cumarinas), terpenos, aminas e alcaloides (Briemann et al. 2006). Sua produção, às vezes, é à custa do crescimento e reprodução das plantas (Siemens et al. 2003; Bos e Hogenhout, 2011; Mazid et al. 2011).

Os locais de síntese e de armazenamento dos metabólitos não são os mesmos e dependem do tipo de composto e da espécie vegetal. Assim, compostos hidrofílicos são armazenados nos vacúolos, enquanto os lipofílicos são depositados na cutícula, em ductos resiníferos, laticíferos, células oleíferas,

glândulas ou em tricomas especializados na superfície das folhas (Ribera e Zuñiga, 2012).

Os metabólitos secundários mais estudados são terpenos, esteróides, cumarinas, taninos, flavonoides, furanocumarinas, glicosídeos cianogênicos e alcaloides, devido às suas diversas funções e atividades biológicas nas plantas, as quais são vistas como fontes de fármacos e alternativas naturais para o controle de pragas e microrganismos (Mazid et al. 2011).

As cumarinas, por exemplo, atuam como agentes antimicrobianos, como inibidores da germinação de outras plantas e algumas possuem fitotoxicidade frente à insetos, funcionando no mecanismo de defesa contra herbívoros nas plantas que as produzem (Mazid et al. 2011; Ávalos e Pérez-Urria, 2009; Briemann et al. 2006). Enquanto que os flavonoides (flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, antocianidinas, flavononas, isoflavonas, flavan-3,4-dióis, chalconas, dihidrochalconas e auronas) interferem na defesa e na pigmentação da planta (Marais et al. 2006; Goyal et al. 2012).

No entanto, a biossíntese dos compostos é afetada pela variação genética em plantas, pelas mudanças ambientais, pelos nutrientes do solo e pela invasão de patógenos ou herbívoros. Além disso, por vezes, sua síntese química é difícil ou economicamente inviável devido à alta complexidade das suas estruturas e aos requerimentos estereoquímicos. Em consequência, vários dos metabólitos de interesse comercial são isolados de diversas espécies vegetais, sendo necessárias toneladas de material vegetal e, por conseguinte, extensas áreas de culturas, o que levou à superexploração de determinadas culturas de plantas medicinais (Bogenschutz-Godwin et al. 2006; Namdeo 2007; Wang e Wu 2010).

Entre as plantas medicinais mais estudadas encontra-se *Ruta graveolens* L. (Rutaceae), mais conhecida como arruda, nativa do sul da Europa e distribuída no norte da África, Ásia (incluindo China, Índia e Japão), regiões do Mediterrâneo e zonas temperadas em todo o mundo. É usada na medicina tradicional para o tratamento de doenças gastrointestinais e ópticas, dores severas, reumatismo, rigidez do pescoço, tontura, dor de cabeça e artrite

(EMEA 1999; Muñoz et al. 2007; Nazish et al. 2009; Ratheesh et al. 2010; Al-Qurainy et al. 2011; Khan et al. 2011) .

R. graveolens apresenta diversas atividades biológicas como: i) inseticida contra *Anopheles albimanus*, *Culex quinquefasciatus*, *Diabrotica speciosa*, *Bemisia tabaci* e *Tuta absoluta* (Cárdenas et al. 2010; Barbosa et al. 2009; Barbosa et al. 2011); ii) fungicida contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fragariae*, *Saprolegnia* spp., *Botrytis cinerea*, e *F. oxysporum* (Celoto et al. 2008; Hashemi Karourei et al. 2012; Oliva et al. 2003); iii) acaricida contra *Varroa destructor* (Castagnino e Orsi, 2012); iv) antibacteriana contra o sorovar *S. lexington* de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (de Bona et al. 2013; Rojas et al. 2011) e v) antioxidante (Diwan et al. 2012).

R. graveolens possui atividade anticonvulsiva (Ahmad e Amabeoku, 2013); analgésica (Nauman et al. 2012); antiagregante plaquetária (Wu et al. 2003); antiartrítica e anti-inflamatória (Ratheesh et al. 2007; Ratheesh et al. 2010); anti-oxidante (Diwan et al. 2012); inibitória da enzima tirosinase, que é responsável pela pigmentação da pele (Muñoz et al. 2007); anticancerígena (Fadlalla et al. 2011) e anticonceptiva (Halvaei et al. 2012; Nasirinezhad et al. 2009). Melhora o perfil lipídico pela absorção de colesterol e diminui seu estresse oxidativo, pela presença de flavonoides como rutina e quercetina (Figuerola et al. 2009; Ahmed et al. 2010).

De extratos obtidos das partes aéreas de *R. graveolens* foram isolados esteróis, esteróides, alcaloides (rutalinio, rutalidina, rutacridona, rubalinidina), aminas, fenóis, taninos, flavonoides (rutina e hesperidina), proteínas, aminoácidos, carboidratos, resinas, lipídeos, mucilagem, metilcetonas, glicosídeos e cumarinas (chalepeusina e graveliferona) (Nazish et al. 2009; de Bona et al. 2013). Outros compostos isolados de *R. graveolens* foram 1-hidroxi-*N*-metilacridona, epóxido de rutacridona, kokusaginina, bergapteno, xantotoxina, rutamarina, escopoletina; graveolina; β -sitosterol e safrol (Figura 1) (Wu et al. 2003). As substâncias majoritárias que se destacam são os alcaloides, cumarinas, flavonoides e óleos essenciais (Hamad, 2012).

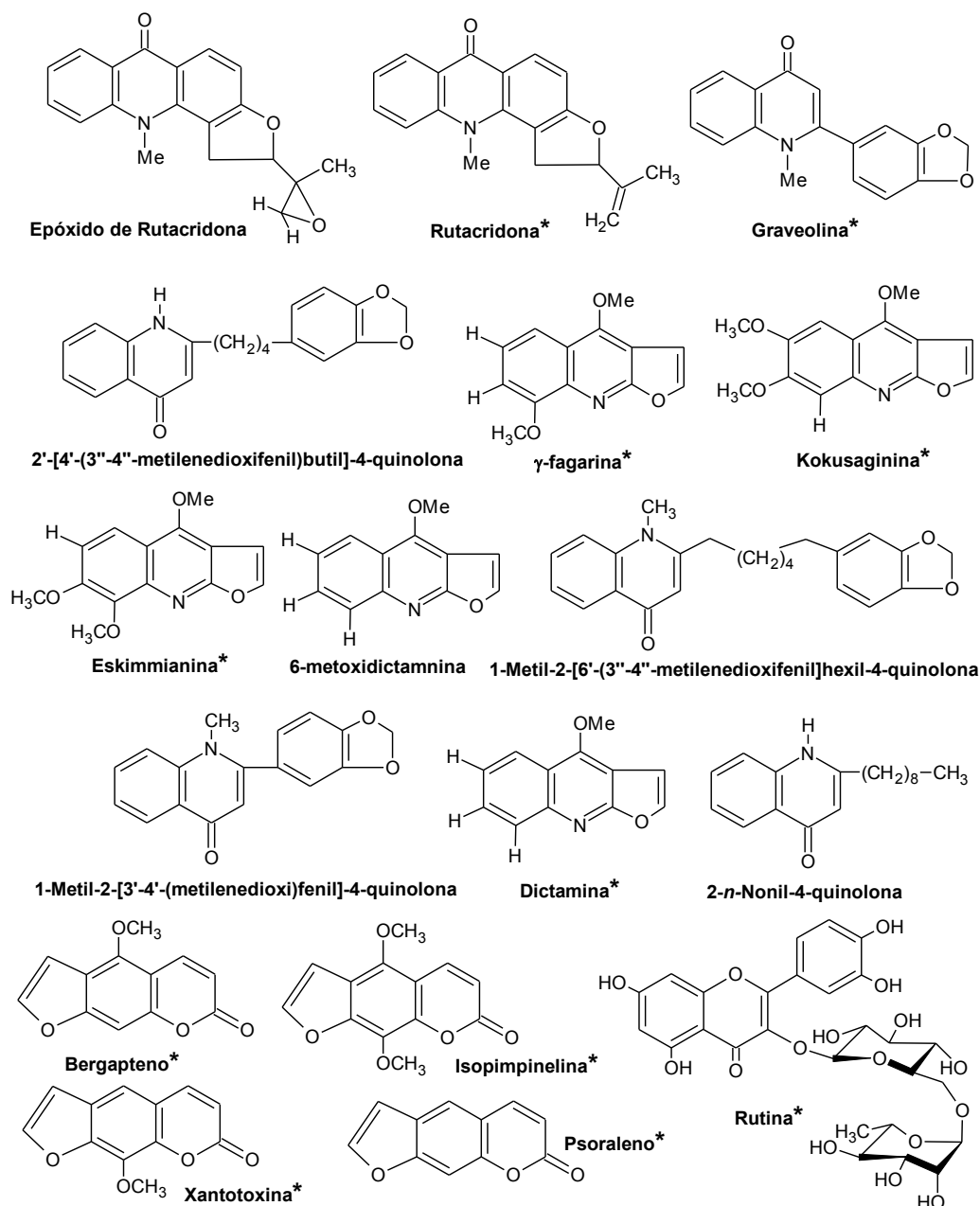


Figura 1. Alcaloides, cumarinas e flavonoides isolados de *Ruta graveolens*.* Compostos de interesse comercial (Kostova et al. 1999; Oliva et al. 2003; Wu et al. 2003; Hamad, 2012).

R. graveolens apresenta diversos tipos de alcaloides, principalmente os do tipo quinolina, quinolinona (como graveolina), furoquinolina (dictamnina, γ-fagarina, eskimmianina), piranoquinolina (rutalinium) e acridona (furacridona) (EMA, 1999; Khan et al. 2011). Alguns dos alcaloides mais reportados se encontram kokusagenina, 1-metil-2-nonil-4(1*H*)-quinolona, 1-metil-2-decil-4(1*H*)-quinolona, 2-*n*-nonil-4-quinolona, eskimmianina, graveolina, 1-metil-2-[6'-(3'',4''-metilenedioxifenil)hexil]-4-quinolona e 2-[4'-(3'',4''-

metilenedioxifenil)butil]-4-quinolona (Figura 1) (Kostova et al. 1999; Oliva et al. 2003).

Entre os componentes principais dos óleos essenciais de *R. graveolens* encontram-se undecan-2-ona, nonan-2-ona, undecan-2-ol e nonan-2-ol; terpenóides como limoneno, α -pineno, linalol e 1,8-cineol; sesquiterpenos, furanocumarinas, ostol, halepensina, rutacultina, pregeijereno, geijereno, ácido hexanóico, ácido octanoico e xantotoxina (Figura 2) (de Feo et al. 2002; Kuzovkina et al. 2009).

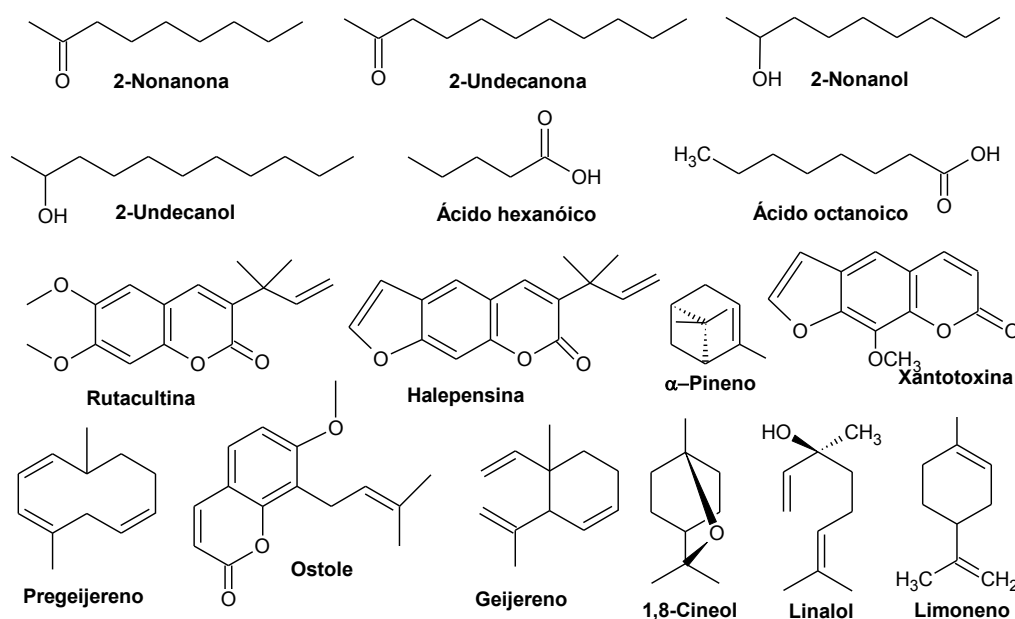


Figura 2. Componentes principais do óleo essencial de *Ruta graveolens* (de Feo et al. 2002; Kuzovkina et al. 2009).

Vários pesquisadores tem demonstrado que os metabólitos secundários são sintetizados tanto por órgãos especializados, como por calos e suspensões celulares cultivados *in vitro* (Nalawade e Tsay 2004; Engelmann 2011). Em suspensões celulares de *R. graveolens*, por exemplo, foi demonstrado que as enzimas antranilato sintase (ASE) e clorismato mutase (CM) competem pelo clorismato para iniciar a rota biossintética de epóxidos acridônicos, furoquinolinas e furanocumarinas (Figura 3) (Bohlmann e Eilert, 1994). Além disso, a ASE faz parte das policetidas sintases, envolvidas na biossíntese de vários metabólitos secundários de plantas como alcaloides, flavonoides, estilbenos, stirilpironas, benzofenonas e benzalacetona (Lukačín et al. 1999).

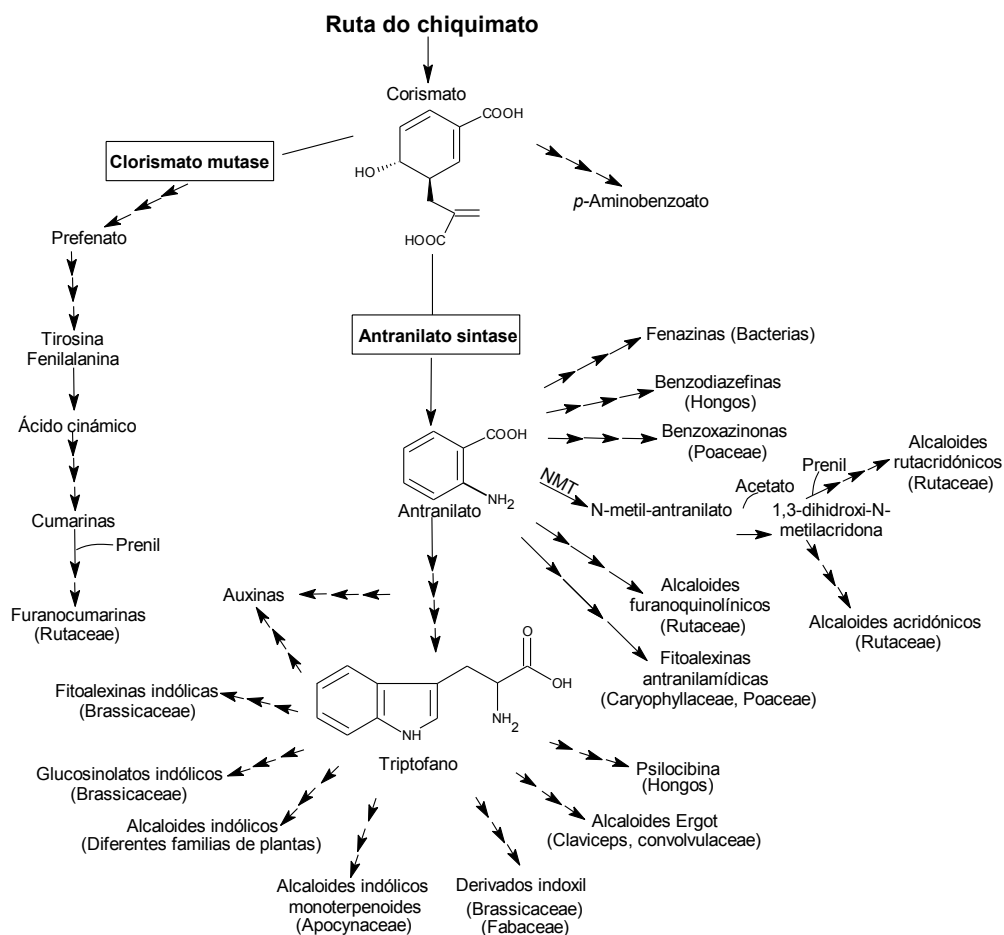


Figura 3. Principais rotas metabólicas onde interveem o clorismato, a antranilato sintase e a clorismato sintase (Bohlmann and Eilert, 1994; Bohlmann et al. 1995).

A produção biotecnológica em cultivos de tecidos de plantas é uma alternativa atrativa para a obtenção de uma gama de compostos de interesse farmacológico. Muitas estratégias tradicionais têm sido utilizadas para estimular a produção de metabólitos secundários que normalmente são sintetizados em pequenas quantidades, como a otimização dos meios de cultura, a seleção de linhagens de células de alta qualidade e o uso de elicitores bióticos e abióticos em culturas de células em suspensão (Shabani et al. 2009; Kuzovkina et al. 2009; Zhao et al. 2010; Coste et al. 2011; Saldanha et al. 2013).

Devido à utilização de *R. graveolens* na medicina tradicional e à presença de compostos de interesse farmacológico e biocida (Figura 2), tem sido desenvolvidos vários protocolos de cultivo *in vitro* através de calos, brotos, raízes, suspensões celulares e raízes transformadas com *Agrobacterium*

rhizogenes, visando melhorar sua propagação e produção de metabólitos secundários como as furanocumarinas mediante o uso de diferentes tipos de estresses e elicitores (Szopa et al. 2012; Kuzovkina e Vdovitchenko, 2011).

Em *R. graveolens* várias pesquisas relataram os efeitos de diferentes qualidades de luz, extrato de levedura (*Rhodotorula rubra*), espermina, putrescina, fonte de carbono, ventilação e pressão osmótica sobre a composição dos óleos essenciais, concentração de compostos fenólicos, furanocumarinas, epóxidos acridônicos, furoquinolinas e alcaloides (Corduan e Reinhard, 1972; Bohlmann e Eilert, 1994; Junghanns et al. 1998; Diwan e Malpathak, 2008; Sidwa-Gorycka et al. 2009; Mohamed e Ibrahim, 2012; Szopa et al. 2012).

Os metabólitos mais estudados têm sido as furanocumarinas, todavia no caso dos alcaloides ainda são poucas as pesquisas sobre o efeito de diferentes quantidades e qualidades espectrais, de ventilação forçada e de atmosfera enriquecida com CO₂ sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas e de reguladores de crescimento, como a *meta*-topolina, na biossíntese *in vitro*.

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivos:

(i) Identificar o meio de cultura e o tipo de explante ideal para induzir a maior quantidade de biomassa (calos e brotos) de *R. graveolens*, e a máxima produção de alcaloides e cumarinas.

(ii) Estabelecer o efeito da ventilação forçada e da atmosfera enriquecida com 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂ sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas sobre o desenvolvimento de brotos e na biossíntese de alcaloides e cumarinas.

(iii) Determinar o efeito de diferentes níveis de trocas gasosas e da irradiância na germinação de sementes de *Ruta graveolens*, no crescimento das vitroplantas e na biossíntese de diferentes metabólitos primários e secundários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Qurainy F.; Khan S.; Ali M.A.; Al-Hemaid F.M.; Tarroum M.; Ashraf M. 2011. Autentication of *Ruta graveolens* and its adulterant using internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. **Pakistan Journal of Botany** 43: 1613 - 1620.
- Ahmad A.H.; Amabeoku G.J. 2013. Involvement of gamma aminobutyric acid in the anticolvulsant effect of the leaf metanol extract of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) in mice. **International Journal of Pharmacology** 9: 134 - 142.
- Ahmed O.M.; Moneim A.A.; Yazid I.A.; Mahmoud A.M. 2010. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects and the probable mechanisms of action of *Ruta graveolens* infusion and rutin in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetologia Croatica**, 39: 15 - 35.
- Barbosa F.S.; Leite G.L.D.; Martins E.R.; Guanabens R.E.M.; Silva F.W.S. 2009. Métodos de extração e concentrações no efeito inseticida de *Ruta graveolens* L., *Artemisia verlotorum* Lamotte e *Petiveria alliacea* L. a *Diabrotica speciosa* Germar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 11: 221 - 229.
- Barbosa F.S.; Leite G.L.D.; Alves S.M.; Nascimento A.F.; D'Ávila V.de A.; da Costa C.A. 2011. Insecticide effects of *Ruta graveolens*, *Copaifera langsdorffii* and *Chenopodium ambrosioides* against pests and natural enemies in commercial tomato plantation. **Acta Scientiarum. Agronomy** 33: 37 - 43.
- Bogenschutz-Godwin M.J.; Duke J.A.; McKenzie M.; Kaufman P.B. 2006. Plant Conservation. In: Cseke L.J.; Kirakosyan A.; Kaufman P.B.; Warber S.L.; Duke J.A.; Briemann H.L. (Eds). Natural Products from Plants. 2^{da} Ed. Taylor & Francis Group, CRC press, 503 - 533.
- Bohlmann J.; Eilert U. 1994. Elicitor induced secondary metabolism in *Ruta graveolens* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 38: 189 - 198.
- Bos J.I.; Hogenhout S.A. 2012. Effectors in Plant-Insect Interactions. In: Martin F.; Kamoun S (Eds). Effectors in Plant-Microbe Interactions, 1^{ra} Ed, John Wiley & Sons, Inc., 355 - 375.
- Bourgaud F.; Gravot A.; Milesi S.; Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science** 161: 839 - 851.
- Briemann H.L.; Setzer W.N.; Kaufman P.B.; Kirakosyan A.; Cseke L.J. 2006. Phytochemicals: the chemical components of plants. In: Cseke L.J.; Kirakosyan A.; Kaufman P.B.; Warber S.L.; Duke J.A.; Briemann H.L. (Eds). Natural Products from Plants. 2^{da} Ed. Taylor & Francis Group, CRC press, 1 - 49.
- Cárdenas C.E.; Lugo V.L.; Roza B.A. 2010. Efecto tóxico del extracto acuoso de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) sobre larvas de *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820 y *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae), en condiciones experimentales. **Entomotropica** 25: 11 - 18.

Castagnino G.L.B.; Orsi R. de O. 2012. Produtos naturais para o controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 47: 738 - 744.

Celoto M.I.B.; Papa M de F.S.; Do Sacramento L.V.S.; Celoto F.J. 2008. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum: Agronomy** 30: 1 - 5.

Corduan G.; Reinhard E. 1972. Synthesis of volatile oils in tissue cultures of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry** 11: 917 - 922.

Coste A.; Vlase L.; Halmagyi A.; Deliu C.; Coldea G. 2011. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 106: 279 - 288.

Da Silva J.; Crotti A.E.M.; Cunha W.R. 2007. Antifeedant and allelopathic activities of the hydroalcoholic extract obtained from Neem (*Azadirachta indica*) leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17: 529 - 532.

De Bona E.A.M.; Pinto F.G.S.; Borges A.M.C.; Scur M.C.; Fruet T.K.; Weber L.D.; Alves L.F.A.; De Moura A.C. 2013. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente a sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde** 15: 41 - 46.

De Feo V.; De Simone F.; Senatore F. 2002. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry** 61: 573 - 578.

Diwan R.; Malpathak N. 2008. Novel technique for scaling up of micropropagated *Ruta graveolens* shoots using liquid culture systems: A step towards commercialization. **New Biotechnology** 25: 85 - 91.

Diwan R.; Shinde A.; Malpathak N. 2012. Phytochemical composition and antioxidant potential of *Ruta graveolens* L. *in vitro* culture lines. **Journal of Botany**, 6 pag. doi:10.1155/2012/685427.

Elizalde A.; Porrilla Y.P.; Chaparro D.C. 2009. Factores antinutricionales en semillas. **Facultad de Ciencias Agropecuarias** 7: 45 - 54

EMA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 1999. Committee for veterinary medicinal products, *Ruta graveolens*. Summary Report London, 4 p.

Engelmann F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 47: 5 - 16.

Fadlalla K.; Watson A.; Yehualaeshet T.; Turner T.; Samuel T. 2011. *Ruta graveolens* extract induces DNA damage pathways and blocks akt activation to inhibit cancer cell proliferation and survival. **Anticancer Research** 31: 233 - 242.

Figuerola L.; Díaz F.; Camacho A.; López M. 2009. Efectos inducidos por *Ruta graveolens* L., *Cnidocolus chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L. sobre los niveles de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en un modelo de rata diabética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19: 898 - 907.

Goyal S.; Lambert C.; Cluzet S.; Mérillon J.M.; Ramawat K.G. 2012. Secondary Metabolites and Plant Defence. **Progress in Biological Control** 12: 109 - 138.

Halvaei I.; Sadeghipour H.R.; Naghibi Z. 2012. Acute effects of *Ruta graveolens* L. on sperm parameters and DNA integrity in rats. **Journal of Reproduction and Infertility** 13: 33 - 38.

Hamad M.N. 2012. Isolation of rutin from *Ruta graveolens* (Rutaceae) cultivated in Iraq by precipitation and fractional solubilization. **Pharmacie Globale International Journal of Comprehensive** 3: 1 - 3.

Hashemi Karourei S.M.; Sadeghpour Haji M.; Gholampour Azazi I. 2012. Isolation of *Saprolegnia* and the influence of root ethanolic extract of *Ruta graveolens* on *Saprolegnia*. *Spp.* Growth. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics** 2: 64 - 67.

Junghanns K.T.; Kneusel R.E.; Groger D.; Matern U. 1998. Differential regulation and distribution of acridone synthase in *Ruta graveolens*. **Phytochemistry** 49: 403 - 411.

Khan S.; Mirza K.J.; Abidin M.Z. 2011. DNA fingerprinting for the authentication of *Ruta graveolens*. **African Journal of Biotechnology** 10: 8709 - 8715.

Kostova I.; Ivanova A.; Mikhova B.; Klaiber I. 1999. Alkaloids and coumarins from *Ruta graveolens*. **Monatshefte für Chemie** 130: 703 - 707.

Kuzovkina I.N.; Szarka Sz.; Héthelyi É.; Lemberkovics E.; Szöke É. 2009. Composition of essential oil in genetically transformed roots of *Ruta graveolens*. **Russian Journal of Plant Physiology** 56: 846 - 851.

Kuzovkina I.N.; Vdovitchenko M.Y. 2011. Genetically transformed roots as a model system for studying physiological and biochemical processes in intact roots. **Russian Journal of Plant Physiology** 58: 941 - 948.

Marais J.P.J.; Deavours B.; Dixon E.A.; Ferreira D. 2006. The stereochemistry of flavonoids. En: Grotewold E (Eds). **The science of flavonoids**. Springer USA, 273p.

Mazid M.; Khan T.A.; Mohammad F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine** 3: 232 - 249.

Milesi S.; Massot B.; Gontier E.; Bourgaud F.; Guckert A. 2001. *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. **Plant Science** 161: 189 - 199

Meepagala K.M.; Schrader K.K.; Wedge D.E.; Duke S.O. 2005. Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. **Phytochemistry** 66: 2689 - 2695.

Mohamed M.A.H.; Ibrahim T.A. 2012. Enhanced in vitro production of *Ruta graveolens* L. coumarins and rutin by manitol and ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 111: 335 - 343.

Muñoz K.; Londoño J.; Arango G.; Sierra J.; Bravo K. (2007). Efecto de la técnica de extracción de *Ruta graveolens* sobre la actividad antitirosinasa y correlación entre la inhibición enzimática, el contenido de compuestos fenólicos y la citotoxicidad. **VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia**, Medellín, Colombia, 14: 78 - 83.

Nalawade S.M.; Tsay H-S. 2004. *In vitro* propagation of some important chinese medicinal plants and their sustainable usage. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 40: 143 - 154.

Namdeo A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review. **Pharmacognosy Reviews** 1: 69 - 79.

Nasirinezhad F.; Khoshnevis F.M.; Parivar K.; Amin G. 2009. Antifertility effect of aqueous extract of aerial part of *Ruta graveolens* on immature female Balb/C mice. **Physiology and Pharmacology** 13: 279 - 287.

Nauman I.T.; Hamad M.N.; Hussain S.A. 2012. Comparative study of the analgesic activity of two Iraqi medicinal plants, *Ruta graveolens* and *Matricaria chamomilla* extracts . **Journal of Intercultural Ethnopharmacology** 1: 79 - 83.

Nazish I.; Kaskoos R.A.; Mir S.R.; Amin S.; Ali M. 2009. Preliminary pharmacognostical standardisation of *Ruta graveolens* L. aerial parts. **Research Journal of Medicinal Plants** 3: 41 - 44.

Oliva A.; Meepagala K.M.; Wedge D.E.; Harries D.; Hale A.L.; Aliotta G.; Duke S.O. 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L., leaves, including a new quinolone alkaloid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 890 - 896.

Paré P.W.; Tumlinson J.H. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology** 121: 325 - 331.

Ratheesh M.; Helen A. 2007. Anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* Linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats. **African Journal of biotechnology** 6: 1209 - 1211.

Ratheesh M.; Shyni G.L.; Sindhu G.; Helen A. 2010. Protective effects of isolated polyphenolic and alkaloid fractions of *Ruta graveolens* L. on acute and chronic models of inflammation. **Inflammation** 33: 18 - 24.

Ribera A.E.; Zuñiga G. 2012. Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungi control: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 12: 893 - 911

Rojas J.; Mender T.; Rojas L.; Gullien E.; Buitrago A.; Lucena M.; Cardenas N. 2011. Estudio comparativo de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. recolectada en los estados Mérida y Miranda, Venezuela. **Avances en Química** 6: 89 - 93.

Saldanha C.W.; Otoni C.G.; Notini M.M.; Kuki K.N.; da Cruz A.C.F.; Neto A. R.; Dias L.L.C.; Otoni W.C. 2013. A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 49: 433 - 444.

Shabani L.; Ehsanpour A.A.; Asghari G.; Emami J. 2009. Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. **Russian Journal of Plant Physiology** 56: 621 - 626.

Sidwa-Gorycka M.; Krolicka A.; Orlita A.; Malinski E.; Golebiowski M.; Kumirska J.; Chromik A.; Biskup E.; Stepnowski P.; Lojkowska E. 2009. Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root cultures a promising approach for production of coumarins and furanocoumarins. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 97: 59 - 69.

Siemens D.H.; Lischke H.; Maggiulli N.; Schürch S.; Roy B.A. 2003. Cost of resistance and tolerance under competition: the defense-stress benefit hypothesis. **Evolutionary Ecology** 17: 247 - 263.

Szopa A.; Ekiert H.; Szewczyk A.; Fugas E. 2012. Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *Divaricata* (Tenore) Gams. Under different light conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 110: 329 - 336.

Wang J.W.; Wu J.Y. 2010. Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. **Applied microbiology and biotechnology** 88: 437 - 449.

Whitney H.M.; Federle W. 2012. Biomechanics of plant - insect interactions. **Current Opinion in Plant Biology** 16: 1 - 7.

Wu T-S.; Shi L-S.; Wang J-J.; Iou S-C.; Chang H-C.; Chen Y-P.; Kuo Y-H.; Chand Y-L.; Teng C-M. 2003. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. **Journal of the Chinese Chemical Society** 50: 171 - 178.

Zhao J-L.; Zhou L.G.; Wu J-Y. 2010. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology** 87:137 - 144.

CAPÍTULO 1

Influência de auxinas e citocininas na produção de biomassa e de metabólitos secundários em *Ruta graveolens* L.

Resumo - É crescente o interesse na indução da biossíntese de metabólitos secundários bioativos em tecidos vegetais propagados *in vitro* de plantas medicinais como *Ruta graveolens* (Rutaceae), da qual tem sido estabelecidos vários tipos de culturas *in vitro*, incluindo suspensões celulares, calos, brotos, raízes adventícias e em cabeleira, principalmente em meio MS, com diversos reguladores de crescimento. No entanto, ainda são poucos os estudos sobre o efeito das auxinas e citocininas, como no caso da *meta*-topolina (*m*-TP) em combinação com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido naftalenacético (ANA) sobre a produção de metabólitos secundários como os alcaloides. Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito da *m*-TP em tecidos *in vitro* de *R. graveolens* e qual a melhor combinação de auxina e citocinina para a indução de calos ou brotos visando o acúmulo de metabólitos secundários. Foram cultivados segmentos nodais, internodais, folhas e raízes provenientes de vitroplantas de *R. graveolens* em meio MS suplementado com combinações e concentrações de 2,4-D (0,5 e 1 mg L⁻¹), ANA (0,5 e 1 mg L⁻¹), cinetina (Kin) (0,5 e 1 mg L⁻¹) e *m*-TP (0,5 e 1 mg L⁻¹) em fotoperíodo e em escuridão total. De modo geral, os segmentos nodais induziram maior quantidade de biomassa principalmente nos meios que continham ANA + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) e 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) em ausência de luz, 2,4-D + Kin (1 mg L⁻¹) e 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) em fotoperíodo, sendo estimulada a produção de alcaloides, cumarinas, compostos antracênicos, terpenos, saponinas e diferentes tipos de flavonoides. A *m*-TP foi mais efetiva que a Kin na indução de calos e brotos de *R. graveolens*, estimulando a produção de biomassa e de metabólitos secundários. Enquanto que a combinação ótima de auxina e citocinina dependeu das condições de luminosidade utilizadas.

Palavras-chave: calo, brotos, metabolismo secundário, organogênese.

Influence of auxins and cytokinins in biomass and secondary metabolite production in *Ruta graveolens*.

Abstract - There is a growing interest in the *in vitro* biosynthesis of bioactive secondary metabolites in plant tissues *in vitro* propagated medicinal plants as *Ruta graveolens* (Rutaceae), of which several types of cultures *in vitro*, including cell suspensions, callus, shoots, adventitious and hairy roots have been established, mostly on MS on MS medium with different growth regulators. However, there are few studies on the effect of auxins and cytokinins, e.g. *meta*-topolin (*m*-TP) in combination with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or naphthalene acetic acid (NAA), on the production of secondary metabolites such as alkaloids. This study aimed to determine the achievement of *m*-TP in *in vitro* tissues of *R. graveolens* and the best auxin and cytokinin combination to induce callus or shoots aiming at secondary metabolite accumulation. Nodal and internodal segments, leaves and roots from *R. graveolens* vitroplants were cultured on MS medium supplemented with combinations and concentrations of 2,4-D (0.5 and 1 mg L⁻¹), NAA (0.5 and 1 mg L⁻¹), kinetin (KIN) (0.5 and 1 mg L⁻¹) and *m*-TP (0.5 and 1 mg L⁻¹) in photoperiod and total darkness. Overall, *R. graveolens* nodal segments produced a higher amount of biomass mainly on media containing NAA + *m*-TP (0.5 mg L⁻¹) and 2,4-D + *m*-TP (0.5 mg L⁻¹) grown in the dark, 2,4-D + Kin (1 mg L⁻¹) and 2,4-D + *m*-TP (0.5 mg L⁻¹) in photoperiod, stimulated production of alkaloids, coumarins, antracênicos compounds, terpenoids, saponins and different flavonoids. The *m*-TP was more effective than Kin on callus and shoots induction of *R. graveolens*, it stimulated the production of biomass and secondary metabolites. While the optimal combination of auxin and cytokinin dependent on the lighting conditions used.

Key words: callus, shoots, secondary metabolism, organogenesis.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes fitorreguladores de crescimento como as auxinas e citocininas, têm sido utilizados para estimular o alongamento e a divisão celular, a formação de raízes, a indução de calos e brotos e a biossíntese de metabólitos secundários em tecidos *in vitro* de espécies vegetais como *R. graveolens* (Baumert et al. 1992; Diwan et al. 2012), *Hypericum hirsutum* e *H. maculatum* (Coste et al. 2011), *Fagara zanthoxiloides* (Couillerot et al. 1994), *Solanum lyratum* (Kuo et al. 2012), *Aloe arborescens* Mill (Amoo et al. 2012) e *Musa* spp (Aremu et al. 2012a). O efeito sobre o desenvolvimento dos tecidos e a produção de metabólitos secundários varia dependendo da concentração empregada, do tipo de explante cultivado e das condições de cultura (Kuo et al. 2012).

Tem sido demonstrado que o 2,4-D é efetivo para a indução e o crescimento de calos. No entanto, em algumas espécies, seu uso prolongado ou altas concentrações podem induzir variação somaclonal e/ou uma fase de calo prolongada que impede a posterior organogênese (Von Arnold, 2008). Porém, no caso de *R. graveolens* é muito usado para a indução de calos, brotos e a produção de metabólitos secundários como alcaloides e cumarinas (Ramawat et al. 1985; Baumert et al. 1992; Endler et al. 2008; Diwan et al. 2012).

As citocininas estimulam o desenvolvimento de gemas axilares, a divisão celular, a formação e o crescimento de calo, inibem a formação de raízes, o alongamento dos caules e a senescência das folhas e estão envolvidas na diferenciação de cloroplastos e no metabolismo primário e secundário dos tecidos (Werner et al. 2001). A cinetina (Kin) e a 6-benziladenina (BA), estão entre as citocininas mais utilizadas na cultura de tecidos de várias espécies como *R. graveolens* (Faisal et al. 2005; Bohidar et al. 2008; Mohamed e Ibrahim, 2011; Piekoszewska et al. 2010), *Salvia miltiottizha* (Zhao et al. 2010), *Bixa orellana* L (Cruz et al. 2013); *Lilium* (Mei-Lan et al. 2003), *Gevuina avellana* mol (Alvarez et al. 2012) e *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (Wang et al. 2012).

No entanto, na última década, tem sido empregado um novo grupo de citocininas, as topolinas, sendo a que mais se destaca a *meta*-topolina (*m*-TP), que são elicitores potenciais na micropropagação, ao ser mais efetivas que o BA na indução de brotos e raízes, na atividade mitótica e na germinação de sementes de plantas como *Hordeum vulgare* L (Huyluoglu et al. 2008), *Pelargonium x hederacifolium* e *P. x hortorum* (Wojtania, 2010) e *Aloe polyphylla* (Bairu et al. 2007). Estimulam a biossíntese de compostos fenólicos, proantocianidinas, flavonoides, clorofilas *a* e *b* e carotenoides (Aremu et al. 2012a); diminuem as alterações fisiológicas que em geral são induzidas com BA, tais como variações genéticas, hiperidricidade e o crescimento anormal, aumentando a estabilidade histogênica dos tecidos (Bairu et al. 2008; Aremu et al. 2012a; Aremu et al. 2012b).

Contudo, ainda não tem sido avaliado o efeito de topolinas como *m*-TP em combinação ou não com 2,4-D ou ANA na cultura de tecidos de *R. graveolens* e sobre a produção de metabólitos secundários como os alcaloides. Baseado nisso, esse trabalho teve como objetivo avaliar diferentes combinações e concentrações de 2,4-D, ANA, Kin e *m*-TP sobre a produção de biomassa e metabólitos secundários de *R. graveolens* em presença e ausência de luz, e estabelecer qual a melhor combinação de fitorreguladores para a indução de calos, brotos e a biossíntese de alcaloides e cumarinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e estabelecimento de vitroplantas

Sementes de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) (ISLA PAK, Brasil) foram lavadas com detergente comercial durante 5 minutos e deixadas em água corrente por 30 minutos. Posteriormente, as sementes foram transferidas para uma câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, e foram imersas por 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) com 2,0% de cloro ativo (p/p) ((Super Globo[®], Rio de Janeiro, Brasil) acrescida com Tween 20[®] (4 gotas 100 mL⁻¹). Logo após, foram feitas três lavagens com água desionizada estéril, tratadas com álcool etílico (EtOH) 70% por três min e novamente enxaguadas com água. Em seguida as sementes foram então imersas em solução de NaOCl a 25 % (v/v) com Tween 20[®] (4 gotas 100 mL⁻¹) por 10 min, seguido por três enxagues com água desionizada estéril.

Após a desinfestação, as sementes foram transferidas para frascos de vidro de 350 mL de capacidade contendo 60 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para $5.8 \pm 0,01$, vedados com tampa rígida de polipropileno e sendo autoclavados a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min.

A germinação das sementes ocorreu em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, por um período mínimo de 45 dias no fotoperíodo de 16h, com irradiância de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro (LI-COR[®], LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil).

2.2 Indução de calogênese e organogênese

Passados os 45 dias de cultivo, sob condições assépticas, foram excisadas folhas, raízes, segmentos nodais e internodais das plântulas germinadas *in vitro* de *R. graveolens*, obtendo explantes de 5 mm aproximadamente. Posteriormente, cinco de cada tipo de explante foram inoculados em placas de Petri descartáveis estéreis (90 x 15 mm) contendo 25 mL de meio MS estéril enriquecido com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de

mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar, suplementado com diferentes combinações e concentrações (0,5 e 1 mg L⁻¹) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido α -naftalenacético (ANA), cinetina (Kin) (Sigma) e *meta*-topolina (*m*-TP) (PhytoTechnology Laboratories), com o pH ajustado em 5,8 $\pm$ 0,1 e autoclavado a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min.

As placas foram vedadas com três camadas de filme plástico de PVC transparente (Rolopac, Brasil) e as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 $\pm$ 2 °C em escuridão total (24 h) ou sob fotoperíodo com 16/8 h de luz/escuro (irradiância de 30 μ mol m⁻² s⁻¹). Após 40 dias de cultivo, a massa fresca produzida e a porcentagem de calos e brotos formados foram determinadas.

2.3 Análise fitoquímica

2.3.1 Obtenção dos extratos

A massa fresca total foi obtida nos diferentes tratamentos e separada por tipo de explante, sendo imediatamente congelada com nitrogênio líquido e armazenada a -80°C. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas (liofilizador modelo L101 LIOTOP, Liobras, Brasil), pesadas e colocadas em erlenmeyer de 125 mL. Adicionaram-se, então, 15 mL de álcool etílico grau analítico 95 % (v/v) (Vetec) para cada 300 mg de material vegetal; logo após, o conteúdo foi homogeneizado e deixado em agitação constante durante 48 h (mesa agitadora Tecnal[®], TE-1401) a 70 rpm.

Em seguida, a suspensão foi filtrada por gravidade e repetiu-se o procedimento de extração utilizando o resíduo obtido. Os filtrados foram combinados e concentrados em sistema de evaporação rotatória (IKA[®] RV 10 digital, com recirculador Chiller, F-108 e bomba com controlador de vácuo, V700, Suíça) sob pressão reduzida e temperatura de 45 °C. Após a retirada do solvente os extratos foram transferidos para frascos tipo vial de 3 mL de capacidade e armazenados a 8°C.

2.3.2 Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Os extratos etanoicos crus de calos e brotos de *R. graveolens* foram caracterizados fitoquimicamente por CCD segundo a metodologia descrita por Wagner e Bladt (2001) e Farnsworth (1966), determinando a presença ou ausência de alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, saponinas, esteróides e triterpenos e compostos antracênicos (Tabela 1).

Tabela 1. Condições para a prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de *Ruta graveolens* por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (Wagner e Bladt, 2001; Farnsworth, 1966).

Tipo de metabólito	Sistema de eluentes	Revelador	Cor de referência	Compostos padrão (cor)
Alcaloides	AcOEt:AcOH:MeOH:H ₂ O (10:2:1:2)	Dragendorff ¹	Vermelho-laranja ²	Quinina (laranja)
Cumarinas	BuOH: AcOH: H ₂ O (15:2:3)	KOH a 5% em EtOH	Fluorescência verde ou azul ³	Umbelliferona (azul-verde)
Compostos antracênicos	BuOH: AcOH: H ₂ O (15:2:3)	KOH a 5% em EtOH	Vermelho ^{2,3}	Quinona (vermelha)
Flavonoides	BuOH: AcOH: H ₂ O (4:1:5)	AlCl ₃ a 1% em EtOH ³	Amarelo ^{2,3}	Rutina (amarela ² , laranja ⁴)
Esteróides	AcOEt: PhMe: AcOH (8:4:1)	Anisaldeído/ ácido sulfúrico	Verde, vermelho, amarelo e roxo ²	Colesterol (roxo)
triterpenos				Estigmasterol (azul escuro)
				Limoneno (azul-verde claro)
				Lanosterol (roxo-azul)
Saponinas	AcOEt:AcOH:MeOH:H ₂ O (10,35:2,35:1,35:2,35)	Anisaldeído/ ácido sulfúrico	Azul ou roxo-azul, amarelo	<i>Sapindus saponaria</i>

AcOEt: acetato de etila; AcOH: ácido acético; MeOH: metanol; H₂O: água; BuOH: butanol; PhMe: tolueno.

¹ Reagente de Dragendorff: nitrato de bismuto + ácido acético + iodeto de potássio (Wagner e Bladt, 2001). ² Observações no visível ³ Observações sob luz UV λ : 366 nm.

⁴ Observações sob luz UV λ 254 nm (Farnsworth, 1966).

Para esta avaliação foram pesados 1,0 mg da substância padrão e 20 mg do extrato etanólico seco diretamente para tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidade adicionando-se 1,0 e 1,25 mL de metanol grau analítico (VETEC), para obter concentrações finais de 1 e 16 mg mL⁻¹, respetivamente.

Posteriormente, foram retiradas alíquotas de 2,5 μ L da solução padrão e 10 μ L do extrato (exceto no caso dos alcaloides, onde foram colocados 40 μ L

do extrato) com ajuda de um capilar em cromatoplaças de alumínio recobertas com sílica gel 60 GF₂₅₄ com indicador UV (Merck, Alemanha) de 4 x 5 cm, deixando um espaço de 3 mm entre cada ponto de aplicação.

Finalmente, as cromatoplaças foram eluídas em cuba cromatográfica previamente saturada pelo sistema de eluentes específico para cada classe de metabólito secundário, permitindo a separação dos componentes presentes no extrato dependendo de sua polaridade e afinidade com as fases estacionária (cromatoplaça) e móvel (eluente).

2.3.3 Perfil cromatográfico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para o preparo das amostras, foram pesados diretamente em tubos Eppendorf® 20 mg do extrato etanólico e solubilizados em 1,25 mL de metanol grau CLAE, obtendo uma solução a 16 mg mL⁻¹. Para homogeneizar a solução, as amostras foram agitadas, colocadas no banho de ultrassom, e em seguida centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. Posteriormente, foi transferido 0,1 mL do sobrenadante para vials de CLAE e adicionados 1,5 mL de MeOH grau CLAE, obtendo-se uma solução com concentração final de 1 mg mL⁻¹.

A metodologia usada para quantificação de alcaloides por CLAE foi baseada na proposta por Kuzovkina *et al.*, (2004) e Cardoso-Lopes *et al.*, (2010), enquanto que para as cumarinas foram usadas as metodologias reportadas por Massot *et al.*, (2000) e Szopa *et al.*, (2012) com modificações. A análise foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) marca THERMO equipado com um detector UV/visível ACCELA/PDA. A coluna empregada para a separação foi a C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 µm). Tanto para alcaloides como para cumarinas foram injetados 10 µL de cada amostra de 1 mg mL⁻¹ utilizando injetor automático ACCELA.

Para a separação dos alcaloides, foi usada a fase móvel composta de acetonitrila/metanol/água (10:45:45), utilizando-se dois comprimentos de ondas: 245 e 275 nm. Para as cumarinas, foi usada uma mistura de dois sistemas, o primeiro (A) acetonitrila/metanol/água (30:30:40) e o segundo (B)

acetonitrila/metanol (50:50), com proporções de A/B de 50:50; os comprimentos de onda foram 254 e 310 nm. O fluxo foi de 0,6 mL min⁻¹ e o tempo de corrida de 30 minutos, para ambos os casos.

2.4 Avaliações e análises estatísticas

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 17 tratamentos tanto em escuridão total, como em fotoperíodo, com seis repetições cada, consistindo em seis placas de Petri contendo cinco explantes de cada tipo (folha, caule, segmento nodal e internodal).

Após 40 dias de cultura foram determinadas a massa fresca produzida por explante (MF/E: massa fresca total por tipo de explante/número de explantes), a média da massa fresca (mMF) obtida com cada um dos quatro tipo de explantes avaliados e a porcentagem de calo (PC) e brotos (PB) por tipo de explante. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para as variáveis analisadas em porcentagem, a ANOVA foi realizada após transformação dos dados em arco seno $x^{0.5}$. Para a comparação entre as médias dos tratamentos e dos tipos de explante foi realizado o teste de Scott e Knott a 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico Genes versão Windows/2011.9.0 (Cruz, 2013).

A prospecção fitoquímica realizada por CCD foi constituída pelo componente qualitativo, realizando duas repetições para cada teste fitoquímico.

3. RESULTADOS

3.1 Indução de calogênese e organogênese

Após 40 dias de cultura foram evidenciadas diferenças na produção de biomassa em todos os tratamentos. Tanto em fotoperíodo como em escuridão total, os explantes cultivados nos meios que só continham auxinas (2,4-D e ANA) desenvolveram quantidades maiores de calo que os expostos somente às citocininas (Kin e *m*-TP) ou a combinações desses reguladores, os quais responderam tanto à organogênese como à calogênese em proporções variáveis (Figuras 1 e 2).

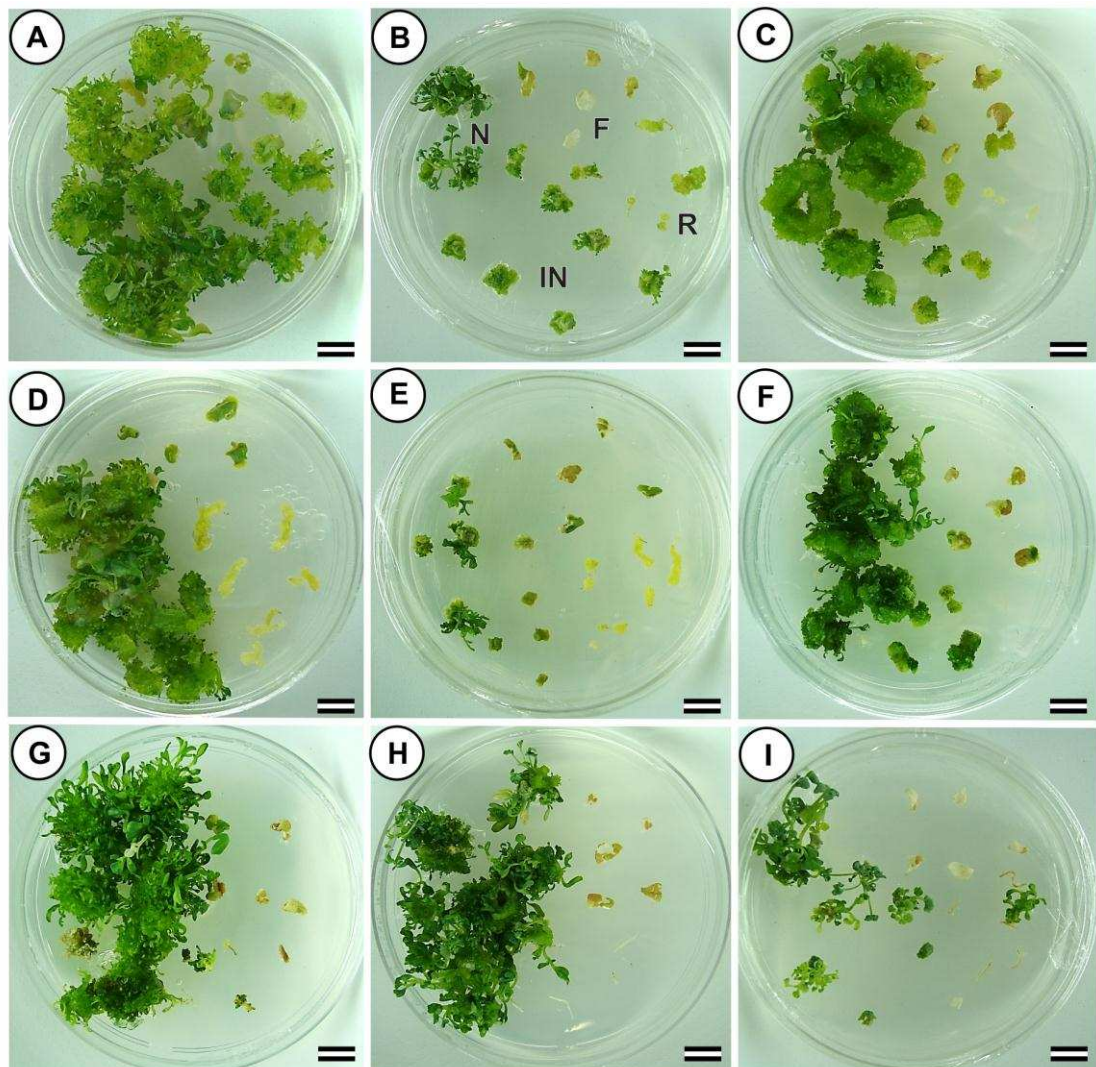


Figura 1. Biomassa produzida a partir de folhas, raízes, segmentos nodais e internodais de *Ruta graveolens* cultivados durante 40 dias sob fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em meio MS suplementado com: **A:** 2,4-D + *m*-TP; **B:** 2,4-D + Kin; **C:** 2,4-D; **D:** ANA + *m*-TP; **E:** ANA + Kin; **F:** ANA; **G:** *m*-

TP; **H**: Kin (todos em concentrações de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$); **I**: MS sem reguladores . Barras = 1 cm. **N**: Nodal, **IN**: internodal, **F**: folha, **R**: raiz.

Por outro lado, a indução de brotos foi mais alta em explantes provindos de segmentos nodais, nos quais a organogênese foi direta com posterior desenvolvimento de calos na base do explante em meio MS contendo $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e Kin (Figuras 1B e 2B) ou sem reguladores (Figuras 1I e 2I) e indireta nos demais tratamentos avaliados.

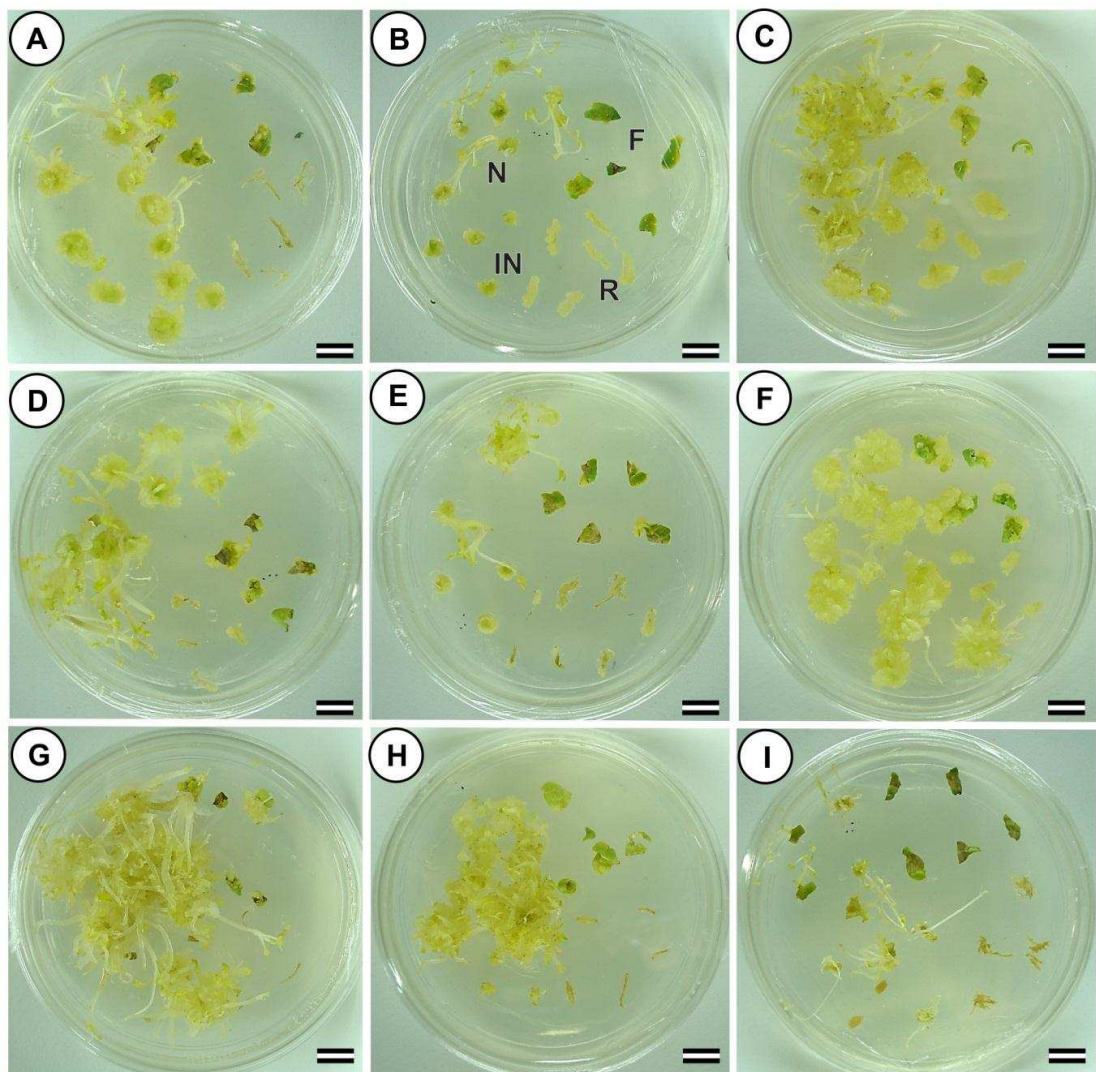


Figura 2. Biomassa produzida a partir de folhas, raízes, segmentos nodais e internodais de *Ruta graveolens* cultivados durante 40 dias em escuridão total em meio MS suplementado com: **A**: 2,4-D + *m*-TP; **B**: 2,4-D + Kin; **C**: 2,4-D; **D**: ANA + *m*-TP; **E**: ANA + Kin; **F**: ANA; **G**: *m*-TP; **H**: Kin (todos em concentrações de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$); **I**: MS sem hormônios. Barras = 1 cm. **N**: Nodal, **IN**: internodal, **F**: folha, **R**: raiz.

A organogênese foi mais estimulada em condições de luz, obtendo-se maior número de brotos os quais apresentaram caules curtos e com folhas bem desenvolvidas (Figura 1), enquanto que os brotos produzidos no escuro tinham caules mais alongados (Figura 2).

Ao analisar a média da massa fresca por explante, considerando cada tipo de explante como uma repetição, determinou-se que em condições de fotoperíodo, os meios que estimularam a maior produção de biomassa foram: 2,4-D + Kin (1 mg L^{-1}); ANA + *m*-TP (0,5 e 1 mg L^{-1}); 2,4-D + *m*-TP ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$); *m*-TP (0,5 e 1 mg L^{-1}); ANA (0,5 e 1 mg L^{-1}) e 2,4-D ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) com teores de massa fresca por explante (MF/E) de 284,4 - 480,7 mg e com porcentagens variáveis de calogênese e organogênese (Tabela 2). Enquanto que o meio MS livre de reguladores de crescimento produziu menor quantidade de biomassa ($101,3 \text{ mg MF/E}$) com porcentagens similares de calogênese (51%) e organogênese (49%).

Tabela 2. Médias de massa fresca por explante, porcentagem de calogênese e organogênese obtidas nos meios de indução em condições de fotoperíodo após 40 dias de cultivo.

TRATAMENTO	MASSA FRESCA POR EXPLANTE (mg)	CALOGÊNESE (%)	ORGANOGENESE (%)
2,4-D $0,5 \text{ mg L}^{-1}$	287,8 a	85 a	15 b
2,4-D 1 mg L^{-1}	244,2 b	89 a	11 b
ANA $0,5 \text{ mg L}^{-1}$	284,4 a	85 a	15 b
ANA 1 mg L^{-1}	290,5 a	93 a	7 b
Kin $0,5 \text{ mg L}^{-1}$	225,2 b	65 b	35 b
Kin 1 mg L^{-1}	220,1 b	61 b	39 a
<i>m</i> -TP $0,5 \text{ mg L}^{-1}$	324,6 a	53 b	48 a
<i>m</i> -TP $1,0 \text{ mg L}^{-1}$	286,2 a	46 b	54 a
2,4-D / <i>m</i> -TP $0,5 \text{ mg L}^{-1}$	429,5 a	60 b	40 a
2,4-D / <i>m</i> -TP 1 mg L^{-1}	186,2 b	74 a	26 b
ANA / <i>m</i> -TP $0,5 \text{ mg L}^{-1}$	379,2 a	79 a	21 b
ANA / <i>m</i> -TP 1 mg L^{-1}	307,0 a	76 a	24 b
2,4-D / Kin $0,5 \text{ mg L}^{-1}$	115,4 b	79 a	21 b
2,4-D / Kin 1 mg L^{-1}	480,7 a	61 b	39 a
ANA / Kin $0,5 \text{ mg L}^{-1}$	89,6 b	73 a	28 b
ANA / Kin 1 mg L^{-1}	149,5 b	81 a	19 b
MS	101,3 b	51 b	49 a

Médias seguidas pelas mesmas letras na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo (teste de Scott e Knott a 5% de significância).

Em condições de escuridão total, os meios que estimularam maior produção de biomassa foram: ANA + *m*-TP ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$); 2,4-D + *m*-TP ($0,5 \text{ e } 1 \text{ mg L}^{-1}$); *m*-TP ($0,5 \text{ e } 1 \text{ mg L}^{-1}$); ANA e 2,4-D ($0,5 \text{ e } 1 \text{ mg L}^{-1}$) com teores de

169,6 - 294,3 mg de MF/E, os quais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre eles (Tabela 3), estimulando tanto a formação de calos como de brotos. Em contraste, o meio MS livre de reguladores de crescimento produziu reduzida biomassa (52,3 mg MF/E) com maior porcentagem de brotos (87%). Cabe ressaltar que a quantidade de biomassa produzida em condições de fotoperíodo foi quase o dobro da obtida em escuridão total.

Tabela 3. Médias dos valores de massa fresca por explante, porcentagem de calogênese e organogênese obtidas nos meios de indução em escuridão total após 40 dias de cultivo.

TRATAMENTO	MASSA FRESCA POR EXPLANTE (mg)	CALOGÊNESE (%)	ORGANOGENESE (%)
2,4-D 0,5 mg L ⁻¹	209,9 a	70 a	30 b
2,4-D 1,0 mg L ⁻¹	198,2 a	85 a	15 b
ANA 0,5 mg L ⁻¹	211,8 a	96 a	4 b
ANA 1,0 mg L ⁻¹	244,3 a	98 a	2 b
Kin 0,5 mg L ⁻¹	148,5 b	75 a	25 b
Kin 1,0 mg L ⁻¹	161,8 b	78 a	22 b
<i>m</i> -TP 0,5 mg L ⁻¹	193,7 a	68 a	32 b
<i>m</i> -TP 1,0 mg L ⁻¹	169,6 a	66 a	34 b
2,4-D / <i>m</i> -TP 0,5 mg L ⁻¹	260,2 a	63 a	37 b
2,4-D / <i>m</i> -TP 1,0 mg L ⁻¹	244,8 a	76 a	24 b
ANA / <i>m</i> -TP 0,5 mg L ⁻¹	294,3 a	55 a	45 b
ANA / <i>m</i> -TP 1,0 mg L ⁻¹	140,0 b	85 a	15 b
2,4-D /Kin 0,5 mg L ⁻¹	62,3 b	84 a	16 b
2,4-D /Kin 1,0 mg L ⁻¹	112,5 b	75 a	25 b
ANA /Kin 0,5 mg L ⁻¹	71,5 b	80 a	20 b
ANA /Kin 1,0 mg L ⁻¹	102,5 b	95 a	5 b
MS	52,3 b	13 b	87 a

Médias seguidas pelas mesmas letras na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo (teste de Scott e Knott a 5% de significância).

Ao analisar a média da massa fresca total obtida em cada tipo de explante (folha, raiz, segmento nodal e internodal) nos diferentes tratamentos avaliados foram observadas diferenças significativas (Tabelas 4 e 5). Evidenciou-se que tanto em fotoperíodo como em escuridão total, os segmentos provenientes de folhas e de raízes induziram menor quantidade de biomassa (caracterizada principalmente pela formação de calos) que os segmentos nodais e internodais.

Em condições de fotoperíodo não houve diferenças na massa fresca total (MFT) produzida por folhas e raízes nos 17 tratamentos avaliados (Tabela 4). Os segmentos internodais responderam melhor nos meios 2,4-D + Kin (1

mg L⁻¹) e 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹), produzindo 3372,4 e 3365,6 mg de MFT, respectivamente (Tabela 4).

Já os segmentos nodais atingiram teores altos de MFT (3765 a 4887 mg) nos meios 2,4-D + Kin (1 mg L⁻¹), ANA + *m*-TP (0,5 e 1 mg L⁻¹), 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) e *m*-TP (0,5 mg L⁻¹); além disso, na maioria dos tratamentos, este tipo de explante foi o mais competente para a produção de biomassa (Tabela 4).

Tabela 4. Médias de massa fresca total (mg) por tipo de explante em condições de fotoperíodo após 40 dias de cultivo.

TRATAMENTO	FOLHA	RAIZ	INTERNODAL	NODAL
2,4-D 0,5 mg L ⁻¹	40,8 A ^a b ^o	243,2 Ab	2360,6 Ba	2864,2 Ba
2,4-D 1,0 mg L ⁻¹	482,0 Ab	154,4 Ab	1062,4 Cb	3161,2 Ba
ANA 0,5 mg L ⁻¹	71,4 Ac	584,8 Ac	1728,6 Cb	3303,0 Ba
ANA 1,0 mg L ⁻¹	119,2 Ab	392,2 Ab	2177,2 Ba	3120,6 Ba
Kin 0,5 mg L ⁻¹	44,8 Ac	21,6 Ac	1107,8 Cb	3250,4 Ba
Kin 1,0 mg L ⁻¹	26,6 Ac	33,7 Ac	1483,2 Cb	2858,6 Ba
<i>m</i> -TP 0,5 mg L ⁻¹	53,6 Ac	393,6 Ac	1913,6 Bb	4130,8 Aa
<i>m</i> -TP 1,0 mg L ⁻¹	40,0 Ac	781,4 Ac	1525,8 Cb	2857,2 Ba
2,4-D / <i>m</i> -TP 0,5 mg L ⁻¹	442,6 Ab	1016,2 Ab	3365,6 Aa	3765,0 Aa
2,4-D / <i>m</i> -TP 1,0 mg L ⁻¹	78,0 Ab	367,0 Ab	1054,0 Cb	2225,6 Ca
ANA / <i>m</i> -TP 0,5 mg L ⁻¹	117,6 Ac	500,6 Ac	1716,6 Cb	4452,0 Aa
ANA / <i>m</i> -TP 1,0 mg L ⁻¹	198,8 Ac	372,0 Ac	2436,6 Bb	3738,6 Aa
2,4-D /Kin 0,5 mg L ⁻¹	41,2 Aa	307,4 Aa	572,2 Ca	1338,4 Ca
2,4-D /Kin 1,0 mg L ⁻¹	1073,2 Ac	361,8 Ac	3372,4 Ab	4887,0 Aa
ANA /Kin 0,5 mg L ⁻¹	73,6 Aa	213,8 Aa	327,6 Ca	1177,4 Ca
ANA /Kin 1,0 mg L ⁻¹	74,6 Ab	282,0 Ab	866,2 Cb	1741,8 Ca
MS	17,6 Ab	164,8 Ab	371,4 Cb	1472,2 Ca

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo (teste de Scott e Knott a 5% de significância).

^oMédias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo (teste de Scott e Knott a 5% de significância).

Em escuridão total as folhas e raízes responderam de maneira similar nos 17 tratamentos avaliados. A produção de biomassa a partir de segmentos internodais foi mais estimulada nos meios com 2,4-D (0,5 mg L⁻¹), ANA (0,5 e 1mg L⁻¹), *m*-TP (0,5 e 1mg L⁻¹), 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) e ANA + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) com teores de MFT entre 1199,8 e 2475,0 mg.

Para os segmentos nodais, os tratamentos que mais estimularam a calogênese e a organogênese foram 2,4-D (0,5 e 1 mg L⁻¹), ANA (0,5 e 1mg L⁻¹), Kin (0,5 e 1mg L⁻¹), *m*-TP (1mg L⁻¹), 2,4-D + *m*-TP (0,5 e 1 mg L⁻¹) e ANA + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹), produzindo até 2818,4 mg de MFT.

Quanto ao tipo de explante mais eficiente para a produção de biomassa, em vários dos tratamentos não houve diferença estatística entre as médias de massa fresca obtida a partir de folha, raiz, segmentos internodal e nodal.

Tabela 5. Médias de massa fresca total (mg) por tipo de explante em escuridão total após 40 dias de cultivo.

TRATAMENTO	FOLHA	RAIZ	INTERNODAL	NODAL
2,4-D 0,5 mg L ⁻¹	400,2 Ab	174,6 Ab	1538,2 Aa	2321,0 Aa
2,4-D 1,0 mg L ⁻¹	469,2 Ab	115,6 Ab	783,6 Bb	2684,0 Aa
ANA 0,5 mg L ⁻¹	644,4 Ab	188,8 Ab	1493,8 Aa	1852,0 Aa
ANA 1,0 mg L ⁻¹	628,6 Ac	149,6 Ac	1559,6 Ab	2548,8 Aa
Kin 0,5 mg L ⁻¹	18,8 Ac	42,6 Ac	1019,2 Bb	1900,0 Aa
Kin 1,0 mg L ⁻¹	18,8 Ab	12,0 Ab	386,6 Bb	2818,4 Aa
<i>m</i> -TP 0,5 mg L ⁻¹	84,0 Ab	115,8 Ab	1721,6 Aa	1514,2 Ba
<i>m</i> -TP 1,0 mg L ⁻¹	49,2 Ab	125,2 Ab	1199,8 Aa	1957,2 Aa
2,4-D / <i>m</i> -TP 0,5 mg L ⁻¹	505,8 Ab	368,0 Ab	1964,4 Aa	2366,2 Aa
2,4-D / <i>m</i> -TP 1,0 mg L ⁻¹	807,6 Ab	218,0 Ab	1060,4 Bb	2043,0 Aa
ANA / <i>m</i> -TP 0,5 mg L ⁻¹	462,8 Ab	175,8 Ab	2475,0 Aa	2449,6 Aa
ANA / <i>m</i> -TP 1,0 mg L ⁻¹	748,4 Aa	203,6 Aa	745,6 Ba	1202,2 Ba
2,4-D /Kin 0,5 mg L ⁻¹	125,4 Aa	159,8 Aa	392,2 Ba	568,8 Ba
2,4-D /Kin 1,0 mg L ⁻¹	112,4 Ab	146,4 Ab	523,4 Bb	1352,0 Ba
ANA /Kin 0,5 mg L ⁻¹	99,4 Aa	122,0 Aa	257,2 Ba	877,2 Ba
ANA /Kin 1,0 mg L ⁻¹	289,2 Aa	191,4 Aa	504,0 Ba	1055,8 Ba
MS	33,2 Aa	68,2 Aa	406,8 Ba	537,6 Ba

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo (teste de Scott e Knott a 5% de significância).

°Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal constituem grupo estatisticamente homogêneo (teste de Scott e Knott a 5% de significância).

3.1 Análise fitoquímica

3.1.1 Obtenção dos extratos

Devido a que tanto em condições de fotoperíodo como em escuridão total, os meios de cultura que continham somente 2,4-D e ANA ou em combinação com *m*-TP (em concentrações de 0,5 e 1 mg L⁻¹) estimularam efetivamente a produção de biomassa de *R. graveolens*, foram obtidos os extratos etanólicos da massa fresca produzida nos meios com 0,5 e 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, ANA, 2,4-D + *m*-TP e ANA + *m*-TP, além do meio MS sem hormônios como controle.

De modo geral, os extratos obtidos dos tecidos cultivados em escuridão total apresentaram consistência viscosa e colorações alaranjada-amarela, amarela e marrom; enquanto que os extratos que foram obtidos de tecidos cultivados em fotoperíodo, tinham aparência mais seca e colorações verde,

marrom e café, possivelmente devido à presença de pigmentos clorofilianos. Além disso, todos os extratos foram parcialmente solúveis em água, etanol, clorofórmio e hexano, indicando a presença de compostos de polaridade e natureza diferentes.

3.1.2 Prospeção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Por meio da CCD, foi confirmada a presença de alcaloides em todos os extratos obtidos, exceto nos provenientes da massa fresca induzida a partir de folhas mantidas em meio MS sem fitorreguladores em fotoperíodo (MS / F-L).

Para determinar que outro tipo de metabólitos secundários foi sintetizado pelos tecidos *in vitro* obtidos de *R. graveolens* tanto em fotoperíodo como em escuridão total, foram selecionados dois dos tratamentos que induziram alta quantidade de biomassa: ANA + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) e 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) e foram comparados com o controle (MS sem fitorreguladores).

Após análise por CCD, de modo geral foi detectada maior abundância de alcaloides nos tecidos mantidos em escuridão total; no entanto, independentemente das condições de luminosidade, os extratos com maior presença de alcaloides foram os provenientes de tecidos cultivados em meio MS sem hormônios, excetuando o extrato MS/F-L, o qual não evidenciou presença de alcaloides e foi o que apresentou menor classe de compostos, sendo detectados somente saponinas, terpenos, catequinas, chalconas e auronas.

Tanto em fotoperíodo como em escuridão total foi verificada a presença de cumarinas, compostos antracênicos do tipo antronas e antranolas, terpenos provavelmente da classe dos monoterpenos, saponinas, e flavonoides tipo isoflavonas, catequinas, flavononas, flavonas, flavonóis, chalconas e auronas, como se pode constatar na tabela 6.

Tabela 6. Resultados da prospecção fitoquímica de extratos de tecidos *in vitro* de *Ruta graveolens* mediante cromatografia em camada delgada (CCD).

Extrato	Tipo de metabólito secundário									Esteróides e triterpenos
	Alcaloides	Cumarinas	Compostos antracênicos	Saponinas	Flavonoides					
					IF	C	Fn	F-Fv	Ch-A	
ANA + <i>m</i> -TP* / F-ET	++	+++	++	++	++	+++	+	+	-	++
ANA + <i>m</i> -TP* / R-ET	+	+++	++	++	++	+++	++	++	-	++
ANA + <i>m</i> -TP* / IN-ET	+	+	+	++	+	++	+	+	-	++
ANA + <i>m</i> -TP* / N-ET	+++	++	++	++	+++	+++	++	+	-	++
2,4-D + <i>m</i> -TP* / F-ET	++	+	++	++	+++	+++	++	+	-	++
2,4-D + <i>m</i> -TP* / R-ET	+	+	+++	+++	+	++	+	+	-	++
2,4-D + <i>m</i> -TP* / IN-ET	+	++	+	+	+++	+++	+++	++	-	+
2,4-D + <i>m</i> -TP* / N-ET	++	+++	++	+	+	+++	+	+	-	+
MS / F-ET	++	+++	+++	+	++	+++	++	++	-	+
MS / R-ET	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	-	++
MS / IN-ET	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	++
MS / N-ET	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	++
ANA + <i>m</i> -TP* / F-Ft	+++	+++	+++	++	++	++	++	-	++	+
ANA + <i>m</i> -TP* / R-Ft	+	+	++	+++	+	+	+	-	+	++
ANA + <i>m</i> -TP* / IN-Ft	+	++	+++	++	++	+++	+	-	+	+
ANA + <i>m</i> -TP* / N-Ft	+	++	+++	++	++	+++	+	-	+	+
2,4-D + <i>m</i> -TP* / F- Ft	+	+	++	+++	+	+	+	-	++	+
2,4-D + <i>m</i> -TP* / R- Ft	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+
2,4-D + <i>m</i> -TP* / IN- Ft	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
2,4-D + <i>m</i> -TP* / N- Ft	+++	++	++	++	++	+++	+++	-	+++	+
MS / F- Ft	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
MS / R- Ft	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	+++	++
MS / IN- Ft	++	++	+++	+	++	++	++	-	+	+
MS / N- Ft	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	++

*0,5 mg L⁻¹; F: Folha; R: Raiz; IN: Segmento internodal; N: Segmento nodal; ET: Escuridão total; Ft: Fotoperíodo; IF: Isoflavonas; C: Catequinas; Fn: Flavononas; F-Fv: Flavonas - Flavonóis; Ch-A: Chalconas- Auronas
 (-): Ausência (+): Presença moderada (++) Presença intermediária (+++): Presença abundante

No caso dos flavonoides detectados em *R. graveolens* (Tabela 6), houve maior abundancia nos tecidos cultivados em escuridão total, sendo mais produzidos os do tipo catequinas (flavan-3-ol). As flavonas e os flavonóis somente foram sintetizados pelos tecidos mantidos em escuridão total e as chalconas e auronas nos expostos a fotoperíodo.

Os tecidos induzidos a partir de folhas e segmentos nodais mantidos em meio MS com ANA + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) exibiram abundância maior quando expostos a fotoperíodo (Tabela 6); enquanto que os de raízes foram mais ativos metabolicamente em escuridão total. Em contraste, os tecidos obtidos nos meios MS sem reguladores ou com 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) mostraram comportamento similar, com maior abundância de metabólitos secundários quando os explantes iniciais foram folhas e segmentos nodais mantidos em escuridão total, raízes e segmentos internodais em fotoperíodo (Tabela 6).

3.1.3 Perfil cromatográfico dos extratos (por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE))

3.1.3.1 Perfil cromatográfico de alcaloides

Ao comparar os cromatogramas das amostras no comprimento de onda de 275 nm para a quantificação de alcaloides, foram detectados em todas as amostras cinco picos maioritários com tempos de retenção (Tr) aproximadamente de 3,1; 4,3; 5,1; 8,9; 9,0 e 16,1 minutos (Tabela 7).

Tabela 7. Áreas e tempos de retenção de alguns dos compostos detectados por CLAE durante o análise para quantificação de alcaloides em calos e brotos de *R. graveolens*.

Pico N°	Tr (min)	Área do pico por tratamento					
		2,4-D + <i>m</i> -TP ET	ANA + <i>m</i> -TP ET	MS ET	2,4-D + <i>m</i> -TP Ft	ANA + <i>m</i> -TP Ft	MS Ft
1	3,1	1177507	848069	1634931	1767469	1473682	2257791
2	4,3	841430	734417	1990452	846661	858815	681707
3	4,9	194246	288360	295798	-	-	-
4	5,1	334772	-	689853	1203536	983892	2284250
5	8,9	-	-	-	-	-	4111298
6	9,0	-	-	863588	1443821	702158	-
7	9,2	514149	328247	-	-	-	-
8	11,0	164028	75846	284817	250995	74875	492355
9	11,6	53500	42278	244894	373336	171057	1028575
10	16,1	142430	88690	624271	1383728	506240	3911868

Concentração dos reguladores de crescimento: 0,5 mg L⁻¹; **Tr**: tempo de retenção; **ET**: Escuridão total; **Ft**: fotoperíodo.

Em geral, a biomassa produzida em fotoperíodo produziu maiores concentrações dos compostos detectados, sendo que o meio MS sem reguladores foi o que mais estimulou a biossíntese de metabólitos (Figura 7). O composto com Tr de 4,9 min somente foi produzido no escuro, enquanto que o pico com Tr de 8,9 min só foi detectado nos extratos da biomassa obtida em meio MS sem reguladores. As amostras provenientes dos tratamentos com 2,4-D + *m*-TP e ANA + *m*-TP no escuro apresentaram um composto com Tr de 9,2 min, o qual não foi sintetizado nos outros tratamentos (Tabela 7).

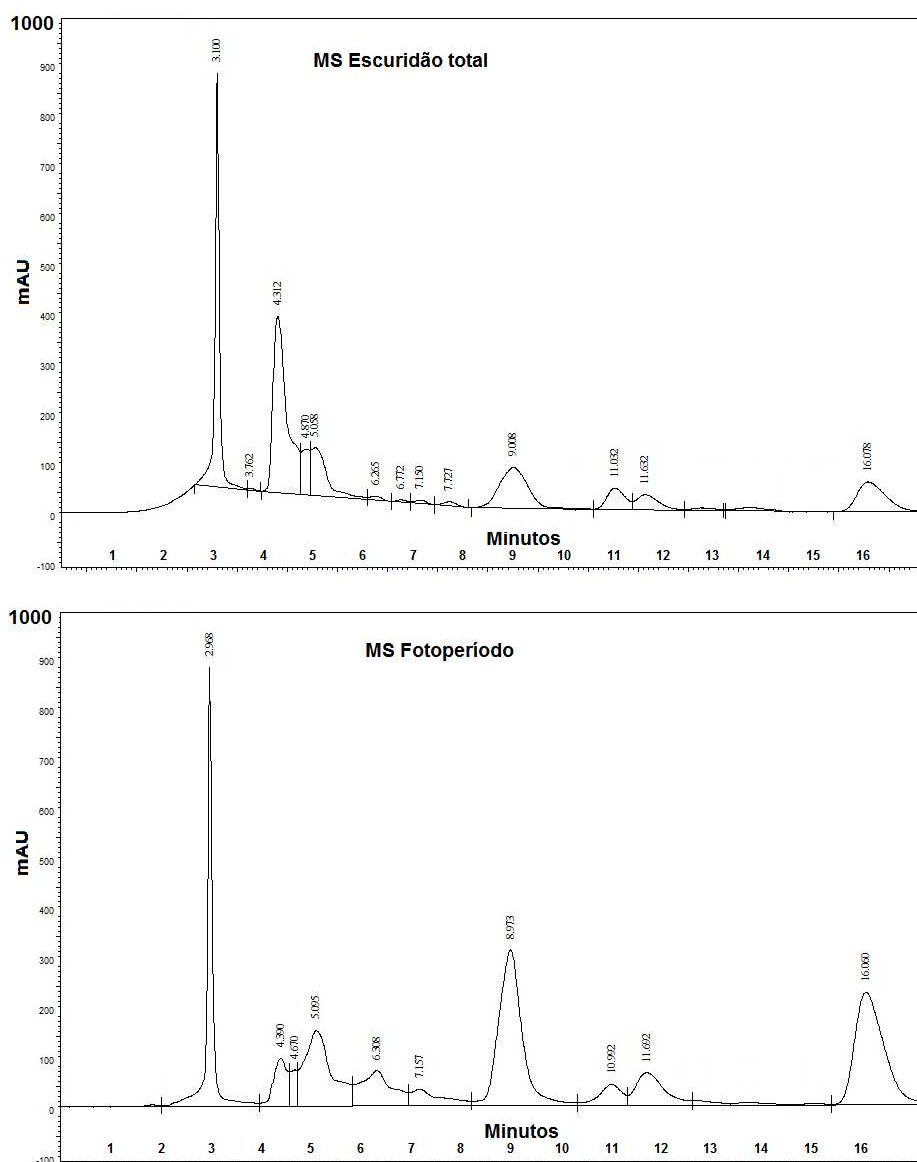


Figura 7. Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de alcaloides de extratos etanólicos de calos e

brotos de *R. graveolens*. Detector UV/visível a 275 nm, coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm), fase móvel: acetonitrila:metanol:água (10:45:45), fluxo 0,6 mL min⁻¹ e tempo de corrida 30 min.

3.1.3.2 Perfil cromatográfico de cumarinas

Ao comparar os cromatogramas das amostras no comprimento de onda de 310 nm para a quantificação de cumarinas foram detectados picos maioritários com Tr de 3,1; 3,2; 4,3; 5,2 e 5,5 minutos, os quais apresentaram maior concentração na biomassa produzida no meio MS sem fitorreguladores (controle) sob fotoperíodo; exceto o pico em Tr 3,2 o qual não esteve presente no controle. No entanto esse meio de cultura estimulou a biossíntese de dois compostos (ausentes nas outras amostras) com Tr de 3,0 e 6,1 (presente também em MS em escuridão total) (Tabela 8, Figura 8).

Tabela 8. Áreas e tempos de retenção de alguns dos compostos detectados por CLAE durante o análise para quantificação de cumarinas em calos e brotos de *R. graveolens*.

Pico Nº	Tr (min)	Área do pico por tratamento					
		2,4-D + <i>m</i> -TP ET	ANA + <i>m</i> -TP ET	MS ET	2,4-D + <i>m</i> -TP Ft	ANA + <i>m</i> -TP Ft	MS Ft
1	3,0	-	-	-	-	-	1075333
2	3,1	519785	399859	748333	489724	493557	2173983
3	3,2	515625	409160	829746	1299813	1052677	-
4	4,3	2105867	973633	5075500	5561781	3848932	9570433
5	4,7	344195	307197	-	-	-	-
6	5,2	222734	161166	842330	1769084	820391	4077226
7	5,5	440683	325967	1416547	1654756	701516	-
8	5,9	-	-	267365	-	-	895174
9	6,1	-	-	-	-	129889	-
10	6,4	43325	19633	182454	108793	13448	89214
11	6,7	112401	36349	186172	200018	49853	196596
12	7,4	29940	11564	119182	210966	91614	256500
13	8,3	96540	45814	237222	490730	103944	728967

Concentração dos reguladores de crescimento: 0,5 mg L⁻¹; Tr: tempo de retenção; ET: Escuridão total; Ft: fotoperíodo.

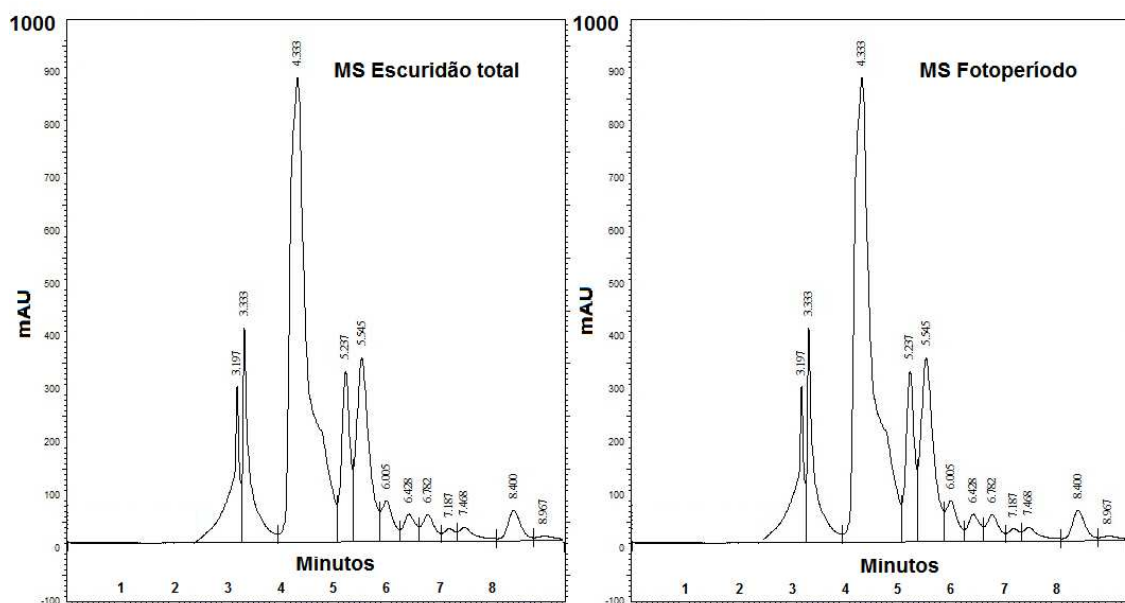


Figura 8. Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de cumarinas de extratos etanólicos de calos e brotos de *R. graveolens*. Detector UV/visível a 310 nm, coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m), fase móvel: gradiente com dois sistemas: (A) acetonitrila:metanol:água (30:30:40) e (B) acetonitrila:metanol (50:50), fluxo 0,6 mL min⁻¹ e tempo de corrida 30 min.

4. DISCUSSÃO

4.1 Diferentes combinações e concentrações de 2,4-D, ANA, Kin e *m*-TP estimularam a produção de biomassa de *R. graveolens*, sendo a *m*-TP mais efetiva que a Kin.

As auxinas 2,4-D e ANA, tanto em fotoperíodo como em escuridão total, induziram principalmente a formação de calo nos explantes de *R. graveolens*; enquanto que ao ser utilizadas em combinação com *m*-TP ou Kin, estimularam em proporções variáveis a calogênese e a organogênese. Contudo, houve maior porcentagem de calo ao se utilizar 2,4-D (1 mg L^{-1}), tanto na presença quanto ausência de luz. Estes resultados concordam com o reportado por vários autores para *R. graveolens* e outras rutáceas como *R. bracteosa*, *R. macrophylla* e *R. chalepensis*, nas quais diferentes fitorreguladores como ANA, 2,4-D, Kin e BA, em distintas condições de luminosidade, estimularam a formação de calos e brotos (Ramawat et al. 1985; Baumert et al. 1992; Massot et al. 2000; Bohidar et al. 2008; Diwan e Malpathak, 2008; Szopa et al. 2012). Todavia, Ahmad et al. (2010) reportaram que a porcentagem de calogênese a partir de segmentos foliares de *R. graveolens* aumentou com o incremento da concentração de 2,4-D.

De modo geral, explantes de *R. graveolens* cultivados em meio MS suplementado com Kin, em combinação ou não com 2,4-D e ANA, produziram baixa quantidade de calos e brotos. Contrário ao relatado por Baumert et al. (1982) e Endler et al. (2008), os quais estabeleceram que a Kin em combinação com 2,4-D em várias concentrações, foi efetiva para induzir elevadas quantidades de biomassa de *R. graveolens*, principalmente a calogênese. Além disso, também têm sido utilizada junto com 2,4-D e ANA, na calogênese de outras Rutáceas como *Choisy ternata* Kunth (Sejourne et al. 1981), *Ruta bracteosa*, *R. chalepensis* e *R. Macrophylla* (Baumert et al. 1992) e *Phellodendron amurense* (Ikuta et al. 1998).

Neste trabalho, os meios de cultivo que continham *m*-TP induziram maior biomassa que aqueles suplementados com Kin, sendo este o primeiro reporte do efeito de topolinas como a *m*-TP sobre a micropropagação *in vitro*

de *R. graveolens*. A *m*-TP em concentrações de 0,5 a 2,5 mg L⁻¹, tem sido mais eficiente que citocininas como o BA na micropropagação de espécies vegetais como *Aloe polyphylla* (Bairu et al. 2007), banana 'Williams' (Bairu et al. 2007; Bairu et al. 2008; Aremu et al. 2012a), *Hordeum vulgare* L.cv.Tarm (Huyluoglu et al. 2008), *Musa* spp (Escalona et al. 2003), *Pelargonium x hederaefolium* e *P. x hortorum* (Wojtania, 2010).

Em relação à resposta dos diferentes tipos de explantes avaliados, em que a produção de biomassa foi superior ao utilizar como explantes segmentos nodais, seguidos dos internodais de *R. graveolens*, sabe-se que o desenvolvimento do cultivo *in vitro* de plantas depende consideravelmente do tipo de material vegetal utilizado, uma vez que existem diferenças significativas entre as células e os diferentes tipos de órgãos na capacidade de regeneração de tecidos (KrishnaRaj e Vasil, 1995).

No presente estudo, os segmentos nodais de *R. graveolens*, em vários dos meios avaliados, induziram maior quantidade de brotos que de calos; caso contrário, explantes excisados de folhas e raízes tenderam a formar principalmente calogênese. Resultados similares tem sido reportados por Bohidar et al. (2008), Faisal et al. (2005), Diwan e Malpathak (2008), em que segmentos nodais de *R. graveolens* cultivados em meio MS com reguladores como BA, Kin, ANA e AIA em diferentes combinações e concentrações, estimularam a indução e proliferação de brotos. Enquanto que para a formação de calo, tem sido cultivados segmentos foliares em meio MS com 2,4-D, e hipocótilos em meio MS com 2,4-D e Kin (Baumert et al. 1982; Massot et al. 2000; Ahmad et al. 2010).

4.2A produção de metabólitos secundários em brotos e calos de *R. graveolens* é afetada pela presença de fitorreguladores no meio de cultura e pela ausência e presença de luz.

Dos extratos etanólicos de *R. graveolens* analisados por cromatografia em camada delgada (CDD), os que apresentaram maior abundância de alcaloides foram os provenientes de calos e brotos mantidos em escuridão total, principalmente no meio MS sem fitorreguladores (controle) e com 0,5 mg

L⁻¹ de ANA e *m*-TP. Tem sido estabelecido que órgãos *in vitro* de *R. graveolens* cultivados em meio MS com diferentes auxinas e citocininas mantidos no escuro biosintetizam distintas classes de alcaloides como quinolínicos, furanoquinolínicos e acridônicos, entre os que se destacam acetilfuroacridona, rutacridona, gravacridonclorina, 1-hidroxi-3-metoxi-*N*-metil-acridona, gravacridonol, arborina, ribalinio e rutilinio (Baumert et al. 1982; Ramawat et al. 1985; Baumert et al. 1992).

A presença de cumarinas, antronas, antranolas, monoterpenos, saponinas, isoflavonas, catequinas, flavononas, flavonas, flavonóis, chalconas e auronas na biomassa obtida de *R. graveolens* em condições *in vitro*, indica que após 40 dias de cultivo o material obtido em condições *in vitro* tinha o metabolismo secundário ativo, produzindo vários dos tipos de compostos que são biossintetizados pelas plantas de *R. graveolens* em condições *ex vitro*. Além das classes de metabólitos detectados em este trabalho, em órgãos adultos de *R. graveolens* têm sido reportados, por exemplo, esteróis, esteróides, aminas, proteínas, aminoácidos, carboidratos, resinas, lipídeos, mucilagem, metilcetonas, glicosídeos e óleos essenciais constituídos por terpenos como limoneno, α -pineno, linalol e 1,8-cineol (de Feo et al. 2002; Nazish et al. 2009; de Bona et al. 2013).

Por outro lado, similar ao obtido em este trabalho, compostos do tipo cumarinas (xantotoxina, isopimpinellina, bergapteno e psoraleno), flavonoides (rutina) e alcaloides (kokusaginina, skimmianina, graveolinina, γ -fagarina, dictamina, arborinina, rutacridona) foram isolados de diferentes tipos de tecidos de *R. graveolens* em condições *in vitro*; sendo este tipo de metabólitos os de maior interesse farmacológico e biocida (Milesi et al. 2001; Wu et al. 2003; Figueroa et al. 2009; Dhale et al. 2010; Hamad, 2012).

De modo geral, alcaloides e compostos antracênicos foram mais abundantes nos tecidos de *R. graveolens* mantidos em meio MS sem fitorreguladores tanto em escuridão total como em fotoperíodo, apesar de não ter estimulado eficientemente a produção de biomassa. No entanto, devido a que esse tratamento estimulou principalmente a organogênese, é provável que por serem tecidos mais desenvolvidos tivessem mais ativa a biossíntese

desses metabólitos secundários. De acordo com Diwan e Malpathak (2010), a biossíntese de determinados compostos como as furanocumarinas, em tecidos *in vitro* de *R. graveolens*, depende do estado de desenvolvimento dos tecidos, aumentando com o grau de organização. Sejourne et al. (1981) indicaram que em calos friáveis de *Choisy ternata* Kunth (Rutaceae) o conteúdo total de alcaloides furoquinolínicos foi mais baixo comparado com os produzidos na planta original, devido a as células dos calos mostraram decremento em enzimas específicas necessárias para as reações de hidroxilação e metilação durante a biossíntese de alcaloides.

A abundancia de cumarinas foi similar nos extratos de *R. graveolens* obtidos no controle (MS sem fitorreguladores) e nos tratamentos ANA + *m*-TP e 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹), tanto em escuridão total como em fotoperíodo. Diferente ao reportado em varias das pesquisas realizadas sobre a indução de cumarinas e furanocumarinas em cultivos *in vitro* de *R. graveolens*, nas quais encontraram-se concentrações maiores destes metabólitos em brotos cultivados em presença de luz (Ekiert e Gomólka, 1999; Massot et al. 2000; Diwan e Malpathak, 2008; Szopa et al. 2012).

Embora nos extratos etanólicos avaliados de *R. graveolens* tenha sido registrada pouca quantidade de terpenos, é possível que apresentem outros dos compostos derivados da sua rota de biossíntese, como pigmentos clorofilianos; cuja síntese poderia estar sendo estimulada significativamente nos tecidos cultivados com *m*-TP no fotoperíodo, pelo fato que as topolinas influenciaram positivamente na produção de pigmentos fotossintéticos em tecidos *in vitro* de outras plantas como banana 'Williams' (Aremu et al. 2012b).

Em tecidos *in vitro* de diversas espécies vegetais cultivados em presença de luz é estimulada a biossíntese de fenóis, esteróis, esteróides, terpenos, saponinas, flavonoides, antocianinas, taninos, furanocumarinas e alguns tipos de alcaloides, os quais são ativados como mecanismo de defesa devido ao estresse oxidativo caracterizado pela rápida formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânions superóxido (O₂⁻) e radicais livres de hidroxila (*OH), os quais podem oxidar

proteínas, ácidos graxos e DNA, causando morte celular (Mittler, 2002; Kim et al. 2003; Su et al. 2009; Alabri et al. 2013).

Porém, no presente estudo, os tecidos de *R. graveolens* obtidos em condições de escuridão total exibiram maior abundância de alcaloides, cumarinas, flavonoides e terpenóides; em contraste, as saponinas foram mais abundantes em tecidos sob fotoperíodo. É possível que além das condições de luminosidade, os reguladores de crescimento estimularam a produção destes compostos, principalmente na escuridão total; já que tanto a luz como os fitorreguladores estimulam à biossíntese de compostos como os flavonóis (Marais et al. 2006).

A *m*-TP provavelmente estimulou a biossíntese de alguns dos metabólitos secundários detectados nos extratos de *R. graveolens*, como por exemplo, flavonoides; já que tem sido reportado que ao igual que a luz, as topolinas, como a *m*-TP, estimulam a produção de flavonoides, além de fenóis e taninos, sendo de modo geral mais eficientes que outras citocininas como o BA na produção de este tipo de metabólitos (Bairu et al. 2007; Amoo et al. 2012; Aremu et al. 2012a).

A presença das flavonas e flavonóis somente nos extratos de tecidos de *R. graveolens* mantidos em escuridão total, e das chalconas e auronas nos expostos a fotoperíodo, possivelmente deve-se a que após 40 dias de cultura nos tecidos cultivados em escuridão total, as chalconas, (primeiros produtos da biossíntese de flavonoides, a partir dos quais é desencadeada a cascata de reações que originam aos outros tipos de flavonoides) já tinham sido consumidas gerando somente às flavononas, que logo são utilizadas para a produção das flavonas, flavan-4-óis, 3-OH-flavonas e isoflavonas (Figura 3).

Enquanto que os tecidos mantidos em fotoperíodo poderiam ter toda a rota de biossíntese ativa, estimulada pela luz, produzindo chalconas e às demais classes de flavonoides, com pouca síntese de flavonas, as quais por sua vez poderiam estar originando isoflavonas e/ou flavan-3,4-dióis e seus derivados (Winkel-Shirley, 2001).

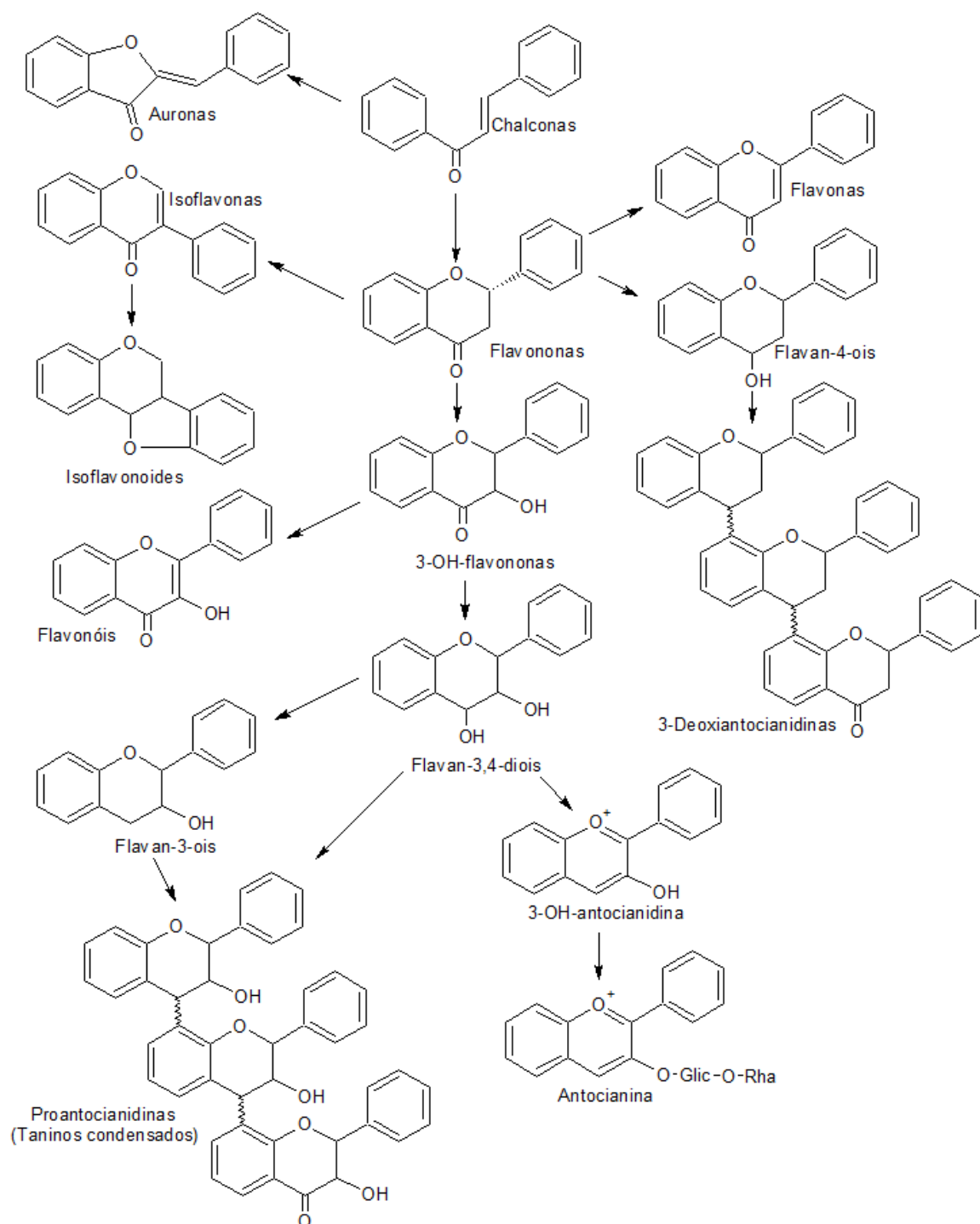


Figura 3. Esquema das principais etapas da biossíntese de flavonoides (Winkel-Shirley, 2001).

5. CONCLUSÕES

De modo geral, os segmentos nodais de *R. graveolens* produziram a maior quantidade de biomassa, estimulada principalmente nos meios que continham ANA + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) e 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) em escuridão total, porém as quantidades obtidas de massa fresca foram mais baixas que as produzidas em fotoperíodo, onde os meios mais efetivos foram os suplementados com 2,4-D + Kin (1 mg L⁻¹) e 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹). A *m*-TP foi mais efetiva que a Kin para a indução de calos e brotos, tanto em combinação ou não com 2,4-D e ANA, sendo este o primeiro reporte sobre a utilização de *m*-TP para a micropropagação de *R. graveolens*, podendo ser considerada como uma nova alternativa para à produção de biomassa e metabólitos secundários em esta planta medicinal.

Ao avaliar os extratos etanólicos da biomassa formada no meio MS sem fitorreguladores e suplementado com ANA + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹) e 2,4-D + *m*-TP (0,5 mg L⁻¹), por cromatografia em camada delgada (CCD), foi verificada a presença de alcaloides, cumarinas, compostos antracênicos, terpenos, saponinas e diferentes tipos de flavonoides.

Com os resultados qualitativos obtidos após a CCD, não foi possível determinar qual tipo de explante produziu a biomassa com maior capacidade biosintética, uma vez que todos eles apresentaram abundâncias similares dos diferentes núcleos fitoquímicos detectados, as quais dependeram do meio de cultura e as condições de luz. Pelo tanto, é necessário continuar com as análises quantitativas, por técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para determinar qual dos tratamentos avaliados permitiram atingir os teores máximos de cumarinas e alcaloides ou de outros metabólitos secundários que estão sendo produzidos por calos e brotos de *R. graveolens*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad N.; Faisal M.; Anis M.; Aref I.M. 2010. *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. **South African Journal of Botany** 76: 597 - 600.
- Ahmad N.; Faisal M.; Fatima N.; Anis M. 2012. Encapsulation of microcuttings for propagation and short-term preservation in *Ruta graveolens* L.: a plant with high medicinal value. **Acta Physiologiae Plantarum** 34: 2303 - 2310.
- Amoo S.O.; Aremu A.O.; Van Staden J. 2012. In vitro plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 111: 345 - 358.
- Aremu A.O.; Bairu M.W.; Szűčová L.; Doležal K.; Finnie J.F.; Van Staden J. 2012a. Assessment of the role of *meta*-topolins on in vitro produced phenolics and acclimatization competence of micropropagated 'Williams' banana. **Acta Physiologiae Plantarum** 34: 2265 - 2273.
- Aremu A.O.; Bairu M.W.; Szűčová L.; Finnie J.F.; Van Staden J. 2012b. The role of *meta*-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated 'Williams' banana. **Journal of Plant Physiology** 169: 1530 - 1541.
- Bairu M.W.; Stirk W.A.; Doležal K.; Van Staden J. 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 90: 15 - 23.
- Bairu M.W.; Stirk W.A.; Doležal K.; van Staden J. 2008. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars 'Williams' and 'Grand Naine' (*Musa* spp. AAA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 95: 373 - 379.
- Baumert A.; Kuzovkina N.; Krauss G.; Hieke M.; Gröger D. 1982. Biosynthesis of rutacridone in tissue cultures of *Ruta graveolens*. **Plant Cell Reports** 1: 168 - 171.
- Baumert A.; Gröger D.; Kuzovkina I.N.; Reisch J. 1992. Secondary metabolites produced by callus cultures of various *Ruta* species. **Plant cell, Tissue and Organ Culture** 28: 159 - 162.
- Bohidar S.; Thirunavoukkarasu M.; Rao T.V. 2008. Effect of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation of 'garden rue' (*Ruta graveolens* L.). **International Journal of Integrative Biology** 3: 36 - 43.
- Cardoso-Lopes E.M.; Maier J.A.; da Silva M.R.; Regasini L.O.; Simote S.Y.; Lopes N.P.; Pirani J.R.; Bolzani V. da S.; Young M.C.M. 2010. Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. **Molecules** 15: 9205 - 9213.

Coste A.; Vlase L.; Halmagyi A.; Deliu C.; Coldea G. 2011. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 106: 279 - 288.

Couillerot E.; Caron C.; Comoe L.; Audran J-E.; Molinatti P.; Zeches M.; Men-Olivier L.L.; Jardillier J-C.; Chenieux J-C. 1994. Benzophenanthridine and furoquinoline accumulation in cell suspension cultures of *Fagara zanthoxyloides*. **Phytochemistry** 37: 425 - 428.

Cruz C.D. 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum, Agronomy** 35: 271 - 276.

Cruz A.C.F.; Rocha D.I.; Iarema L.; Ventrella M.C.; Costa M.G.C.; Neto V.B.P.; Otoni W.C. 2013. *In vitro* organogenesis from root culture segments of *Bixa orellana* L.(Bixaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 1 - 8.

De Bona E.A.M.; Pinto F.G.S.; Borges A.M.C.; Scur M.C.; Fruet T.K.; Weber L.D.; Alves L.F.A.; De Moura A.C. 2013. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente a sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde** 15: 41 - 46.

De Feo V.; De Simone F.; Senatore F. 2002. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry** 61: 573 - 578.

Dhale D.A.; Markandeya S.K.; Niturkar Y.D. 2010. Standardization of homoeopathic drug *Ruta graveolens* L. **Journal of Phytology** 2: 1 - 7.

Diwan R.; Malpathak N. 2008. Novel technique for scaling up of micropropagated *Ruta graveolens* shoots using liquid culture systems: A step towards commercialization. **New Biotechnology** 25: 85 - 91.

Diwan R.; Malpathak N. 2010. Histochemical localization in *Ruta graveolens* cell cultures: elucidating the relationship between cellular differentiation and furanocoumarin production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 46: 108 - 116.

Diwan R.; Shinde A.; Malpathak N. 2012. Phytochemical composition and antioxidant potential of *Ruta graveolens* L. *in vitro* culture lines. **Journal of Botany**, 6 pag. doi:10.1155/2012/685427.

Ekiert H.; Gomólka E. 1999. Effect of light on contents of coumarin compounds in shoots of *Ruta graveolens* L. cultivated *in vitro*. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 68: 197 - 200.

Endler A.; Martens S.; Wellmann F.; Matern U. 2008. Unusually divergent 4-coumarate: CoA-ligases from *Ruta graveolens* L. **Plant Molecular Biology** 67: 335 - 346.

Escalona M.; Cejas I.; González-Olmedo J.; Capote I.; Roels S.; Cañal M.J.; Rodríguez R.; Sandoval J.; Debergh P. 2003. The effect of *meta*-topolin on

plantain propagation using a temporary immersion bioreactor. **InfoMusa** 12: 28 - 30.

Faisal M.; Ahmad N.; Anis M. 2005. *In vitro* regeneration and mass propagation of *Ruta graveolens* L.-A multipurpose shrub. **HortScience** 40: 1478 - 1480.

Farnsworth N.R. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Science** 55: 225 - 276

Figuerola L.; Díaz F.; Camacho A.; López M. 2009. Efectos inducidos por *Ruta graveolens* L., *Cnidocolus chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L. sobre los niveles de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en un modelo de rata diabética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19: 898 - 907.

Hamad M.N. 2012. Isolation of rutin from *Ruta graveolens* (Rutaceae) cultivated in Iraq by precipitation and fractional solubilization. **Pharmacie Globale International Journal of Comprehensive** 3: 1 - 3.

Huyluoglu Z.; Unal M.; Palavan - Unsal N. 2008. Cytological evidences of the role of *meta*-topolin and benzyladenin in barley root tips. **Advances in Molecular Biology** 1: 31 - 37.

Ikuta A.; Nakamura T.; Urabe H. 1998. Indolopyridoquinazoline, furoquinoline and canthinone type alkaloids from *Phellodendron amurense* callus tissues. **Phytochemistry** 48: 285 - 291

Kim K.S.; Yeon S.L.; Sang S.L.; Jung H.; Park Y.; Shin K.H.; Kim B-K. 2003. Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*. **Journal of Ethnopharmacology** 85: 69 - 72

KrishnaRaj S.; Vasil I.K. 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. En: Thorpe T.A (eds). *In vitro* embryogenesis in plant. Klumer Academic Publishers, Dordresht, Netherlands, 417 - 470.

Kuo C-L.; Chao C-H.; Lu M.K. 2012. Effects of auxins on the production of steroidal alkaloids in rapidly proliferating tissue and cell cultures of *Solanum lyratum*. **Phytochemical Analysis** 23: 400 – 404.

Kuzovkina I.; Al'terman I.; Schneides B. 2004. Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry** 65: 1095 - 1100.

Marais J.P.J.; Deavours B.; Dixon E.A.; Ferreira D. 2006. The stereochemistry of flavonoids. En: Grotewold E (Eds). **The science of flavonoids**. Springer USA, 273p.

Massot B.; Milesi S.; Gontier E.; Bourgaud F.; Guckert A. 2000. Optimized cultural conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 62: 11 -19.

- Mei-Lan L.; Murthy H.N.; Kee-Yoeup P. 2003. Photoautotrophic culture conditions and photosynthetic photon flux influence growth of *Lilium* bulblets *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 39: 532 - 535.
- Milesi S.; Massot B.; Gontier E.; Bourgaud F.; Guckert A. 2001. *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. **Plant Science** 161: 189 - 199
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science** 7: 405 - 410.
- Mohamed M.A.H; Ibrahim T. 2011. In vitro mass production of *Ruta graveolens* L. for secondary products production. **Acta Physiologiae Plantarum** 33: 1945 - 1951.
- Murashige T.; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473 - 497.
- Nazish I.; Kaskoos R.A.; Mir S.R.; Amin S.; Ali M. 2009. Preliminary pharmacognostical standardisation of *Ruta graveolens* L. aerial parts. **Research Journal of Medicinal Plants** 3: 41 - 44.
- Piekoszewska A.; Ekiert H.; Zubek S. 2010. Arbutin production in *Ruta graveolens* L. and *Htpericum perforatum* L. in vitro cultures. **Acta Physiologiae Plantarum** 32: 223 - 229.
- Ramawat K.G.; Rideau M.; Chenieux J-C. 1985. Growth and quaternary alkaloid production in differentiating and non-differentiating strains of *Ruta graveolens* **Phytochemistry** 24: 441 - 445.
- Sejourne M.; Viel C.; Bruneton J.; Rideau M.; Chenieux J.C. 1981. Growth and furoquinoline alkaloid production in cultured cells of *Choisya ternata*. **Phytochemistry** 20: 353 - 355.
- Su X-Y.; Wanga Z-Y.; Liu J-R. 2009. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. **Food Chemistry** 117: 681 - 686.
- Szopa A.; Ekiert H.; Szewczyk A.; Fugas E. 2012. Production of bioactive phenolic acids and furanocumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *Divaricata* (Tenore) Gams. Under different light conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 110: 329 - 336.
- Wagner H.; Bladt S. 2001. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlim: Springer. 384 p.
- Wang Y.; Gao L.; Wang Z.; Liu Y.; Sun M.; Yang D.; Xia T. 2012. Light-induced expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthetic pathways in callus of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). **Scientia Horticulturae** 133: 72 - 83.

Werner T.; Motyka V.; Strnad M.; Schmülling T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 98: 10487 – 10492.

Wojtania A. 2010. Effect of *meta*-topolin on in vitro propagation of *Pelargonium x hortorum* and *Pelargonium x hederæfolium* cultivars. **Acta societatis Botanicorum Poloniae** 79: 101 - 106.

Wu T-S.; Shi L-S.; Wang J-J.; Iou S-C.; Chang H-C.; Chen Y-P.; Kuo Y-H.; Chand Y-L.; Teng C-M. 2003. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. **Journal of the Chinese Chemical Society** 50: 171 - 178.

Zhao J.L.; Zhou, L.G.; Wu J.Y. 2010. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. **Applied microbiology and biotechnology** 87: 137 - 144.

CAPITULO 2

Indução de brotos e biossíntese de metabólitos secundários de *Ruta graveolens* *in vitro* sob condições fotomixotróficas e fotoautotróficas

Resumo - A micropropagação heterotrófica de plantas gera baixas taxas de multiplicação e diminui a capacidade fotossintética e sobrevivência durante a aclimatização; enquanto que sistemas fotoautotróficos, utilizando meios de cultura isentos de açúcar, elevadas irradiâncias e maiores concentrações de CO₂ mediante ventilação natural ou forçada, fornecem condições mais favoráveis às plantas. O presente trabalho teve por objetivo determinar o efeito de diferentes concentrações de CO₂ e sacarose sobre o desenvolvimento de brotos, a produção de massa fresca e a biossíntese de metabólitos secundários de *R. graveolens*, estabelecendo sistemas de cultivo heterotróficos, fotomixotróficos e fotoautotróficos. Foram cultivados segmentos nodais de *R. graveolens* provenientes de plântulas *in vitro* em meio MS enriquecido com ácido indol-3-acético (AIA) (0,25 mg L⁻¹), 6-benziladenina (BA) (1 mg L⁻¹) e com concentrações de 0 e 15 mg L⁻¹ de sacarose. Os experimentos foram realizados em recipientes fechados sem membranas e outros com orifícios cobertos com membranas de 0,45 µm de poro, avaliando duas concentrações de CO₂ (360 e 1000 µmol mol⁻¹). A indução e o desenvolvimento de brotos foram maiores em condições heterotróficas e fotomixotróficas, enquanto que as fotoautotróficas não estimularam a produção de biomassa. Em todos os tratamentos avaliados foi estimulada a biossíntese de alcaloides, cumarinas, compostos antracênicos, saponinas, terpenos e flavonoides. A presença de sacarose no meio de cultivo foi necessária para a micropropagação de brotos de *R. graveolens*, pois estes não apresentaram capacidade fotoautotrófica.

Palavras-chave: intercâmbio gasoso, ventilação natural e forçada, enriquecimento de CO₂.

Shoot induction and secondary metabolite biosynthesis from *in vitro* *Ruta graveolens* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions.

Abstract - Heterotrophic micropropagation results in low multiplication rates and lowers the photosynthetic capacity and plant survival during acclimatization. Therefore, photoautotrophic systems, using sugar-free culture media, high irradiance and higher CO₂ concentrations through natural or forced ventilation, provide plants with more favorable conditions. This study aimed to determine the effect of different CO₂ concentrations on the growth of shoots, fresh mass production and biosynthesis of secondary metabolites of *R. graveolens*, establishing heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic cultivation systems. Nodal segments of *R. graveolens* from *in vitro* plantlets were cultured on MS medium supplemented with indole-3-acetic acid (IAA) (0.25 mg L⁻¹), 6-benzyladenine (BA) (1 mg L⁻¹) and concentrations of 0 to 15 mg L⁻¹ sucrose. The experiments were conducted in jars sealed without membranes or coated with holes with membranes of 0,45 mm of pore, evaluated two concentrations of CO₂ (360 and 1000 µmol mol⁻¹). The induction and development of shoots was higher in photomixotrophic and heterotrophic conditions. In all evaluated treatments was stimulated the biosynthesis of alkaloids, coumarins, anthracenic compounds, saponins, terpenes and flavonoids. The presence of sucrose in the culture medium was required for micropropagation of shoots of *R. graveolens*, as they showed no photoautotrophic capacity.

Key words: gas exchange, natural and forced ventilation, CO₂ enrichment.

1. INTRODUÇÃO

A propagação e o desenvolvimento adequado de tecidos cultivados *in vitro* dependem de fatores como a irradiância (ou densidade de fluxo de fótons fotossintético - DFFF) e o microambiente dentro do recipiente de cultivo. No sistema de vedação convencional, utilizando recipientes sem sistemas de ventilação, esse microambiente é caracterizado pelo baixo nível de trocas gasosas entre os ambientes interno e externo, levando ao acúmulo de etileno, alta umidade relativa e diminuição gradual das concentrações de CO₂ durante o fotoperíodo, gerando baixa taxa fotossintética nos tecidos (Fujiwara e Kozai 1995; Kubota, 2001; Rahman e Alsadon, 2007).

A maioria das plantas clorofiladas tem a capacidade de crescer fotoautotroficamente em condições *in vitro*. Porém, a baixa absorção de CO₂ causada pela limitada ventilação dos recipientes de cultivo impede a ativação do metabolismo autotrófico dos tecidos, sendo preciso adicionar ao meio de cultivo fontes de carbono como a sacarose, mudando o potencial osmótico e, portanto, a absorção de nutrientes do meio. Assim, às vitroplantas são forçadas a se desenvolver sob condições heterotróficas ou fotomixotróficas, modificando ao mesmo tempo seu metabolismo, influenciando na produção de cumarinas, flavonoides, fenóis, taninos condensados, esteroides, terpenos, antocianinas e alcaloides (Woltering, 1990; Kubota, 2001; Kozai e Kubota, 2001; Rodriguez et al. 2008; Arigita et al. 2010; Badr et al. 2011; Ramakrishna e Ravishankar; Mohamed e Ibrahim, 2012; Saldanha et al. 2013).

No entanto, a micropropagação heterotrófica e fotomixotrófica de plantas aumenta o risco de contaminação pela presença de carboidratos e alguns explantes desenvolvem desordens anatômicas e fisiológicas que diminuem sua capacidade fotossintética, gerando baixas taxas de multiplicação e sobrevivência durante a aclimatização (Kozai, 1991). Por outro lado, o uso de carboidratos como a sacarose a níveis baixos (5 a 15 g L⁻¹) no meio de cultivo pode levar ao desenvolvimento de sintomas de necrose e causar hipóxia e acumulação de etanol nas células, o que influencia também na produção de metabólitos secundários (Saher et. 2005; Ramakrishna e Ravishankar, 2011; Yaseen et al. 2013).

Devido às desvantagens que apresenta a cultura de tecidos em condições heterotróficas e fotomixotróficas estão sendo desenvolvidos sistemas fotoautotróficos utilizando meio de cultura isento de açúcar, elevada DFFF (acima de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e presença de CO_2 (por vezes superiores a $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$) mediante ventilação natural ou forçada; o que incrementa o intercâmbio gasoso entre o ambiente interno e externo do frasco, diminuindo a umidade relativa no interior do recipiente, aumentando a taxa fotossintética e estimulando a divisão e a expansão celular dos tecidos. Todavia, elevadas concentrações de CO_2 podem neutralizar o efeito negativo do etileno produzido pelos tecidos fornecendo condições mais favoráveis às plantas (Kozai, 1991; Zobayed et al. 1999; Zobayed et al. 2000).

Sistemas de cultivo *in vitro* em condições fotoautotróficas têm sido utilizados com sucesso em diversas plantas medicinais como *Saccharum officinarum* (Xiao et al. 2003), *Hypericum perforatum* L. (Couceiro et al. 2006), *Dendrobium candidum* (Xiao et al. 2007), *Uniola paniculata* L (Valero-Aracama et al. 2007), *Momordica grosvenori* (Zhang et al. 2009), *Actinidia deliciosa* (Arigita et al. 2010) e *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Iarema et al. 2012; Saldanha et al. 2013). No entanto, seu uso ainda é limitado devido às complexas técnicas de controle do ambiente *in vitro* que são requeridas e aos elevados custos pelo uso de alta DFFF e aos sistemas de enriquecimento de CO_2 (Kozai, 1991; Kubota, 2002).

No caso de *Ruta graveolens* ainda não foi avaliado o efeito da ventilação forçada e o enriquecimento com CO_2 sob condições fotomixotróficas e fotoautotróficas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito de diferentes concentrações de CO_2 sobre o desenvolvimento de brotos, produção de massa fresca e a biossíntese de metabólitos secundários utilizando segmentos nodais de *R. graveolens* cultivados em meio com e sem sacarose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultura

Sementes de *Ruta graveolens* (ISLA PAK, Brasil) com 99% de pureza, foram germinadas sob condições heterotróficas em frascos de vidro de 350 mL de capacidade, contendo 60 mL do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) força total suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar (Merck) e com pH ajustado para 5,8 ± 0,01, , sendo autoclavado a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min.

Os frascos foram vedados com tampa rígida de polipropileno e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h, com irradiância de 31 μmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro (LI-COR®, LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil). As plântulas foram mantidas sob as mesmas condições com subcultivos periódicos a cada 30 dias.

Posteriormente, com base nas metodologias propostas por Bohidar et al. (2008) e Saldanha et al. (2013), segmentos nodais de 2 cm de comprimento, com duas gemas axilares e sem folhas, foram excisados a partir de vitroplantas de 2-3 meses de idade e inoculados em recipientes de 750 mL resultantes da união de duas Magentas de polycarbonato® GA7 (Sigma Chemical Company, EUA) invertidas e unidas por acopladores de polipropileno (Sigma Chemical Company, EUA) (Figura 1A), contendo 60 mL de meio MS força total enriquecido com ácido indol-3-acético (AIA) (0,25 mg L⁻¹), 6-benziladenina (BA) (1 mg L⁻¹), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar, suplementado com duas concentrações diferentes de sacarose (0 e 15 g L⁻¹), com pH ajustado para 5,8 ± 0,01 e autoclavado a 120°C, 1,1 Pa por 20 min.

Para permitir as trocas gasosas dos recipientes com o ambiente externo, a Magenta® superior continha dois orifícios de 10 mm de diâmetro na parte superior (originalmente no fundo) cobertos por membranas (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,45 μm de poro. O número de trocas gasosas foi estimado em 0,36 trocas por hora, segundo Fujiwara e Kozai (1995). Como

controle foram usadas Magentas[®] sem furos para fechar o sistema, impedindo as trocas gasosas entre o ambiente interno e externo dos recipientes.

Os recipientes foram transferidos para duas câmaras de acrílico (41 cm de largura x 26 cm de altura x 50 cm comprimento), equipadas no fundo com um tubo de aço inoxidável com perfurações de 0,8 cm de diâmetro e um ventilador que permitiu a entrada e a homogeneização do ar (Figura 1B).

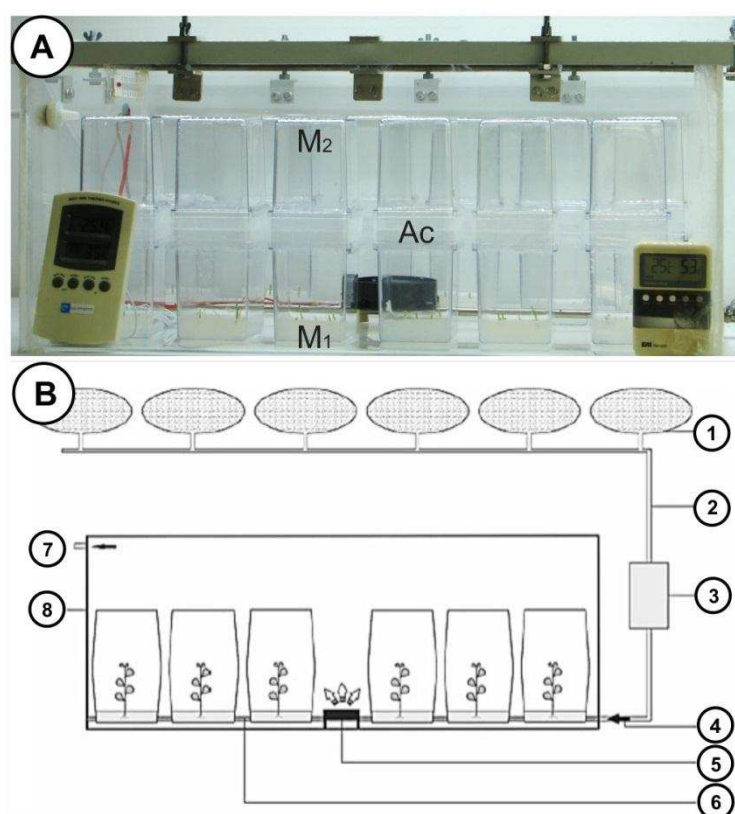


Figura 1. Sistema utilizado para a indução de brotos de *Ruta graveolens* com atmosfera enriquecida com CO₂. **A)** Câmara de acrílico com os recipientes de cultivo; Magentas[®] inferior (M₁) e superior (M₂); Ac: Acoplador. **B)** Componentes do sistema: 1- Reservatórios de ar, 2- Tubos conectores flexíveis para o passo de ar, 3- Homogeneizador com ventilador e bomba de ar, 4- Entrada de ar, 5- Ventilador, 6- Tubo metálico com furos para distribuir o ar dentro da câmara, 7- Saída de ar, 8- Câmara de acrílico (segundo Saldanha et al. 2013).

Uma das câmaras foi alimentada com ar atmosférico a um fluxo de 1 mL min⁻¹, cuja concentração de CO₂ foi de 360 ± 50 µmol mol⁻¹; enquanto que na outra câmara foi injetado ar enriquecido com 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂, obtido mediante a mistura de CO₂ comercial (Air Products Brasil Ltda., Mogi das Cruzes, Brasil) com o ar ambiente, segundo metodologia estabelecida por

Saldanha et al. (2013). A concentração de CO₂ nas câmaras de acrílico foi verificada mediante um analisador de gás no infravermelho modelo S153 (Qubit System, Canadá).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2°C sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 41 µmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro (LI-COR®, LI-250A Light Meter)), fornecida por quatro lâmpadas LED (diodo emissor de luz de 17 W, Vilux®, LLTV03, Brasil), mantendo a umidade relativa no interior das câmaras em 50 ± 10%.

2.2 Análise fitoquímica

2.2.1 Obtenção dos extratos

A massa fresca total foi obtida nos diferentes tratamentos e separada por repetição, sendo imediatamente congelada com nitrogênio líquido e armazenada a -80°C. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas (liofilizador modelo L101 LIOTOP, Liobras, Brasil), pesadas e colocadas em erlenmeyer de 125 mL. Adicionaram-se, então, 15 mL de álcool etílico grau analítico 95 % (v/v) (Vetec) para cada 300 mg de material vegetal; logo após, o conteúdo foi homogeneizado e deixado em agitação constante durante 48 h (mesa agitadora Tecnal®, TE-1401) a 70 rpm.

Em seguida, a suspensão foi filtrada por gravidade e repetiu-se o procedimento de extração utilizando o resíduo obtido. Os filtrados foram combinados e concentrados em sistema de evaporação rotatória (IKA®RV 10 digital, com recirculador Chiller, F-108 e bomba com controlador de vácuo, V700, Suíça) sob pressão reduzida e temperatura de 45 °C. Após a retirada do solvente os extratos foram transferidos para vials de 3 mL de capacidade e armazenados a 8°C.

2.2.2 Prospecção fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos etanólicos obtidos a partir da massa fresca produzida em condições heterotróficas, fotomixotróficas e fotoautotróficas com ventilação forçada de *R. graveolens* foram caracterizados fitoquimicamente por CCD

segundo a metodologia descrita por Wagner e Bladt (2001) e Farnsworth (1966), determinando a presença ou ausência de alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, saponinas, esteroides, triterpenos e compostos antracênicos.

Para esta avaliação foram pesados 1,0 mg da substância padrão e 10 mg do extrato etanólico seco diretamente para frascos de vidro de 5 mL de capacidade adicionando-se 1,0 e 2,0 mL de metanol grau analítico (VETEC), para obter concentrações finais de 1 e 5 mg mL⁻¹, respectivamente. Posteriormente, foram retiradas alíquotas de 2,5 µL da solução padrão e 40 µL do extrato com ajuda de um capilar em cromatoplaças de alumínio recobertas com sílica gel 60 GF₂₅₄ com indicador UV (Merck, Alemanha) de 4 x 5 cm, deixando um espaço de 3 mm entre cada ponto de aplicação.

Na tabela 1 são apresentadas as condições com as quais foi feita a CCD para cada tipo de metabólito secundário avaliado; cada determinação foi realizada em duplicata.

Tabela 1. Condições para a prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de *Ruta graveolens* por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (Wagner e Bladt, 2001; Farnsworth, 1966).

Tipo de metabólito	Sistema de eluentes	Revelador	Cor de referência	Compostos padrão (cor)
Alcaloides	AcOEt:AcOH:MeOH:H ₂ O (10:2:1:2)	Dragendorff ¹	Vermelho-laranja ²	Quinina (laranja)
Cumarinas	BuOH: AcOH: H ₂ O (15:2:3)	KOH ao 5% em EtOH	Fluorescência verde ou azul ³	Umbelliferona (azul-verde)
Compostos antracênicos	BuOH: AcOH: H ₂ O (15:2:3)	KOH ao 5% em EtOH	Vermelho ^{2,3}	Quinona (vermelha)
Flavonoides	BuOH: AcOH: H ₂ O (4:1:5)	AlCl ₃ ao 1% em EtOH ³	Amarelo ^{2,3}	Rutina (amarela ² , laranja ⁴)
Esteróides e triterpenos	AcOEt: PhMe: AcOH (8:4:1)	Anisaldeído/ácido sulfúrico	Amarelo, laranja, verde, azul, café vermelho, rosa ⁴	Colesterol (roxo)
			Verde, vermelho, amarelo e roxo ²	Estigmasterol (azul escuro)
				Limoneno (azul-verde claro)
				Lanosterol (roxo-azul)
Saponinas	AcOEt:AcOH:MeOH:H ₂ O (10,35:2,35:1,35:2,35)	Anisaldeído/ácido sulfúrico	Azul ou roxo-azul, amarelo	<i>Sapindus saponaria</i>

AcOEt: acetato de etila; AcOH: ácido acético; MeOH: metanol; H₂O: água; BuOH: butanol; PhMe: tolueno.

¹ Reagente de Dragendorff: nitrato de bismuto + ácido acético + iodeto de potássio (Wagner e Bladt, 2001). ² Observações no visível ³ Observações sob luz UV λ : 366 nm.
⁴ Observações sob luz UV λ 254 nm (Farnsworth, 1966).}

Finalmente, as cromatoplasmas foram eluídas em cuba cromatográfica previamente saturada pelo sistema de eluentes específico para cada classe de metabólito secundário, permitindo a separação dos componentes presentes no extrato dependendo de sua polaridade e afinidade com as fases estacionária (cromatoplasma) e móvel (eluente).

2.2.3 Perfil cromatográfico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para o preparo das amostras, foram pesados diretamente em tubos Eppendorf® 20 mg do extrato etanólico seco e solubilizados em 1,25 mL de metanol grau CLAE, obtendo uma solução de 16 mg mL⁻¹. Para homogeneizar a solução as amostras foram agitadas, colocadas no banho de ultrassom, e em seguida centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 min. Posteriormente, foi transferido 0,1 mL do sobrenadante para vials tipo CLAE e adicionou-se 1,5 mL de MeOH grau CLAE, obtendo-se uma solução com concentração final de 1 mg mL⁻¹.

A metodologia usada visando a quantificação de alcaloides por CLAE foi baseada na proposta por Kuzovkina et al. (2004) e Cardoso-Lopes et al. (2010); enquanto que para as cumarinas foram usadas as metodologias reportadas por Massot et al. (2000) e Szopa et al. (2012) com modificações.

A análise foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) marca THERMO equipado com um detector UV/visível ACCELA/PDA. A coluna empregada para a separação foi a C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 μ m). Tanto para alcaloides, como para cumarinas foram injetados 10 μ L de cada amostra de 1 mg mL⁻¹ utilizando o injetor automático ACCELA.

Para a separação dos alcaloides, foi usada a fase móvel composta de acetonitrila/metanol/água (10:45:45), utilizando-se dois comprimentos de ondas: 245 e 275 nm. Para as cumarinas, foi usada uma mistura de dois sistemas, o primeiro (A) acetonitrila/metanol/água (30:30:40) e o segundo (B)

acetonitrila/metanol (50:50), com proporções de A/B de 50:50; os comprimentos de onda foram 254 e 310 nm. O fluxo foi de 0,6 mL min⁻¹ e o tempo de corrida de 30 minutos, para ambos os casos.

2.3 Avaliações e análises estatísticas

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo bifatorial (2x3), composto por dois meios de cultivo diferentes (meio MS sem sacarose ou com 15 g L⁻¹ de sacarose) e três ambientes de incubação, atmosfera com concentração normal de CO₂ (360 ± 50 µmol mol⁻¹) ou enriquecida com 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂, além do controle utilizando recipientes fechados impedindo a troca gasosa com o ambiente externo.

Doze recipientes de cultivo foram distribuídos ao acaso em cada uma das duas câmaras de acrílico: seis recipientes contendo meio MS sem sacarose (quatro com duas membranas e dois sem membranas) e seis com 15 g L⁻¹ de sacarose (quatro com duas membranas e dois sem membranas), totalizando seis tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Tratamentos avaliados para a indução de brotos de *R. graveolens* em condições heterotróficas, fotomixotróficas e fotoautotróficas.

Tratamento	Sacarose (g L ⁻¹)	CO ₂ (µmol mol ⁻¹)	Membranas	Tipo de cultura
0S-SM*	0	0	0	Fotoautotrófica
15S-SM*	15	0	0	Fotoheterotrófica
0S-AN	0	360	2	Fotoautotrófica
15S-AN	15	360	2	Fotomixotrófica
0S-E.CO₂	0	1000	2	Fotoautotrófica
15S-E.CO₂	15	1000	2	Fotomixotrófica

S: Sacarose; **SM:** Sem membrana; **AN:** Ambiente normal; **E.CO₂:** Ambiente enriquecido com CO₂ comercial; *Controle

O experimento foi realizado em blocos, com oito repetições constituídas por magentas, cada uma com cinco explantes como unidade experimental. Após 40 dias de cultivo, foram determinadas as médias da massa fresca (mMF) e o número de brotos obtidos por cada repetição. Além disso, foi determinada a porcentagem de calos formados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

Para a porcentagem de calo, a ANOVA foi realizada após transformação dos dados em arco seno $x^{0,5}$. Para a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizado o teste de Scott e Knott a 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico Genes versão Windows/2011.9.0 (Cruz, 2013).

A prospecção fitoquímica foi constituída pelo componente qualitativo para determinar a presença ou ausência das diferentes classes de metabólitos secundários nos extratos etanólicos de *R. graveolens* mediante a CCD, realizando duas repetições para cada teste fitoquímico.

3. RESULTADOS

3.1 Material vegetal e condições de cultura

Após 40 dias de cultivo, foram observadas diferenças significativas na produção de biomassa de *R. graveolens* entre os tratamentos avaliados, apresentando-se maior proliferação e desenvolvimento de brotos em condições heterotróficas e fotomixotróficas, com 15 g L⁻¹ de sacarose (Figura 2D – 2F e 2J – 2L), obtendo de 11 a 17 brotos por explante, acompanhado pela formação de calo em diferentes proporções (Tabela 3). Enquanto que em condições fotoautotróficas (meios sem sacarose) foram formados de 2 a 3 brotos por explante, com pouco desenvolvimento, caracterizado pelo comprimento reduzido e o baixo número de folhas (Figura 2A – 2C e 2G – 2I).

Tabela 3. Médias de características avaliadas após 40 dias de cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Ruta graveolens*.

Tratamento	Massa fresca (g)	Nº de brotos	Calogênese (%)
0S-SM	0,3391 c	2 c	<5 c
15S-SM	17,4955 a	17 a	> 25 a
0S-AN	0,4479 c	3 c	<5 c
15S-AN	12,3919 b	13 b	6 - 25 b
0S-E.CO₂	0,2323 c	2 c	<5 c
15S-E.CO₂	10,5493 b	11 b	6 - 25 b

Letras iguais na horizontal representam grupos estatisticamente semelhantes (teste de Scott e Knott a 5% de significância). **0S-SM**: ausência de sacarose, sem membrana; **15S-SM**: sacarose (15 g L⁻¹), sem membrana; **0S-AN**: ausência de sacarose, CO₂ (360 µmol mol⁻¹); **15S-AN**: Sacarose (15 g L⁻¹), CO₂ (360 µmol mol⁻¹); **0S-E.CO₂**: ausência de sacarose, CO₂ (1000 µmol mol⁻¹); **15S-E.CO₂**: Sacarose (15 g L⁻¹), CO₂ (1000 µmol mol⁻¹)

Ao comparar os três tipos de ambiente em que foram cultivados os explantes (recipientes sem membranas, ventilação forçada e ambiente enriquecido com 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂), houve maior produção de massa fresca (MF) e de indução de brotos nos recipientes sem membrana (condições fotoheterotróficas) (Figura 2D e 2J), sendo o tratamento 15S-SM (15 g L⁻¹ de sacarose) o mais efetivo, atingindo teores de 17,4955 g de MF e até 17 brotos por explante (Tabela 3). No entanto, sob estas condições de cultivo apresentou-se maior porcentagem de calogênese (superior a 25%) e os brotos apresentaram hiperidricidade e algumas anomalias morfológicas, como folhas extremadamente grandes (Figura 2J); similar ao observado nos brotos obtidos no tratamento 15S-AN (condições fotomixotróficas) (Figura 2K).

Embora, a atmosfera enriquecida com $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 não ter estimulado significativamente a produção de biomassa de *R. graveolens* em presença de sacarose (15S-E. CO_2), os brotos apresentaram melhor desenvolvimento, com caules mais compridos, folhas bem definidas e sem hiperidricidade (Figuras 2F e 2L).

3.2 Análise fitoquímica

3.2.1 Obtenção dos extratos

Foram obtidos os extratos etanólicos da massa fresca produzida em cada uma das repetições dos tratamentos avaliados (0S-SM, 15S-SM, 0S-AN, 15S-AN, 0S-E. CO_2 , 15S-E. CO_2), os quais apresentaram consistência viscosa e colorações verde, marrom e café, possivelmente devido à presença de pigmentos clorofilianos (clorofila a, b e carotenoides). Além disso, todos os extratos foram parcialmente solúveis em água, etanol, clorofórmio e hexano, indicando a presença de compostos de polaridade e natureza diferentes.

3.2.2 Perfil cromatográfico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Inicialmente por meio da CCD foi confirmada a presença de alcaloides em todos os extratos obtidos. Logo após foram selecionados ao acaso um extrato por cada tratamento para determinar a abundância de alcaloides e a presença de outros tipos de metabólitos secundários, cujos resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Prospecção fitoquímica de extratos etanólicos de tecidos *in vitro* de *Ruta graveolens* cultivados em condições fotoheterotróficas, fotomixotróficas e fotoautotróficas, mediante cromatografia em camada delgada (CCD).

Tipo de metabólito secundário	Extrato					
	0S-SM	15S-SM	0S-AN	15S-AN	0S-E. CO_2	15S-E. CO_2
Alcaloides	+++	+	++	+	+	+
Cumarinas	+	+	+	+	+	+
Compostos antracênicos	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Saponinas	++	++	+	+	+	++
Isoflavonas	+++	+++	+++	+++	++	+++
Catequinas	+++	+++	++	+++	++	++
Flavononas	++	++	+++	+++	+	+++
Chalconas- Auronas	++	++	++	++	++	++
Esteroides e triterpenos	+++	++	++	+++	+	++

0S-SM: ausência de sacarose, sem membrana; **15S-SM:** sacarose (15 g L⁻¹), sem membrana; **0S-AN:** ausência de sacarose, CO₂ (360 µmol mol⁻¹); **15S-AN:** sacarose (15 g L⁻¹), CO₂ (360 µmol mol⁻¹); **0S-E.CO₂:** ausência de sacarose, CO₂ (1000 µmol mol⁻¹); **15S-E.CO₂:** Sacarose (15 g L⁻¹), CO₂ (1000 µmol mol⁻¹). (-): Ausência; (+): Presença moderada; (++) Presença intermedia; (+++): Presença abundante.

Houve maior abundância de alcaloides nos tecidos cultivados sem sacarose, tanto em recipientes sem membranas (0S-SM) como com 360 µmol mol⁻¹ de CO₂ (0S-AN). Enquanto que em todos os extratos avaliados foi verificada a presença moderada de cumarinas e abundante de compostos antracênicos do tipo antronas e antranolas.

Além disso, foram detectadas saponinas com níveis intermediários em condições fotoautotróficas (tratamento 0S-SM), fotoheterotróficas (15S-SM) e fotomixotróficas (15S-E.CO₂); esteróides e triterpenos, principalmente em 0S-SM e 15S-AN (com sacarose e 360 µmol mol⁻¹ de CO₂). Enquanto que todos os extratos apresentaram flavonoides tipo isoflavonas, catequinas, flavononas, chalconas e auronas; sendo mais abundantes no tratamento 15S-AN e com menor presença em 0S-E.CO₂ (condições fotoautotróficas).

3.2.3 Perfil cromatográfico dos extratos (por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE))

3.2.3.1 Perfil cromatográfico de alcaloides

Ao comparar os cromatogramas no comprimento de onda de 275 nm para a quantificação de alcaloides dos extratos etanólicos dos brotos de *R. graveolens* produzidos sob condições fotoheterotróficas (15S-SM), fotomixotróficas (15S-AN e 15S-E.CO₂) e fotoautotróficas (0S-SM, 0S-AN e 0S-E.CO₂), foram detectados em todas as amostras picos majoritários em tempos de retenção (Tr) de 3,1 – 3,2; 3,3; 4,3; 4,8; 8,9 e 15,6 minutos (Tabela 5).

O tratamento 15S-SM foi o que apresentou maior conteúdo e quantidade dos compostos detectados. Os produzidos em maior abundância foram aqueles com Tr de 5,1; 8,9 e 15,6 min (Figura 3).

Tabela 5. Áreas e tempos de retenção de alguns dos compostos detectados por CLAE durante o análise para quantificação de alcaloides em brotos de *R. graveolens*.

Pico N°	Tr (min)	Área do pico por tratamento					
		0S-SM	15S-SM	0S-AN	15S-AN	0S-E.CO ₂	15S-E.CO ₂
1	3,1	536582	681439	-	498708	874013	561423
2	3,2	-	-	1461869	-	-	-
3	3,3	1224504	835828	-	469596	-	468660
4	4,3	563771	707685	408698	459391	431827	434781
5	4,8	1185297	-	682109	-	357368	-
6	5,1	-	1447637	-	1447070	524783	1025112
7	8,9	813040	1485718	401126	543352	574739	1037757
8	10,8	254027	459835	218102	17411	161252	301678
9	11,4	242763	369764	152430	127094	159634	242865
10	13,2	40274	195892	41076	115854	-	138521
11	15,6	720820	1153239	430155	290474	635179	913065

Tr: tempo de retenção; **0S-SM**: ausência de sacarose, sem membrana; **15S-SM**: sacarose (15 g L⁻¹), sem membrana; **0S-AN**: ausência de sacarose, CO₂ (360 µmol mol⁻¹); **15S-AN**: Sacarose (15 g L⁻¹), CO₂ (360 µmol mol⁻¹); **0S-E.CO₂**: ausência de sacarose, CO₂ (1000 µmol mol⁻¹); **15S-E.CO₂**: Sacarose (15 g L⁻¹), CO₂ (1000 µmol mol⁻¹).

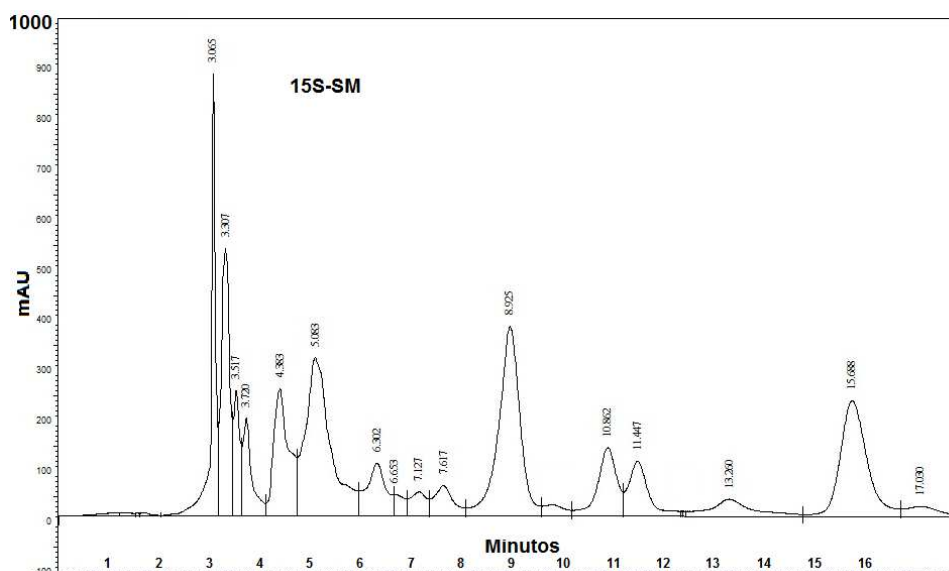


Figura 3. Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de alcaloides de extratos etanólicos de brotos de *R. graveolens*. Detector UV/visível a 275 nm, coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm), fase móvel: acetonitrila:metanol:água (10:45:45), fluxo 0,6 mL min⁻¹ e tempo de corrida 30 min. **15S-SM**: sacarose (15 g L⁻¹), sem membrana.

3.2.3.2 Perfil cromatográfico de cumarinas

Quanto ao perfil cromatográfico das amostras utilizando a metodologia para a quantificação de cumarinas, em todas as amostras foram obtidos picos majoritários com Tr aproximados de 3,3; 3,5; 4,3; 5,2 e 5,5 minutos (Tabela 6). O tratamento 15S-SM (Figura 4) foi o que maior conteúdo de metabólitos

apresentou, seguido dos tratamentos 0S-SM e 15S-E.CO₂. Sendo os compostos mais concentrados os correspondentes aos picos com Tr de 4,3; 5,2 e 5,5 min (Tabela 6).

Tabela 6. Áreas e tempos de retenção de alguns dos compostos detectados por CLAE durante o análise para quantificação de cumarinas em brotos de *R. graveolens*.

Pico N°	Tr (min)	Área do pico por tratamento					
		0S-SM	15S-SM	0S-AN	15S-AN	0S-E.CO ₂	15S-E.CO ₂
1	3,2	922421	879617	-	723494	600598	849240
2	3,5	456717	577398	329430	238661	293327	236851
3	4,3	5323809	6300868	3679704	4331801	4027880	4726249
4	5,2	1050395	1404521	520841	361340	755229	959196
5	5,5	1367262	1675393	947889	492107	1002834	1182406
6	5,9	462021	623005	161231	159371	316580	494970
7	6,4	115165	172976	81116	86519	50470	148661
8	6,7	82106	179694	52747	75723	71887	271361
9	7,4	96931	368658	86930	51455	70457	158797
10	8,3	231120	368658	226975	84761	155242	365461

Tr: tempo de retenção; **0S-SM**: ausência de sacarose, sem membrana; **15S-SM**: sacarose (15 g L⁻¹), sem membrana; **0S-AN**: ausência de sacarose, CO₂ (360 µmol mol⁻¹); **15S-AN**: Sacarose (15 g L⁻¹), CO₂ (360 µmol mol⁻¹); **0S-E.CO₂**: ausência de sacarose, CO₂ (1000 µmol mol⁻¹); **15S-E.CO₂**: Sacarose (15 g L⁻¹), CO₂ (1000 µmol mol⁻¹).

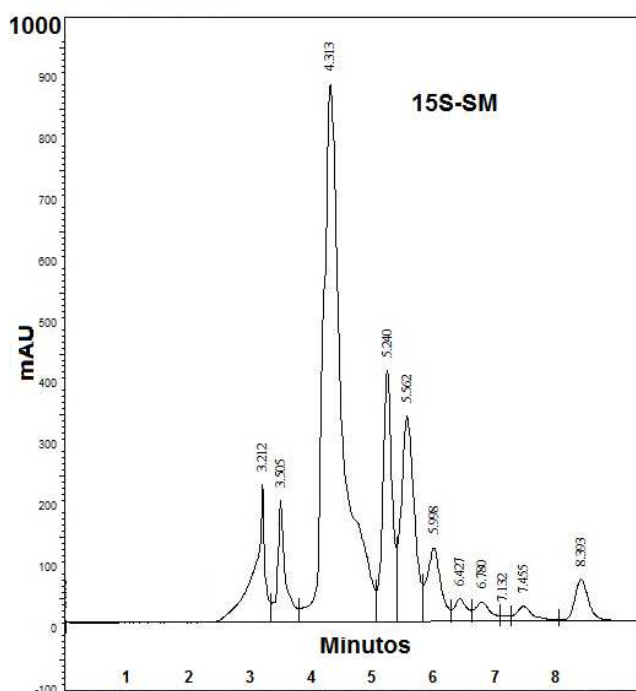


Figura 4. Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de cumarinas de extratos etanólicos de calos e brotos de *R. graveolens*. Detector UV/visível a 310 nm, coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm), fase móvel: (A) acetonitrila/metanol/água (30:30:40) e (B) acetonitrila/metanol (50:50), com proporções de A/B de 50:50, fluxo 0,6 mL min⁻¹ e tempo de corrida 30 min. **15S-SM**: sacarose (15 g L⁻¹), sem membrana.

4. DISCUSSÃO

4.1A produção de biomassa a partir de segmentos nodais de *R. graveolens* foi estimulada sob condições fotoheterotróficas e fotomixotróficas

Em este trabalho, a produção de massa fresca e a indução de brotos de *R. graveolens* foram mais estimuladas nos meios de cultura que continham sacarose, tanto em condições fotoheterotróficas (recipientes sem membrana, 15S-SM), como fotomixotróficas (15S-AN e 15S-E.CO₂). O qual concorda com o reportado por Bohidar et al. (2008), quanto à indução de brotos de *R. graveolens* em meio MS suplementado com BA (1 mg L⁻¹) e AIA (0,25 mg L⁻¹) em condições fotomixotróficas.

Ao igual que em *R. graveolens*, em mudas de três cultivares de batata foi necessária a presença de sacarose para o desenvolvimento de brotos e foi induzida maior quantidade de massa fresca sob condições fotomixotróficas em comparação com as cultivadas fotoautotroficamente (Rahman e Alsadon, 2007). Por outro lado, o acúmulo de biomassa em *Cydonia oblonga* Mill., também foi estimulado pela presença de sacarose no meio, tanto em recipientes fechados como com ventilação natural (Mingozzi et al. 2011).

No presente estudo, a maior produção de biomassa de *R. graveolens* ocorreu quando os explantes foram cultivados em recipientes fechados, contrario ao estabelecido por Mohamed e Ibrahim (2012), em que a indução de brotos de *R. graveolens* foi mais eficiente utilizando sistemas de ventilação que permitiram aumentar os níveis de trocas gasosas dentro do recipiente de cultivo.

Possivelmente às altas trocas gasosas dos tratamentos 15S-AN e 15S-E.CO₂ geradas pela presença de duas membranas nos recipientes de cultivo, levaram à rápida dessecação do meio de cultivo induzindo estresse hídrico, estimulando a síntese e/ou acúmulo de compostos que diminuíram a produção de biomassa nos tecidos de *R. graveolens*, como o ácido abscísico (ABA), hormônio chave na mediação da resposta das plantas a dito tipo de estresse (Mills et al. 2004). Ainda, de acordo com Lai et al. (2005), o sistema de

ventilação utilizado estimulou a rápida desidratação do meio de cultura, alterando suas propriedades físicas e reduzindo a disponibilidade de alguns dos nutrientes afetando o desenvolvimento de brotos de *R. graveolens*.

Resultados similares aos obtidos para *R. graveolens*, foram reportados por Pinheiro et al. (2013) para oliveira (*Olea europaea*), cultivar 'Maria da Fé', a qual produziu maior número de gemas em condições fotoheterotróficas (em tubos de vidro com tampas rígidas sem membrana) quando comparadas às fotomixotróficas; os autores indicaram que possivelmente o acúmulo de altas concentrações de etileno nos recipientes fechados foi benéfico para o desenvolvimento da espécie.

É provável que para a indução de brotos de *R. graveolens* também sejam necessárias determinadas quantidades de etileno nos recipientes de cultivo. No entanto, seria necessário realizar outro tipo de estudos para estabelecer até que ponto o etileno beneficia a produção de biomassa de *R. graveolens*, já que tem sido demonstrado que o etileno apresenta diferentes efeitos em diversas plantas medicinais. Podendo estimular a formação de calo e inibindo a produção de brotos em *Capsicum annuum* L., *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) e *Lavandula officinalis* Chaix x *Lavandula latifolia* Villars; ou aumentando as brotações de *Chychorium Intybus* e *Digitalis obscura* (Batista et al. 2013; Chi et al. 1991; Biddington, 1992; Panizza et al. 1997; Kumar et al. 1998).

Embora, a maior quantidade de massa fresca e de brotos por explante tenham ocorrido em condições heterotróficas (tratamento 15SM), os brotos de *R. graveolens* induzidos apresentaram hiperidricidade; uma das desordens morfológicas e fisiológicas mais frequentes em tecidos cultivados *in vitro* que diminui sua qualidade e que pode levar ao aumento na massa fresca quando se têm muitos brotos com característica hiperídrica (Hazarika, 2006; Bairu et al. 2007). Essa desordem é caracterizada pela formação de brotos com folhas quebradiças e translúcidas pelo alto nível de água nas células, pecíolos alongados, clorose e necrose foliar, dificultando a troca gasosa entre os tecidos com o ambiente gerando hipoxia e diminuindo a capacidade dos brotos para se

adequar as condições *ex vitro* (van den Dries et al. 2013; Ivanova e Van Staden, 2010).

A hiperidricidade nos brotos de *R. graveolens* foi menos evidente à medida que aumentou a concentração de CO₂ dentro das câmaras de cultivo, sendo completamente controlada sob atmosfera enriquecida com 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂ (15SM-E.CO₂). Isto, devido a que o uso de recipientes com membranas e a ventilação forçada aumentaram consideravelmente as trocas gasosas entre os ambientes interno e externo dos recipientes de cultivo, diminuiu a porcentagem de umidade relativa no seu interior (Kozai, 1991; Zobayed et al. 2000; van den Dries et al. 2013).

Porém, ao igual que a hiperidricidade, o número de brotos de *R. graveolens* decresceu com o aumento do nível de CO₂. Respostas similares foram obtidas por Lai et al. (2005) em culturas *in vitro* da planta medicinal *Scrophularia yoshimurae*, nas que o número de brotos e a hiperidricidade diminuíram ao aumentar a ventilação do meio de cultura.

No presente estudo, os segmentos nodais de *R. graveolens* utilizados como explantes não tiveram potencial fotoautotrófico, uma vez que uma fonte de carbono foi requerida para seu desenvolvimento e a inclusão de CO₂ não alterou significativamente a produção de biomassa. Contrário do reportado para várias espécies vegetais como *Ipomoea batatas* L., *Solanum tuberosum*, *Eucalyptus camaldulensis* L., *Coffea arabusta*, *Dendrobium candidum*, *Hypericum perforatum* L., *Pfaffia glomerata* e *Lilium*, cujo desenvolvimento foi maior sob condições fotoautotróficas (Zobayed et al. 1999; Zobayed et al. 2000; Nguyen et al. 2001; Mei-Lan et al. 2003; Couceiro et al. 2006; Xiao et al. 2007; Badr et al. 2011; Iarema et al. 2012; Saldanha et al. 2013).

A baixa resposta dos segmentos nodais de *R. graveolens* quando cultivados em condições fotoautotróficas, poderia ter sido influenciada pela densidade de fluxo de fótons fotossintético (DFFF) utilizada (41 µmol m⁻² s⁻¹), não sendo suficiente para induzir a produção de brotos; de acordo com Xiao et al. (2011), a remoção de açúcar do meio de cultura sem incrementar a DFFF (essencial para melhorar a eficiência do método de ventilação e o sucesso da

fotoautotrofia) ou a concentração de CO₂ aos níveis adequados, não promove o crescimento *in vitro* de algumas espécies vegetais.

Em adição, em diversos trabalhos em que relataram a eficiência das condições fotoautotróficas com atmosfera enriquecida com CO₂, é utilizada alta DFFF (superior a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Kozai, 1991; Zobayed et al. 1999; Zobayed et al. 2000; Kozai e Kubota, 2001; Mei-Lan et al. 2003; Mills, 2009). Por exemplo, plântulas de *Momordica grosvenori* apresentaram maior desenvolvimento e formação de raízes sob condições fotoautotróficas quando foi utilizada DFFF de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguida da DFFF de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; enquanto que com 25 e 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a resposta no meio livre de sacarose foi baixa (Zhang et al. 2009).

Todavia, baixa DFFF (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pode ser suficiente para ativar a fotoautotrofia em outras espécies, como *Oplopanax elatus* (Park et al. 2011). Além disso, quando são usados sistemas de ventilação, a velocidade de circulação de ar também pode ser um fator decisivo para o desenvolvimento dos tecidos (Hazarika, 2006).

Por outro lado, a transferência dos segmentos nodais excisados das plântulas de *R. graveolens* cultivadas em condições fotoheterotróficas (com 30 g L⁻¹ de sacarose) diretamente para meios isentos de carboidratos, poderia ter impedido a ativação do metabolismo autotrófico dos tecidos e pelo tanto a fixação do CO₂ disponível nas câmaras de cultivo. Levando em consideração que Leclerc e Creche (1991) estabeleceram que brotos de *R. graveolens* cultivados fotomixotroficamente ativaram seu metabolismo fotoautotrófico de forma gradual, absorvendo o CO₂ que estava sendo injetado na atmosfera e iniciando a síntese das enzimas envolvidas na fixação do CO₂ atmosférico, enquanto começaram-se a esgotar os carboidratos disponíveis no meio de cultura.

Além disso, tem sido demonstrado que plântulas *in vitro* de algumas espécies vegetais como *Actinidia deliciosa*, mantidas sob condições fotoheterotróficas ou fotomixotróficas, precisam passar por um período de transição diminuindo gradualmente a concentração de carboidratos no meio de

cultura, antes de ser cultivadas autotróficamente com enriquecimento de CO₂, para melhorar a absorção de nutrientes como NO₃⁻, PO₄⁻³ e Mg⁺² e estimular a adaptação às novas condições de cultivo (Arigita et al. 2010).

Tem sido estabelecido por outros autores que variações na concentração de sacarose no meio de cultivo podem estimular ou inibir a atividade de enzimas como a fosfoenolpiruvato carboxilase, importante para a fixação de CO₂ durante a micropropagação de plantas como *Fragaria x ananassa* Duch. Cv Kent e *Solanum tuberosum* L. cv. Kennebec (Hdide e Desjardins, 1994; Sima et al. 2001a; Sima et al. 2001b). No caso dos explantes de *R. graveolens* cultivados em 15 g L⁻¹ de sacarose (tratamentos 15S-AN e 15S-E.CO₂), é provável que após 40 dias de cultivo ainda estivessem consumindo sacarose do meio e não tenham começado a produzir as enzimas envolvidas na fixação eficientemente do CO₂ fornecido pela ventilação natural e forçada, já que não foram observadas diferenças significativas entre estes ambientes na produção de brotos.

4.2 As diferentes condições de cultivo avaliadas influenciaram na produção de metabólitos secundários

As diferentes classes de compostos detectados como alcaloides, cumarinas, flavonoides, esteróis, esteroides e triterpenos, mediante as análises por cromatografia em camada delgada (CCD), nos brotos obtidos de *R. graveolens*, tem sido reportados por vários autores tanto em plantas adultas cultivadas em condições *ex vitro*, como em tecidos mantidos *in vitro*. Entre os que se destacam esteróis, esteróides, aminas, fenóis, taninos, cumarinas, proteínas, aminoácidos, carboidratos, resinas, lipídeos, mucilagem, metilcetonas e glicosídeos (Nazish et al. 2009; de Bona et al. 2013); sendo as furanocumarinas, flavonoides e alcaloides os metabólitos de maior interesse comercial (Milesi et al. 2001; Wu et al. 2003; Hamad, 2012).

Em este trabalho, as condições fotoheterotróficas, fotomixotróficas e fotoautotróficas, estimularam de forma similar à produção de metabólitos secundários como cumarinas, compostos antracênicos, chalconas e auronas nos brotos de *R. graveolens*. No entanto, tratamentos como 0S-SM e 15S-AN

apresentaram maior abundância de várias das classes de compostos analisados por CCD, como alguns tipos de flavonoides, alcaloides, esteróis, esteroides e triterpenos, indicando que a biossíntese de estes metabólitos foi mais afetada pelas diferentes condições de cultivo avaliadas.

Estes resultados concordam com o estabelecido por Mohamed e Ibrahim (2012), em que a síntese de cumarinas e flavonoides em brotos de *R. graveolens* dependeu da fonte de carbono, da pressão osmótica do meio e das condições de ventilação. Por outro lado, espécies vegetais como *Gerbera jamesonii*, *Rosa* sp., *Solanum tuberosum* e *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, micropropagadas em condições fotoautotróficas e/ou fotomixotróficas, têm apresentado diferentes conteúdos de metabólitos como fenóis, taninos condensados, esteroides e terpenos, devido à influência do CO₂ sobre os tecidos e ao estresse osmótico gerado pela presença de sacarose no meio (Woltering, 1990; Badr et al. 2011; Ramakrishna e Ravishankar, 2011; Iarema et al. 2012; Saldanha et al. 2013).

Todavia, Rao e Ravishankar (2002) afirmaram que altos níveis de trocas gasosas diminuem a biossíntese de alcaloides, o CO₂ estimula a produção de monoterpenos e diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura poderia afetar a produção de antocianinas e alcaloides do tipo indólico e da benzofenantridina. No caso de *R. graveolens*, por meio das análises de CCD, observou-se que houve menor abundância de terpenos e maior conteúdo de flavononas nos brotos cultivados sob concentrações superiores de CO₂; enquanto que a ausência de sacarose no meio de cultura estimulou a síntese de alcaloides.

Além disso, tem sido reportado que o estresse osmótico criado pela adição de sacarose ao meio de cultivo regula a produção de antocianinas e saponinas em tecidos cultivados *in vitro* (Ramakrishna e Ravishankar, 2011); porém, nos resultados obtidos neste trabalho, a síntese de saponinas nos brotos de *R. graveolens* foi mais influenciada pelo nível de trocas gasosas e não pela presença ou ausência de sacarose no meio.

Comparando os extratos etanólicos dos brotos de *R. graveolens* cultivados nos tratamentos 15S-SM e 15S-AN, os quais apresentaram hiperidricidade, com os do tratamento 15S-E.CO, com desenvolvimento normal, foram observadas diferenças no conteúdo de catequinas, flavononas e terpenóides; possivelmente devido a que brotos hiperídricos desenvolvem de forma distinta varias das rotas biossintéticas de metabólitos secundários.

Assim, tecidos hiperídricos podem apresentar estresse oxidativo (afeita à respiração mitocondrial reduzindo os níveis de ATP, necessário para a fixação do carbono), alterações da atividade enzimática da glucose-6-fosfato desidrogenase (regula a formação do NADPH), da piruvato descarboxilase e da álcool desidrogenase (involucradas no metabolismo fermentativo, que origina o etileno) (Saher et. 2005). Variações na concentração do ATP e do NADPH pode alterar as rotas de biossínteses onde eles participam, influenciando na produção de lipídeos, terpenóides, aminoácidos, proteínas, alcaloides, antocianinas, flavonoides, lignina, taninos, quinonas, dentre outros; enquanto que o estresse oxidativo pode induzir a produção de compostos fenólicos, como flavonoides (Cseke et al. 2006)

Segundo as análises por CCD, houve maior abundancia de alcaloides nos tratamentos 0S-SM e 0S-AN; porém, no perfil cromatográfico das amostras, obtido por CLAE com a metodologia estabelecida para quantificar alcaloides, observou-se maior conteúdo dos compostos detectados no tratamento 15S-SM. Possivelmente, alguns desses compostos não são realmente alcaloides, e foram detectados por apresentar caraterísticas similares, como por exemplo, a absorção na faixa do comprimento de onda utilizado para identificar os alcaloides objeto de estudo. Pelo tanto, ainda é necessário identificar quais desses picos são os alcaloides de interesse e completar sua quantificação para estabelecer quais condições de cultura estimularam a produção de compostos alcaloidais.

5. CONCLUSÕES

A indução e o desenvolvimento de brotos de *R. graveolens* foi maior sob condições fotoheterotróficas; enquanto que a ventilação forçada e o enriquecimento de CO₂ no cultivo fotomixotrófico não influenciaram na produção de biomassa, mas sim na qualidade dos tecidos, reduzindo a hiperidricidade dos brotos.

Os segmentos nodais de *R. graveolens* utilizados como explantes não apresentaram capacidade autotrófica, uma vez que a presença de sacarose no meio de cultivo foi necessária para a indução de brotos.

Não foram observadas mudanças significativas na produção de metabólitos secundários nos diferentes tratamentos avaliados pela análise de cromatografia em camada delgada. Porém, segundo o perfil cromatográfico obtido das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o tratamento 15S-SM foi o que apresentou maior conteúdo dos compostos detectados; no entanto requerem-se estudos posteriores para completar a análise por CLAE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arigita L.; Cañal M.J.; Tamés R.S.; González A. 2010. CO₂-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the *in vitro* culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 46: 312 - 322.

Badr A.; Angers P.; Desjardins Y. 2011. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 107: 13 - 24.

Bairu M.W.; Stirk W.A.; Doležal K.; Van Staden J. 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin?. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 90: 15 - 23.

Batista, D.S.; Dias, L.L.C., Macedo, A.F.; Rêgo, M.M., Rêgo, E.R.; Floh, E.I.S.; Finger F.L.; Otoni, W.C. 2013. Suppression of ethylene levels promotes morphogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 49: 759 - 764.

Biddington N.L. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation** 11: 173 – 187.

Bohidar S.; Thirunavoukkarasu M.; Rao T.V. 2008. Effect of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation of 'garden rue' (*Ruta graveolens* L.). **International Journal of Integrative Biology** 3: 36 - 43.

Cardoso-Lopes E.M.; Maier J.A.; da Silva M.R.; Regasini L.O.; Simote S.Y.; Lopes N.P.; Pirani J.R.; Bolzani V. da S.; Young M.C.M. 2010. Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. **Molecules** 15: 9205 - 9213.

Chi G-L.; Pua E-C.; Goh C-J. 1991. Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) olsson *in vitro*. **Plant Physiology** 96: 178 - 183.

Couceiro M.A.; Afreen F.; Zobayed S.M.A.; Kozai T. 2006. Enhanced growth and quality of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 42: 278 - 282.

Cruz C.D. 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum, Agronomy** 35: 271 - 276.

Cseke L.J.; Lu C.R.; Kornfeld A.; Kaufman P.B.; Kirakosyan A. 2006. How and Why These Compounds Are Synthesized by Plants. In: Cseke L.J.; Kirakosyan A.; Kaufman P.B.; Warber S.L.; Duke J.A.; Brielmann H.L (Eds). Natural

products from plantas. 2^{da} Ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 51 – 100.

De Bona E.A.M.; Pinto F.G.S.; Borges A.M.C.; Scur M.C.; Fruet T.K.; Weber L.D.; Alves L.F.A.; De Moura A.C. 2013. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente a sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde** 15: 41 - 46.

Farnsworth N.R. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Science** 55: 225 - 276

Fujiwara K.; Kira S.; Kozai T. 1995. Contribution of photosynthesis to dry weight increase of *in vitro* potato cultures under different CO₂ concentrations. **Acta Horticulturae** 393: 119 - 126.

Hamad M.N. 2012. Isolation of rutin from *Ruta graveolens* (Rutaceae) cultivated in Iraq by precipitation and fractional solubilization. **Pharmacie Globale International Journal of Comprehensive** 3: 1 - 3.

Iarema L.; da Cruz A.C.F.; Saldanha C.W.; Dias L.L.C.; Vieira R.F.; de Oliveira E.J.; Otoni W.C. 2012. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 110: 227 - 238.

Ivanova M.; Van Staden J. 2010. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulation** 60: 143 - 150.

Kozai T. 1991. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** 27P: 47 - 51.

Kozai T.; Kubota C. 2001. Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants. **Journal of Plant Research** 114: 525 - 537.

Kubota C. 2001. Concepts and background of photoautotrophic micropropagation. In: Morohoshi N.; Komamine A (Eds). Molecular Breeding of Woody Plants. Elsevier Science B.V., 325 - 334.

Kubota C. 2002. Photoautotrophic micropropagation: importance of controlled environment in plant tissue culture[©]. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society** 52: 609 - 613.

Kumar P.P.; Lakshmanan P.; Thorpe T. 1998. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 34: 94 - 103.

Lai C.C.; Lin H.M.; Nalawade S.M.; Fang W.; Tsay H.S. 2005. Hyperhydricity in shoot culture of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. **Journal of Plant Physiology** 162: 355 - 361.

Leclerc J.C.; Creche J. 1991. Photoautotrophy Established in multiple-shoot cultures of *Ruta graveolens*. **Biologia Plantarum** 33: 135 - 144.

Massot B.; Milesi S.; Gontier E.; Bourgaud F.; Guckert A. 2000. Optimized cultural conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 62: 11 - 19.

Mei-Lan L.; Murthy H.N.; Kee-Yoeup P. 2003. Photoautotrophic culture conditions and photosynthetic photon flux influence growth of *Lilium* bulblets *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 39: 532 - 535.

Milesi S.; Massot B.; Gontier E.; Bourgaud F.; Guckert A. 2001. *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. **Plant Science** 161: 189 – 199

Mills D. 2009. Effect of sucrose application, minerals, and irradiance on the *in vitro* growth of *Cistus incanus* seedlings and plantlets. **Biologia Plantarum** 53: 415 - 421.

Mingozzi M.; Morini S.; Lucchesini M.; Mensuali-sodi A. 2011. Effects of leaf soluble sugars content and net photosynthetic rate of quince donor shoots on subsequent morphogenesis in leaf explants. **Biologia plantarum** 55: 237 - 242.

Mohamed M.A.; Ibrahim T.A. 2012. Enhanced *in vitro* production of *Ruta graveolens* L. coumarins and rutin by manitol and ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 111: 335 – 343.

Murashige T.; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473 – 497.

Nazish I.; Kaskoos R.A.; Mir S.R.; Amin S.; Ali M. 2009. Preliminary pharmacognostical standardisation of *Ruta graveolens* L. aerial parts. **Research Journal of Medicinal Plants** 3: 41 - 44.

Nguyen Q.T.; Kozai T.; Heo J.; Thai D.X. 2001. Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 66: 217 - 225.

Park S.Y.; Moon H.K.; Murthy H.N.; Kim Y.W. 2011. Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. **Biologia Plantarum** 55: 559 - 562.

Panizza M.; Mensuali-Sodi A.; Tognoni F. 1997. Morphological differentiation in callus cultures of lavandin: a role of ethylene. **Biologia Plantarum** 39: 481 - 489.

Pinheiro M.V.M.; Martins F.B.; Xavier A.; Otoni W.C. 2013. Trocas gasosas influenciaram na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore** 37: 19 - 29.

Ramakrishna A.; Ravishankar G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior** 6: 1720 - 1731.

Rahman M.H.; Alsadon A.A. 2007. Photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation of three potato cultivars. **Journal of Bio-Science** 15: 111 - 116.

Rao S.R.; Ravishankar G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances** 20: 101 – 153.

Rodriguez R.; Aragon C.E.; Escalona M.; Gonzalez-Olmedo J.L.; Desjardins Y. 2008. Carbon metabolism in leaves of micropropagated sugarcane during acclimatization phase. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 44: 533 - 539.

Saher S.; Fernández-García N.; Piqueras A.; Hellín E.; Olmos E. 2005. Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured in vitro: a hypoxia stress?. **Plant Physiology and Biochemistry** 43: 573 – 582.

Saldanha C.W.; Otoni C.G.; Notini M.M.; Kuki K.N.; da Cruz A.C.F.; Neto A. R.; Dias L.L.C.; Otoni W.C. 2013. A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 49: 433 - 444.

Sima B.D.; Desjardins Y. 2001a. Sucrose supply enhances phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation level in *in vitro Solanum tuberosum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 67: 235 - 242.

Sima B.D.; Desjardins Y.; Van Quy L. 2001b. Sucrose enhances phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro Solanum tuberosum* L. under non-limiting nitrogen conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 37: 480 – 489.

Szopa A.; Ekiert H.; Szewczyk A.; Fugas E. 2012. Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *Divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 110: 329 - 336.

van den Dries N.; Gianni S.; Czerednik A.; Krens F.A.; de Klerk G.J.M. 2013. Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. **Journal of experimental botany** 64: 5221 - 5230.

Valero-Aracama C.; Wilson S.B.; Kane M.E.; Philman N.L. 2007. Influence of *in vitro* growth conditions on *in vitro* and *ex vitro* photosynthetic rates of easy- and difficult-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 43: 237 – 246.

Wagner H.; Bladt S. 2001. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer. 384 p.

Woltering E.J. 1990. Beneficial effects of carbon dioxide on development of gerbera and rose plantlets grown in vitro. **Scientia Horticulturae** 44: 341 - 345.

Wu T-S.; Shi L-S.; Wang J-J.; lou S-C.; Chang H-C.; Chen Y-P.; Kuo Y-H.; Chand Y-L.; Teng C-M. 2003. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. **Journal of the Chinese Chemical Society** 50: 171 - 178.

Xiao Y.; Lok Y.H.; Kozai T. 2003. Photoautotrophic growth of sugarcane plantlets *in vitro* as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 39: 186 – 192.

Xiao Y.; Zhang Y.; Dang K.; Wang D. 2007. Growth and photosynthesis of *Dendrobium candidum* plantlets cultured photoautotrophically. **Propagation of Ornamental Plants** 7: 89 – 96.

Xiao Y.; Niu G.; Kozai T. 2011. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 105: 149 -158.

Yaseen M.; Ahmad T.; Sablok G.; Standardi A.; Hafiz I.A. 2013. Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular Biology Reports** 40: 2837 - 2849.

Zhang M, Zhao D, Ma Z, Li X, Xiao Y (2009) Growth and photosynthethetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **Horticultural Science** 44:757 – 763.

Zobayed S.M.A.; Kubota C.; Kozai T. 1999. Development of a forced ventilation micropropagation system for large-scale photoautotrophic culture and its utilization in sweet potato. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** 35: 350 - 355.

Zobayed S.M.A.; Afreen-zobayed F.; Kubota C.; Kozai T. 2000. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany** 85: 587 - 592.

CAPÍTULO 3

Efeito de níveis de trocas gasosas e da luz sobre a germinação, desenvolvimento, morfologia e produção de metabólitos de plântulas *in vitro* de *Ruta graveolens*

Resumo - O presente estudo teve por objetivo determinar a influência de níveis de trocas gasosas e irradiância sobre a germinação de sementes, o desenvolvimento, a morfologia e a produção de metabólitos em plântulas de *R. Graveolens*. Para tal, sementes foram cultivadas em meio MS (Murashige e Skoog 1962), avaliando-se três tipos de vedações e três irradiâncias. Para as vedações usou-se: tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana (SM), TRP com um orifício (10 mm) coberto com uma membrana de 0,45 μm de tamanho de poro (1M) e TRP com duas membranas (2M). Para as irradiâncias avaliou-se: 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes - 2F), 31 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (2 lâmpadas LED - 2L) e 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4 lâmpadas LED - 4L). Houve maior desenvolvimento das plântulas, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e acúmulo de amido nos tratamentos 1M e 4L. Porém, no tratamento 4L a camada de cera epicuticular em ambas as faces da folha apresentou marcante alteração morfológica. Ao utilizar frascos com uma membrana e manter as plântulas sob iluminação de 2 lâmpadas fluorescentes e 4 LEDs houve maior taxa de desenvolvimento, com presença de alcaloides, cumarinas, compostos antracênicos, terpenos, saponinas e flavonoides nas folhas, caules e raízes. Determinou-se que o nível de trocas gasosas, a irradiância e o tipo de lâmpada utilizada durante a germinação de sementes de *R. graveolens*, influíram no desenvolvimento, crescimento, morfologia, biossíntese de metabólitos e na adaptação às condições *ex vitro* durante o processo de aclimatização das plântulas, obtendo melhores resultados nos tratamentos 1M e 4L.

Palavras-chave: alterações anatômicas, arruda, histoquímica, irradiância, pigmentos fotossintéticos.

Effect of levels of gas exchange and light on the germination, development, morphology and production of metabolites in seedlings *in vitro* of *Ruta graveolens*.

Abstract - This study aimed to determine the influence of different levels of gas exchange and irradiance on seed germination, development, morphology and production of secondary metabolites in seedlings of *R. graveolens*. Seeds were grown on MS medium evaluating three types of closing and three irradiances. To seals used: rigid polypropylene caps (RPC) without membrane (SM); RPC with a vent hole (10 mm) covered with one membrane of 0.45 μm pore size (1M) and RPC with two membrane (2M). To irradiances used: 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 fluorescent lamps - 2F); 31 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 LED lamps - 2L); and 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4 LED lamps- 4L). There was a higher seedling development, content of photosynthetic pigments and accumulation of starch in 1M and 4L treatments. However, in 4L treatment the epicuticular wax layer on both sides of the sheet showed striking morphological change. It was observed that using jars with a vent hole covered with membrane and keeping the seedlings under 2 fluorescent lamps or 4 LEDs promote a higher rate of development, with presence of alkaloids, coumarins, anthracenic compounds, terpenes, flavonoids and saponins in leaves, stems and roots. It was determined that the level of gas exchange, irradiance and lamp type used during the germination of *R. graveolens*, influenced the development, growth, morphology, metabolite biosynthesis and adaptation to ex vitro conditions during the acclimatization process seedling, obtaining better results in treatments 1M and 4L.

Key words: anatomical changes, histochemistry, irradiance, photosynthetic pigments, rue.

1. INTRODUÇÃO

Um dos fatores que afetam o desenvolvimento das plantas em condições *in vitro* são as baixas trocas gasosas, entre os ambientes interno e externo, em frascos de cultivo, pois estes são fechados ou possuem sistemas inadequados de ventilação. Isso leva ao acúmulo de etileno, à alta umidade relativa e à baixa taxa fotossintética das plantas, induzindo alterações significativas na morfologia e no funcionamento dos tecidos (Fujiwara et al. 1995; Kubota 2001; Rahman e Alsadon 2007; Hazarika 2006; Jeon et al. 2006).

A irradiância também afeta o desempenho das plantas cultivadas *in vitro* estimulando ou inibindo seu crescimento e induzindo algumas variações morfológicas nas folhas e na produção de pigmentos fotossintéticos como clorofilas e carotenoides, cuja síntese depende da qualidade espectral da luz emitida sobre os tecidos e interfere na adaptação das vitroplantas ao ambiente *ex vitro* (Kim et al. 2004; Victório et al. 2007). As lâmpadas fluorescentes têm sido as mais utilizadas para atender as condições luminosas no estabelecimento de tecidos *in vitro*. No entanto, contem espectro de emissão pouco específico (emitem luz na gama de 400 - 700 nm) o que limita o crescimento de várias espécies, levando à necessidade de empregar uma fonte de luz alternativa com especificidade do comprimento de onda, como os diodos emissores de luz (LEDs) (Kim et al. 2004; Kaewjampa e Shimasaki 2012).

As alterações morfológicas resultantes das mudanças tanto nos níveis de trocas gasosas como na irradiância incluem a formação de células epidérmicas e cutícula mais finas, mesofilo pouco definido, desenvolvimento inadequado de estômatos e aumento na densidade estomática. Estas características afetam a taxa de sobrevivência das plantas quando transferidas para condições *ex vitro*, já que diminui sua capacidade para controlar a perda de água quando submetidas a condições severas durante a aclimatização (Zobayed et al. 2001; Chen et al. 2006; Deccetti et al. 2008; Hou et al. 2010; Mohamed e Alsadon 2010; Alvarez et al. 2012).

A ocorrência das alterações morfológicas pode ser diminuída ou impedida utilizando recipientes com sistemas de ventilação adequados, que

aumentam o nível de trocas gasosas e diminuem a umidade relativa no interior dos frascos de cultivo, melhorando o desenvolvimento, incrementando a transpiração foliar, a absorção de nutrientes, o enraizamento e, conseqüentemente, a taxa de sobrevivência das plantas quando transferidas *ex vitro* (McCartan et al. 2004; Chen et al. 2006; Tsay et al. 2006; Kozai 2010).

Mediante a utilização de fontes de luz como as lâmpadas LEDs e irradiância adequadas pode-se estimular: i) a biossíntese de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b* e carotenoides) (Victório et al. 2007; Wu et al. 2007); ii) a proliferação, diferenciação e crescimento de brotos e iii) a taxa de sobrevivência durante a aclimatização de plântulas obtidas *in vitro* (Li et al. 2013). Por outro lado, tanto os níveis de trocas gasosas quanto a irradiância interferem no metabolismo primário e secundário durante o cultivo *in vitro* de plantas, alterando a produção, por exemplo, de carboidratos, flavonoides, antocianinas, carotenoides, compostos fenólicos, cumarinas e furanocumarinas (Junghanns et al. 1998; Hemm et al. 2004; Li e Kubota 2009; Mingozi et al. 2011).

Diferentes sistemas de ventilação e de luminosidade têm sido implementados visando melhorar o desenvolvimento, a adaptação durante o processo de aclimatização e/ou a produção de metabólitos em diversas plantas medicinais como *Crataegus oxyacantha* (Marks e Simpson 1999), *Scrophularia yoshimurae* (Chen et al. 2006), *Pfaffia glomerata* (Saldanha et al. 2013), *Capsicum annuum* (Batista et al. 2013), *Olea europaea* L. (Pinheiro et al. 2013) e *R. graveolens* (Mohamed e Ibrahim 2012; Szopa et al. 2012).

Os objetivos deste trabalho foram determinar a influencia de diferentes níveis de trocas gasosas e irradiância sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *R. graveolens*, caracterizando as alterações nas características anatômicas e no conteúdo de metabólitos secundários.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento da germinação de plântulas de *Ruta graveolens*

2.1.1 Desinfestação das sementes

Sementes de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) (ISLA PAK, Brasil) foram lavadas com detergente comercial durante 5 minutos e deixadas em água corrente por 30 minutos. Posteriormente, as sementes foram transferidas para uma câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, e foram imersas por 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) com 2,0% de cloro ativo (p/p) ((Super Globo[®], Rio de Janeiro, Brasil) acrescida com Tween 20[®] (4 gotas 100 mL⁻¹). Logo após, foram feitas três lavagens com água desionizada estéril, tratadas com álcool etílico (EtOH) 70% por três min e novamente enxaguadas com água. Em seguida as sementes foram então imersas em solução de NaOCl a 25 % (v/v) com Tween 20[®] (4 gotas 100 mL⁻¹) por 10 min, seguido por três enxagues com água desionizada estéril.

Após a desinfestação, as sementes foram transferidas para frascos de vidro contendo 60 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para $5.8 \pm 0,01$, sendo autoclavado a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min.

2.1.2 Efeito dos níveis de trocas gasosas

Foram usados frascos de 350 mL de capacidade e três tipos de vedações que perfizeram três tratamentos: tratamento SM - tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂(TTCO₂): 14 µL L⁻¹ s⁻¹]; tratamento 1M - TRP com um orifício (10 mm) coberto com uma membrana de 0,45 µm (MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent) [TTCO₂: 21 µL L⁻¹ s⁻¹], e tratamento 2M - TRP com dois orifícios cobertos com membranas [TTCO₂: 25 µL L⁻¹ s⁻¹].

A germinação ocorreu em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, durante 45 dias no fotoperíodo de 16 h, com irradiância de 30 µmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro (LI-COR[®], LI-250A Light Meter)), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil).

2.1.3 Efeito da irradiância

As sementes foram cultivadas em frascos de 250 mL de capacidade e a germinação ocorreu em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, durante 45 dias no fotoperíodo de 16 h, avaliando três diferentes irradiâncias (quantificadas por radiômetro (LI-COR®, LI-250A Light Meter)), perfazendo três tratamentos: tratamento 2F - $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil); tratamento 2L - $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidas por 2 lâmpadas LED (diodo emissor de luz de 17 W, Vilux®, LLTV03, Brasil) e tratamento 4L - $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidas por 4 lâmpadas LED. Os espectros de luz foram obtidos por espectro radiômetro (SP100 Versão 1.0.0.1 Photo System Instruments, República Checa) (Figura 1).

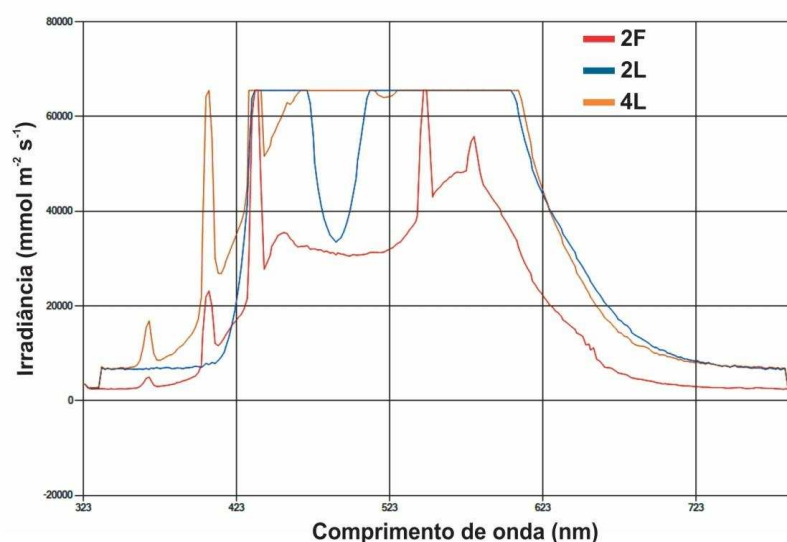


Figura 1. Variações da quantidade ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e da qualidade (nm) de luz emitida pelas lâmpadas utilizadas durante a germinação de sementes de *R. graveolens*. **2F**: duas lâmpadas fluorescentes; **2L** e **4L**: duas e quatro lâmpadas diodo emissor de luz (LED), respectivamente.

2.1.4 Efeito dos níveis de trocas gasosas x efeito da irradiância

As sementes foram cultivadas em frascos de 350 mL de capacidade fechados com tampas rígidas de polipropileno: i) sem membranas, ii) com uma membrana e mantidas durante 45 dias sob fotoperíodo de 16 h, avaliando duas irradiâncias: $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (duas lâmpadas fluorescentes) e $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

(quatro lâmpadas LED), totalizando quatro tratamentos, os quais se encontram resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos avaliados para determinar o efeito dos níveis de trocas gasosa x efeito da irradiância na germinação de sementes de *R. graveolens*

Tratamento	Nº de membranas	Nível de trocas gasosas ($\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Nº e tipo Lâmpadas	Irradiância ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
2FSM	0	14	2 fluorescentes	30
2F1M	1	21	2 fluorescentes	30
4LSM	0	14	4 LED	41
4L1M	1	21	4LED	41

2FSM: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana + 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **2F1M:** TRP com uma membrana + 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **4LSM:** TRP sem membrana + 4 LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **4L1M:** TRP com uma membrana + 4 LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.2 Análises de crescimento e desenvolvimento

Após 45 dias de cultivo foi determinada a germinação (%), comprimento da raiz principal e do caule (cm), número de raízes e de folhas, área foliar (cm^2), pigmentos fotossintéticos por área foliar ($\mu\text{g cm}^{-2}$) e índice estomático (%). Além disso, foram obtidas as massas fresca e seca (mg) de raízes, caule e folhas, através de secagem do material em estufa com ventilação forçada (ACB Larbor) a 60°C , até obter massa constante.

Para algumas análises foram utilizados os foliólulos centrais de cada folíolo da quarta, quinta ou sexta folha composta expandida a partir do ápice das plântulas de *R. graveolens*.

2.2.1 Pigmentos fotossintéticos

Três discos foliares de 16 mm de diâmetro retirados dos foliólulos da quarta folha composta expandida, foram incubados em tubos de vidro contendo 2,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (VETEC) saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3) e deixados no escuro à temperatura ambiente durante 48 horas (Santos et al. 2008). A absorbância das amostras foi determinada nos comprimentos de onda de 665, 645 e 480 nm, usando-se um espectrofotômetro Genesys™ Scanning 10 UV/Visível (Thermo Scientific, EUA). A concentração das clorofilas *a*, *b* e carotenoides foi calculada segundo a metodologia descrita por Wellburn (1994).

2.2.2 Índice estomático

Foi realizada a impressão epidérmica das faces abaxial e adaxial dos foliólulos da quinta folha composta expandida das plântulas pela técnica desenvolvida por Segatto et al. (2004). Posteriormente, as imagens da impressão de três foliólulos de plântulas diferentes foram capturadas no fotomicroscópio Olympus Optical (modelo AX70TRF, Tóquio, Japão) acoplado a câmera digital (Spot Insight Color 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA) e foram analisadas no software Anati Quanti (Aguiar et al. 2007) para o cálculo do índice estomático, mediante à seguinte fórmula:

$$IE = \frac{N^{\circ} \text{ estômatos}}{N^{\circ} \text{ estômatos} + N^{\circ} \text{ células epidérmicas}} \times 100$$

2.2.3 Aclimatização das plântulas

Após 45 dias de cultivo, quatro plântulas selecionadas ao acaso, foram transferidas para copos de 200 mL de capacidade contendo substrato Plantmax[®] HT (Eucatex, Brasil) e vermiculita em proporção 1:1, fechados com sacos plásticos transparentes de 15 a 20 cm com furos para permitir as trocas gasosas com o ambiente, e deixadas em condições de laboratório sob irradiância de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante 30 dias, foram retirados os sacos plásticos gradualmente e foram avaliados a sobrevivência das plântulas (%), o comprimento total (cm) e o número de folhas.

2.3 Análise anatômica

Para os análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), estruturais e histoquímicos, foliólulos centrais dos folíolos retirados da quinta e sexta folha composta expandida (segundo o análise), à partir do ápice de plântulas obtidas nos tratamentos SM, 1M, 2M, 2F, 2L e 4L, foram excisados e imediatamente fixados em solução Karnovsky (2,5% de glutaraldeído e 2,5% de paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato a pH 7,0) durante 72 horas (Karnovsky, 1965).

Foram utilizados como controle foliólulos centrais dos folíolos da quinta e sexta folha composta expandida (segundo o análise), a partir do ápice de

plantas adultas de *R. graveolens* mantidas em casa-de-vegetação, de aproximadamente oito meses de idade, processados juntamente com as amostras provenientes das plântulas *in vitro*, seguindo a mesma metodologia para sua análise.

2.3.1 Análise anatômica da folha por MEV

Após o período de fixação em solução Karnovsky, as amostras (da quinta folha composta) foram desidratadas em séries crescentes de acetona e secas em ponto crítico com CO₂ (Bal-Tec CPD 030) e então montadas em stubs e metalizadas com ouro usando um revestidor de pulverização catódica FDU 010 (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430VP, Cambridge, England), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

2.3.2 Análise estrutural e histoquímica

Após o período de fixação em solução Karnovsky, as amostras (da sexta folha composta) foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (HistoResin, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL).

Posteriormente, foram obtidos cortes transversais dos foliólulos de 5 µm de espessura utilizando um micrótomo rotativo (RM2155, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL), os quais foram submetidos a testes histoquímicos para detecção das seguintes classes de metabólitos: reagente de Schiff/ácido periódico (PAS) para polissacarídeos neutros (O'Brien e McCully, 1981); sudan black B para lipídeos totais (Pearse, 1972); xilidine ponceau (XP) para proteínas (Vidal 1970); lugol para amido e vermelho de rutênio para pectinas (Johansen, 1940). Para a caracterização estrutural, os cortes foram corados por 15 min com azul de toluidina 0,05 % a pH 4,4 (O'Brien *et al.*, 1964).

Para o teste histoquímico de alcaloides, foram seccionadas transversalmente amostras frescas de raiz, caule e folhas das plântulas obtidas nos diferentes tratamentos avaliados em micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA). As secções transversais

obtidas foram tratadas com o reagente de Wagner para detecção de alcaloides (Furr e Mahlberg 1981).

Todas as lâminas foram montadas em resina sintética Permount®. As imagens foram capturadas usando um fotomicroscópio Olympus Optical (modelo AX70TRF, Tóquio, Japão) acoplado a câmera digital (Spot Insight Color 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., USA), do laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa.

Posteriormente, foram selecionadas três regiões do limbo foliar de cada tratamento avaliado, das quais foram capturadas três imagens de cada para análise micromorfométrica. Foram determinados a área total do limbo, a espessura da folha, a área dos espaços intercelulares e o comprimento do mesofilo e dos parênquimas paliçádico e lacunoso, utilizando-se o software Image-Pro Plus 4.5.0.29.

2.4 Análise fitoquímica

2.4.1 Obtenção dos extratos

A massa fresca total obtida nos diferentes tratamentos foi separada por órgão (caule, folha, raiz), imediatamente congelada com nitrogênio líquido e armazenada a -80°C. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas (liofilizador modelo L101 LIOTOP, Liobras, Brasil), pesadas e colocadas em erlenmeyer de 125 mL. Adicionaram-se, então, 15 mL de álcool etílico grau analítico 95 % (v/v) (Vetec) para cada 300 mg de material vegetal; logo após, o conteúdo foi homogeneizado e deixado em agitação constante durante 48 h (mesa agitadora Tecnal®, TE-1401) a 70 rpm.

Em seguida, a suspensão foi filtrada por gravidade e repetiu-se o procedimento de extração utilizando o resíduo obtido. Os filtrados foram combinados e concentrados em sistema de evaporação rotatória (IKA®RV 10 digital, com recirculador Chiller, F-108 e bomba com controlador de vácuo, V700, Suíça) sob pressão reduzida e temperatura de 45 °C. Após a retirada do solvente os extratos foram transferidos para vials de 3 mL de capacidade e armazenados a 8°C. O processo de extração foi realizado por triplicata.

2.4.2 Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Foi selecionado ao acaso um extrato etanólico cru por cada órgão (folha, caule, raiz) e por cada tratamento para realizar a caracterização fitoquímica por CCD segundo a metodologia descrita por Wagner e Bladt (2001) e Farnsworth (1966), determinando a presença ou ausência de alcaloides, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, saponinas, esteroides, triterpenos, taninos e compostos antracênicos. Para o qual, foram pesados 1,0 mg da substância padrão e 10 mg do extrato etanólico seco diretamente para frascos de vidro de 5 mL de capacidade adicionando-se 1,0 e 2,0 mL de metanol grau analítico (VETEC), para obter concentrações finais de 1 e 5 mg mL⁻¹, respectivamente.

Posteriormente, foram retiradas alíquotas de 2,5 µL da solução padrão e de 30 µL com ajuda de um capilar em cromatoplaças de alumínio recobertas com sílica gel 60 GF₂₅₄ com indicador UV (Merck, Alemanha) de 4 x 5 cm, deixando um espaço de 3 mm entre cada ponto de aplicação.

Tabela 2. Condições para a prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de *Ruta graveolens* por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (Wagner e Bladt, 2001; Farnsworth, 1966).

Tipo de metabolito	Sistema de eluentes	Revelador	Cor de referência	Compostos padrão (cor)
Alcaloides	AcOEt:AcOH:MeOH:H ₂ O (10:2:1:2)	Dragendorff ¹	Vermelho-laranja ²	Quinina (laranja)
Cumarinas	BuOH: AcOH: H ₂ O (15:2:3)	KOH a 5% em EtOH	Fluorescência verde ou azul ³	Umbelliferona (azul-verde)
Compostos antracênicos	BuOH: AcOH: H ₂ O (15:2:3)	KOH a 5% em EtOH	Vermelho ^{2,3}	Quinona (vermelha)
Flavonoides	BuOH: AcOH: H ₂ O (4:1:5)	AlCl ₃ a 1% em EtOH ³	Amarelo ^{2,3}	Rutina (amarela ² , laranja ⁴)
Esteróides e triterpenos	AcOEt: PhMe: AcOH (8:4:1)	Anisaldeído/ácido sulfúrico	Amarelo, laranja, verde, azul, café vermelho, rosa ⁴	Colesterol (roxo)
			Verde, vermelho, amarelo e roxo ²	Estigmasterol (azul escuro)
				Limoneno (azul-verde claro)
				Lanosterol (roxo-azul)
Saponinas	AcOEt:AcOH:MeOH:H ₂ O (10,35:2,35:1,35:2,35)	Anisaldeído/ácido sulfúrico	Azul ou roxo-azul, amarelo	<i>Sapindus saponaria</i>

AcOEt: acetato de etila; AcOH: ácido acético; MeOH: metanol; H₂O: água; BuOH: butanol; PhMe: tolueno.

¹ Reagente de Dragendorff: nitrato de bismuto + ácido acético + iodeto de potássio (Wagner e Blatt, 2001). ² Observações no visível ³ Observações sob luz UV λ : 366 nm.
⁴ Observações sob luz UV λ 254 nm (Farnsworth, 1966).

Finalmente, as cromatoplasmas foram eluídas em cuba cromatográfica previamente saturada pelo sistema de eluentes específico para cada classe de metabólito secundário, permitindo a separação dos componentes presentes no extrato dependendo de sua polaridade e afinidade com as fases estacionária (cromatoplasma) e móvel (eluente). Na tabela 2 são apresentadas as condições com as quais foram eluídas cada CCD para cada tipo de metabólito avaliado; cada experimento foi realizado em duplicata.

2.4.3 Perfil cromatográfico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para o preparo das amostras, foram pesados diretamente em tubos Eppendorf® 20 mg do extrato etanólico e solubilizados em 1,25 mL de metanol grau CLAE, obtendo uma solução a 16 mg mL⁻¹. Para homogeneizar a solução, as amostras foram agitadas, colocadas no banho de ultrassom, e em seguida centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. Posteriormente, foi transferido 0,1 mL do sobrenadante para vials de CLAE e adicionados 1,5 mL de MeOH grau CLAE, obtendo-se uma solução com concentração final de 1 mg mL⁻¹.

A metodologia usada para quantificação de alcaloides por CLAE foi baseada na proposta por Kuzovkina *et al.*, (2004) e Cardoso-Lopes *et al.*, (2010), enquanto que para as cumarinas foram usadas as metodologias reportadas por Massot *et al.*, (2000) e Szopa *et al.*, (2012) com modificações. A análise foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) marca THERMO equipado com um detector UV/visível ACCELA/PDA. A coluna empregada para a separação foi a C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 μ m). Tanto para alcaloides como para cumarinas foram injetados 10 μ L de cada amostra de 1 mg mL⁻¹ utilizando injetor automático ACCELA.

Para a separação dos alcaloides, foi usada a fase móvel composta de acetonitrila/metanol/água (10:45:45), utilizando-se dois comprimentos de ondas: 245 e 275 nm. Para as cumarinas, foi usada uma mistura de dois

sistemas, o primeiro (A) acetonitrila/metanol/água (30:30:40) e o segundo (B) acetonitrila/metanol (50:50), com proporções de A/B de 50:50; os comprimentos de onda foram 254 e 310 nm. O fluxo foi de 0,6 mL min⁻¹ e o tempo de corrida de 30 minutos, para ambos os casos.

2.5. Avaliações e análises estatísticas

Nos experimentos nos quais se avaliaram os efeitos dos níveis de trocas gasosas e da irradiância na germinação, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições, sendo cada unidade experimental composta por um frasco com cinco sementes. O experimento onde foi estudada a interação dessas duas variáveis também foi montado em DIC em esquema fatorial 2x2 (dois níveis de trocas gasosas x dois tipos de irradiância), com dez repetições, sendo cada uma delas constituída por um frasco com cinco sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% de significância. Todas as análises foram feitas com auxílio do programa Genes versão Windows/2011.9.0 (Cruz, 2013).

Para as análises histoquímicas, o parâmetro de avaliação foi qualitativo dado pela reação positiva de cada tipo de metabólito estudado ao teste correspondente. Foram usadas três repetições para cada teste, tendo cada repetição consistido de três lâminas, cada uma com no mínimo cinco cortes.

A prospecção fitoquímica foi constituída pelo componente qualitativo para determinar a presença ou ausência dos núcleos fitoquímicos nos extratos etanólicos mediante a CCD, com duas repetições para cada teste.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito de diferentes condições de cultivo avaliadas sobre o desenvolvimento de plântulas de *Ruta graveolens*

3.1.1 Efeito dos níveis de trocas gasosas

A porcentagem de germinação de sementes não diferiu entre os tratamentos, sendo 76% em recipientes fechados (SM), 72% em recipientes com tampas com uma membrana (1M) e 64% em recipientes com tampas com duas membranas (2M). No entanto, no desenvolvimento das plântulas foram observadas diferenças significativas nos seguintes parâmetros: comprimento da raiz principal, massa seca da raiz, comprimento do caule, número de folhas, índice estomático e conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Tabela 3).

Tabela 3. Médias das variáveis de crescimento analisadas nos tratamentos com diferentes níveis de trocas gasosas.

Variável avaliada	Tratamento		
	SM	1M	2M
Nº de raízes secundárias	11 a	9 a	11 a
Comp. raiz principal (mm)	163,96 a	140,99 a	90,52 b
Massa fresca de raiz (mg)	68,6 a	79,2 a	48,3 a
Massa seca de raiz (mg)	5,4 b	9,0 a	5,3 b
Comprimento caule (mm)	54,63 a	36,37 b	18,46 c
Massa fresca caule (mg)	40,2 a	49,2 a	24,0 a
Massa seca caule (mg)	3,4 a	4,8 a	5,3 a
Número de folhas	14 a	12 a	9 b
Massa fresca folha (mg)	76,0 a	101,7 a	90,3 a
Massa seca folha (mg)	11,0 a	12,5 a	16,5 a
Área foliar (cm ²)	2,23 a	2,41 a	0,92 b
Índice estomático	11,87 b	15,60 a	13,17 b
Pigmentos fotossintéticos por área foliar			
Clorofila a (µg cm ⁻²)	87,25 b	114,25 a	84,06 b
Clorofila b (µg cm ⁻²)	25,27 b	37,40 a	27,31 b
Carotenoides (µg cm ⁻²)	17,38 b	22,52 a	18,15 b
Plântulas aclimatizadas			
Altura total (cm)	8,4 b	15,3 a	6,3 b
Número de folhas	11 a	15 a	9 a

Médias seguidas pelas mesmas letras na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de significância. **SM:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂): 14 µL L⁻¹ s⁻¹]; **1M:** TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 µL L⁻¹ s⁻¹]; **2M:** TRP com duas membranas [TTCO₂: 25 µL L⁻¹ s⁻¹].

De modo geral, as variáveis de crescimento avaliadas tiveram resultados similares nos tratamentos SM e 1M, os quais foram os que mais estimularam o desenvolvimento das plântulas de *R. graveolens* (Tabela 3, Figura 2A). No

entanto, plântulas cultivadas em frascos com uma membrana (1M) apresentaram maior índice estomático e a maior concentração de clorofilas *a* e *b* e carotenoides, o que influenciou na sobrevivência das plântulas durante o período de aclimatização e na sua adaptação às condições *ex vitro*, sendo observado maior crescimento que nas plântulas aclimatizadas dos tratamentos SM e 2M (Tabela 3, Figura 2D).

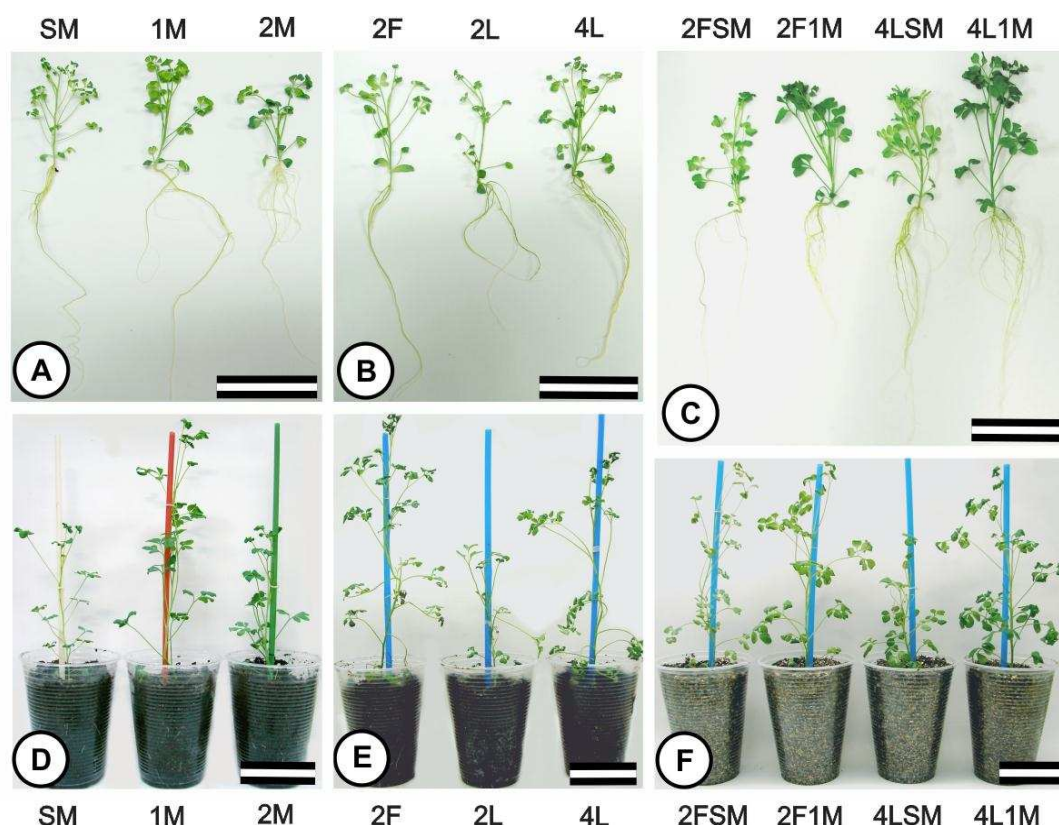


Figura 2. Plântulas *in vitro* de *R. graveolens* obtidas sob diferentes níveis de trocas gasosas, quantidades e qualidades de luz. **A, B e C.** Após 45 dias de cultivo *in vitro*. **D, E e F.** Após do período de aclimatização. **SM:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana; **1M:** TRP com uma membrana; **2M:** TRP com duas membranas; **2F:** 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **2L:** 2 lâmpadas LED ($31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **4L:** 4 LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **2FSM:** TRP sem membrana + 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **2F1M:** TRP com uma membrana + 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **4LSM:** TRP sem membrana + 4 LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **4L1M:** TRP com uma membrana + 4 LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.1.2 Efeito da irradiância

As condições de luz avaliadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de germinação das sementes,

sendo de 76, 64 e 72% nos tratamentos 2F, 2L e 4L, respectivamente. Das variáveis analisadas, as únicas que não apresentaram diferenças significativas entre os três tratamentos foram o comprimento da raiz principal e do caule, a massa fresca de raiz e a área foliar. Enquanto que os outros parâmetros de crescimento considerados exibiram melhores resultados quando as plântulas foram mantidas no tratamento 4L e foram similares nos tratamentos 2F e 2L (Tabela 4, Figura 2B).

Tabela 4. Médias das variáveis de crescimento analisadas nos tratamentos com diferentes irradiâncias

Variável avaliada	Tratamento		
	2F	2L	4L
N° raízes secundárias	7 b	4 c	9 a
Comprimento raiz principal (mm)	142,89 a	101,00 a	127,17 a
Massa fresca raiz (mg)	54,1 a	34,8 a	76,8 a
Massa seca raiz (mg)	5,9 b	4,0 b	12,7 a
Comprimento caule (mm)	49,88 a	49,06 a	55,25 a
Massa fresca caule (mg)	39,3 b	28,8 b	70,0 a
Massa seca caule (mg)	2,3 b	3,5 b	7,0 a
Número de folhas	14 b	10 b	18 a
Massa fresca folha (mg)	84,4 b	42,5 b	194,0 a
Massa seca folha (mg)	10,9 b	8,0 b	24,7 a
Área foliar (cm²)	2,04 a	2,10 a	1,07 a
Índice estomático	15,38 a	16,12 a	12,17 b
Pigmentos fotossintéticos por área foliar			
Clorofila a (µg cm⁻²)	67,59 b	100,63 a	99,36 a
Clorofila b (µg cm⁻²)	22,93 b	34,95 a	32,62 a
Carotenoides (µg cm⁻²)	14,07 b	22,12 a	22,40 a
Plântulas aclimatizadas			
Altura total (cm)	6,25 a	2,38 a	6,54 a
N° folhas	10 a	4 a	11 a

Médias seguidas pelas mesmas letras na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de significância. **2F:** 2 lâmpadas fluorescentes (30 µmol m⁻² s⁻¹); **2L:** 2 lâmpadas LED (31 µmol m⁻² s⁻¹); **4L:** 4 LED (41 µmol m⁻² s⁻¹).

O conteúdo de clorofilas *a* e *b* e de carotenoides foi maior nas plântulas sob irradiância de 31 e 41 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por duas e quatro lâmpadas LED, respectivamente; o menor índice estomático foi registrado nas plântulas obtidas no tratamento 4L. Após 30 dias, as plântulas provenientes dos tratamentos 2F, 2L e 4L se adaptaram adequadamente às condições *ex vitro*, não havendo diferenças estatisticamente significativas na altura e no número de folhas das plântulas aclimatadas (Tabela 4, Figura 2E).

3.1.3 Efeito dos níveis de trocas gasosas x efeito da irradiância

A porcentagem de germinação de sementes foi de 84 – 88%, sem diferenças significativas entre os tratamentos. As plântulas obtidas nos tratamentos 2FSM, 2F1M, 4LSM e 4L1M apresentaram semelhanças no comprimento de raiz e caule, massa fresca e seca de raiz, número de folhas e área foliar (Tabela 5, Figura 2C). Enquanto que as médias do número de raízes secundárias, massa fresca e seca de caule e folha, índice estomático e do conteúdo de pigmentos fotossintéticos foram superiores nos tratamentos 2F1M e 4L1M não havendo diferença significativa entre eles (Tabela 5).

Tabela 5. Médias das variáveis de crescimento analisadas nos tratamentos com diferentes níveis de trocas gasosas x irradiância

Variável avaliada	Tratamento			
	2FSM	2F1M	4LSM	4L1M
N° raízes secundárias	12 b	18 a	5 c	12 b
Comprimento raiz principal (mm)	138,97 a	149,10 a	155,13 a	123,66 a
Massa fresca raiz (mg)	105,2 a	105,1 a	58,9 a	136,1 a
Massa seca raiz (mg)	8,0 a	8,0 a	7,0 a	7,5 a
Comprimento caule (mm)	43,32 a	47,38 a	45,60 a	44,63 a
Massa fresca caule (mg)	36,0 b	70,4 a	38,8 b	72,3 a
Massa seca caule (mg)	3,0 b	7,5 a	3,5 b	7,5 a
N° folhas	11 a	13 a	14 a	12 a
Massa fresca folha (mg)	90,7 b	187,7 a	112,65 b	194,4 a
Massa seca folha (mg)	11,3 b	28,0 a	15,0 b	29,5 a
Área foliar (cm ²)	1,60 a	3,52 a	1,52 a	2,88 a
Índice estomático	11,38 b	17,73 a	11,49 b	15,30 a
Pigmentos fotossintéticos por área foliar				
Clorofila a (µg cm ⁻²)	62,60 b	99,95 a	67,18 b	94,18 a
Clorofila b (µg cm ⁻²)	19,59 b	26,63 a	18,01 b	28,31 a
Carotenoides (µg cm ⁻²)	14,29 b	20,11 a	14,51 b	19,30 a
Plântulas aclimatizadas				
Altura total (cm)	4,8 a	11,5 a	10,8 a	12,8 a
N° folhas	10 a	15 a	16 a	16 a

Médias seguidas pelas mesmas letras na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de significância. **2FSM:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂) 14 µL L⁻¹ s⁻¹] + 2 lâmpadas fluorescentes (30 µmol m⁻² s⁻¹); **2F1M:** TRP com uma membrana [TTCO₂: 21 µL L⁻¹ s⁻¹] e 2 lâmpadas fluorescentes (30 µmol m⁻² s⁻¹); **4LSM:** TTCO₂ de 14 µL L⁻¹ s⁻¹ + 4 LED (41 µmol m⁻² s⁻¹); **4L1M:** TTCO₂ de 21 µL L⁻¹ s⁻¹ + 4 LED (41 µmol m⁻² s⁻¹).

No entanto, durante o período de aclimatização o desenvolvimento das plântulas foi similar independentemente das condições de cultivo avaliadas durante sua germinação *in vitro*, apresentando-se de 10 a 16 folhas expandidas e comprimento total da planta de 4,8 a 12,8 cm (Tabela 5, Figura 2F).

3.2 Variações anatômicas na folha influenciadas pelo nível de trocas gasosas e a irradiância

Folhas das plantas adultas de *R. graveolens*, mantidas em condições *ex vitro*, utilizadas como controle, apresentaram mesofilo heterogêneo, dorsiventral, com duas camadas de parênquima paliçádico e presença de cavidades secretoras, caracterizadas por um grande espaço intercelular (lúmen) delimitado por uma camada de células epiteliais, dispostas entre as células dos parênquimas paliçádico e lacunoso e/ou próximas aos feixes vasculares (Figura 3A). Na superfície de ambas as faces da epiderme da folha (Figuras 3C e 3D), foram observadas de duas a quatro células epidérmicas modificadas, às quais cobriam as cavidades secretoras, sendo circundadas por uma camada de células de formato irregular (geralmente sete) (Figura 3B).

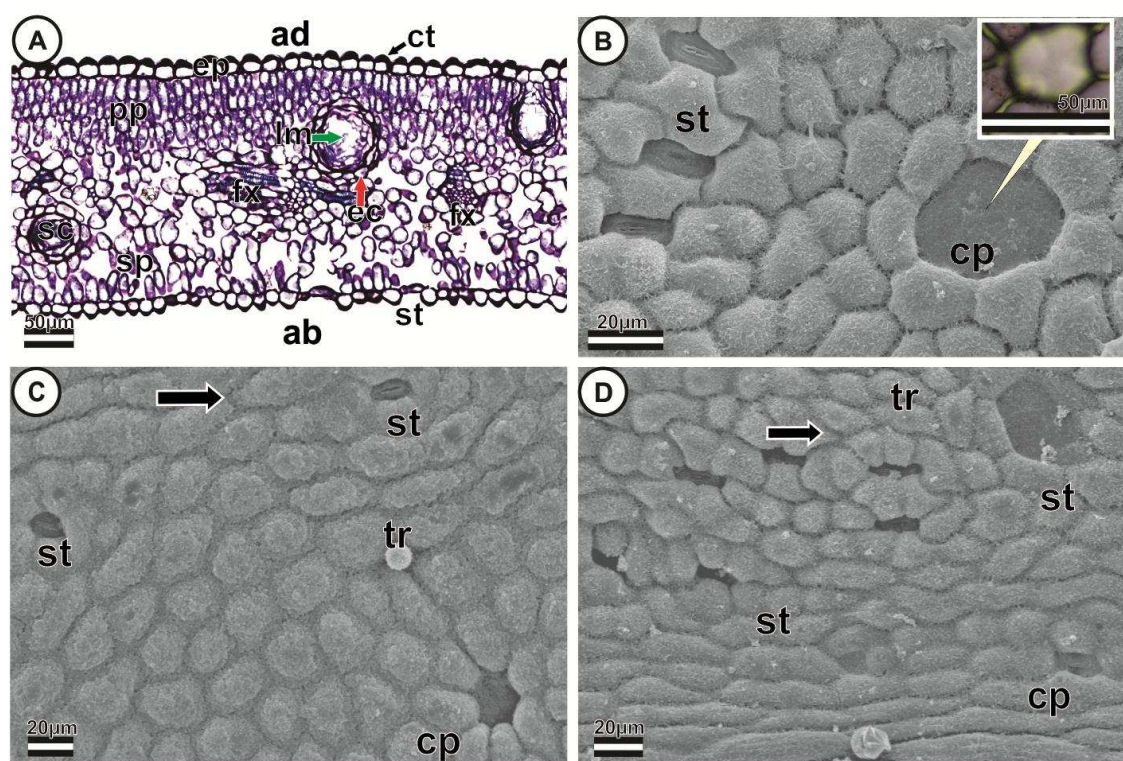


Figura 3. Folhas de plantas adultas de *Ruta graveolens* mantidas em condições *ex vitro*, utilizadas como controle: Microscopia de luz (A) e microscopia eletrônica de varredura (B, C e D). **A.** Corte transversal, Barra = 50 µm; **B.** Estômatos e cavidades secretoras da epiderme da face abaxial da folha (ampliação: imagem da impressão epidérmica capturada em fotomicroscópio, Barra = 50 µm); **C.** Epiderme da face adaxial da folha; **D.** Epiderme da face abaxial da folha. Barras em B, C e D = 20 µm; **ad:** face adaxial; **ab:** face abaxial; **ct:** cutícula; **ep:** epiderme; **fx:** feixe vascular; **pp:** parênquima paliçádico; **sp:** parênquima lacunoso; **sc:** cavidade secretora; **lm:** lúmen; **ce:**

células epiteliais; **st**: estômato; **tr**: tricoma; **cp**: células associadas as cavidades secretoras. Seta em C e D: indica a nervura central da folha.

A epiderme, recoberta por uma cutícula fina, é unisseriada (Figura 3A) e anfiestomática; sendo que a epiderme da face adaxial apresentou menor número de estômatos, dispostos ao longo e/ou próximos da nervura central (Figura 3C), enquanto que na epiderme da face abaxial da folha encontravam-se distribuídos ao longo do limbo foliar (Figura 3D). Os estômatos foram do tipo anomocítico, rodeados por um número variável de células subsidiárias geralmente ovaladas (ao redor de quatro) (Figuras 3B, 3C e 3D). A epiderme de ambas as faces da folha apresentou tricomas globulares rodeados de, aproximadamente, cinco células epidérmicas, arranjos principalmente na região da nervura central (Figuras 3C e 3D).

Ao comparar as características anatômicas das folhas de plântulas *in vitro* de *R. graveolens* com folhas das plantas adultas *ex vitro*, foram observadas semelhanças quanto ao tipo de estruturas presentes, como estômatos anomocíticos na epiderme de ambas as faces da folha, sendo mais abundantes na face abaxial e restringindo-se na região da nervura central na face adaxial, a presença de tricomas e cavidades secretoras, a epiderme uniestratificada e com cutícula delgada, e mesofilo constituído por parênquima paliçádico e lacunoso. Porém, os diferentes tratamentos testados apresentaram diferenças no formato, tamanho e número das células do parênquima clorofiliano, na distribuição das células no mesofilo e dos espaços intercelulares (Figuras 4 e 5).

As folhas de plântulas mantidas nos tratamentos SM, 2F e 2L, apresentaram morfologia alterada comparada com as folhas de plantas adultas e dos outros tratamentos. As células epidérmicas em ambas as faces da folha apresentaram forma irregular (Figuras 4A, 5A e 5D); o mesofilo, o parênquima clorofiliano e os espaços intercelulares foram menores. O parênquima paliçádico apresentou-se uniestratificado, com células de diferentes tamanhos, algumas justapostas com poucos espaços intercelulares e outras mais distantes entre si (Figuras 4A, 5A e 5D), sendo mais definido em folhas expostas a $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2L) (Figura 5D). O parênquima lacunoso foi

irregular, com menor número de células e mais espaços intercelulares e os feixes vasculares foram menores (Figuras 4A, 5A e 5D).

A epiderme da face abaxial nos tratamentos SM e 2F (Figuras 4C e 5C) demonstrou grande alteração morfológica, com aspecto rugoso, formando diferentes camadas de células sinuosas, com estômatos pouco visíveis, os quais apresentaram forma arredondada na face adaxial da folha (Figuras 4B e 5B). A epiderme das folhas do tratamento 2L foi mais parecida com a das folhas de plantas adultas (Figura 5E e 5F).

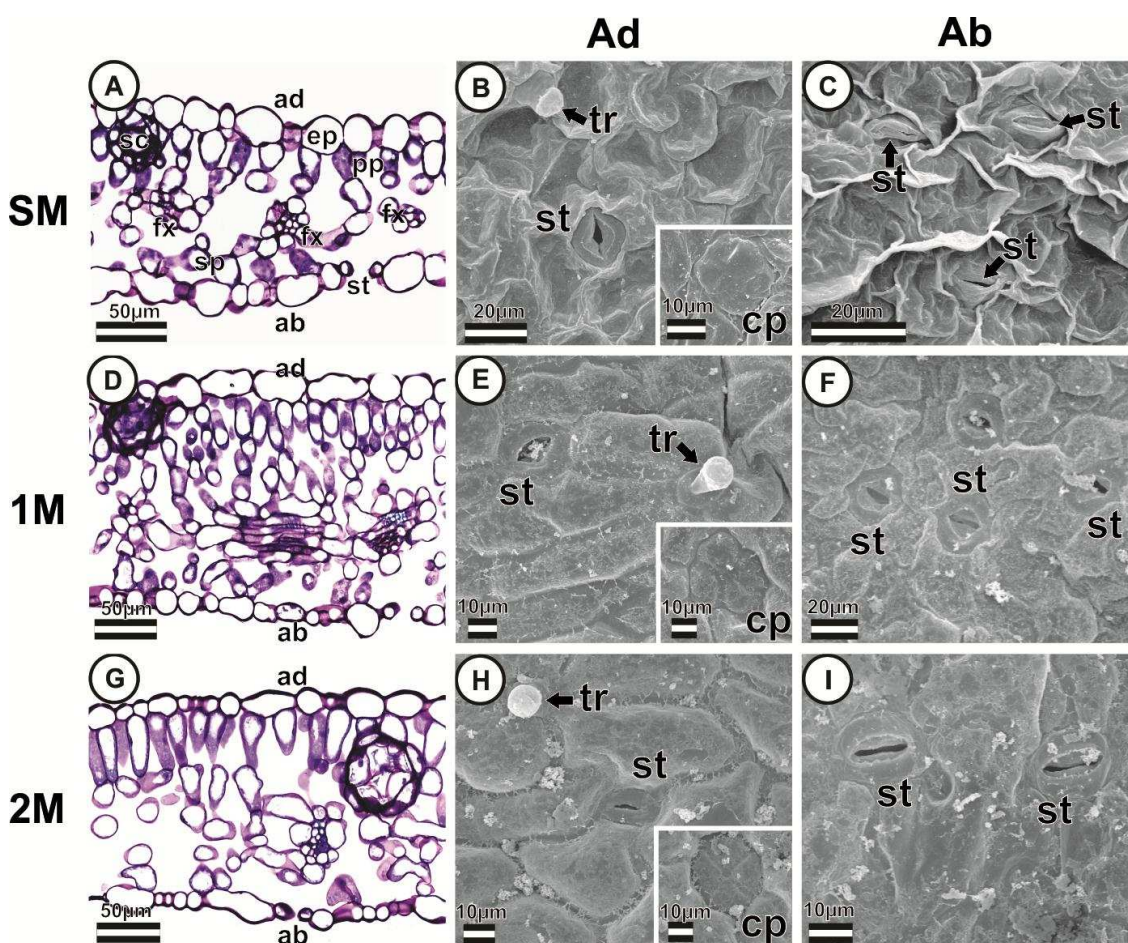


Figura 4. Estrutura foliar de plântulas de *Ruta graveolens* cultivadas *in vitro* sob diferentes níveis de trocas gasosas. **A, D, G.** Corte transversal. Microscopia eletrônica de varredura: **B, E e H.** Epiderme da face adaxial da folha; **C, F e I.** Epiderme da face abaxial da folha. **SM:** tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana; **1M:** TRP com uma membrana; **2M:** TRP com duas membranas; **ad:** face adaxial; **ab:** face abaxial; **ct:** cutícula; **ep:** epiderme; **fx:** feixe vascular; **pp:** parênquima paliçádico; **sp:** parênquima lacunoso; **sc:** cavidade secretora; **st:** estômato; **tr:** tricoma; **cp:** células associadas as cavidades secretoras.

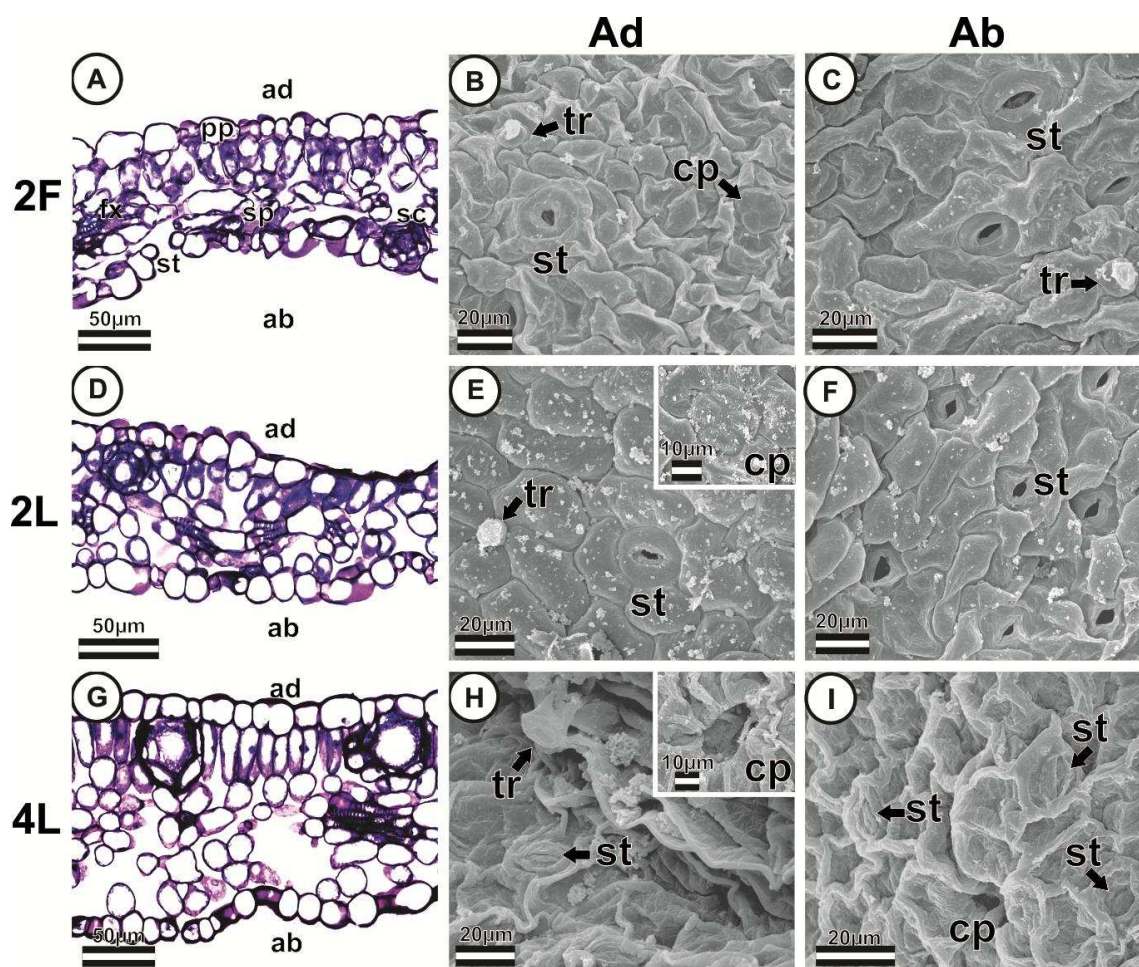


Figura 5. Estrutura foliar de plântulas de *Ruta graveolens* cultivadas *in vitro* sob diferentes irradiâncias e tipos de lâmpadas. **A, D, G.** Corte transversal. Microscopia eletrônica de varredura: **B, E e H.** Epiderme da face adaxial da folha; **C, F e I.** Epiderme da face abaxial da folha. **2F:** 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **2L:** 2 lâmpadas LED ($31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **4L:** 4 lâmpadas LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **ad:** face adaxial; **ab:** face abaxial; **ct:** cutícula; **ep:** epiderme; **fx:** feixe vascular; **pp:** parênquima paliçádico; **sp:** parênquima lacunoso; **sc:** cavidade secretora; **st:** estômato; **tr:** tricoma; **cp:** células associadas as cavidades secretoras.

No tratamento 1M as células epidérmicas estiveram mais definidas em ambas as faces (Figuras 4E e 4F), destacando-se a face adaxial contendo células com formato mais organizado (Figuras 4E). As folhas das plantas crescidas no tratamento 2M apresentaram o parênquima paliçádico com células mais espaçadas (Figura 4G), células epidérmicas mais irregulares e estômatos mais alongados que os observados no tratamento 1M (Figuras 4H e I).

Segundo a análise estrutural, as folhas das plântulas obtidas nos tratamentos 1M (Figura 4D) e 4L (Figura 5G), apresentaram morfologia similar à das plantas adultas (Figura 1A), visto que as células do mesofilo apresentaram tamanhos regulares e estavam mais bem distribuídas, tanto a epiderme quanto o parênquima clorofiliano apresentaram-se mais definidos, com feixes vasculares maiores (Figuras 4D e 5G). O limbo foliar foi maior, assim como os espaços intercelulares, o mesofilo e os parênquimas paliçádico e lacunoso. Porém, no tratamento 4L, a camada de cera que recobre a epiderme em ambas as faces da folha, apresentou intensa alteração morfológica, com aparência rugosa, dando aspecto sinuoso às células epidérmicas (irregulares, com profundas dobras).

Os tricomas também estiveram igualmente deformados (Figura 5H); as células epidérmicas modificadas associadas às cavidades secretoras, comparadas com as das folhas das plântulas dos tratamentos SM, 1M, 2M, 2F, 2L (Figuras 4B, 4E, 4H, 5B e 5E) e de plantas adultas (Figuras 3B, 3C e 3D) encontraram-se mais afundadas (Figura 5H), rodeadas por um número de células indefinido; os estômatos foram pouco visíveis em ambas as faces da folha, com células guarda delgadas e alongadas (Figuras 5H e 5I).

3.3 Efeito do nível de trocas gasosas e da irradiância sobre a produção de metabólitos nas plântulas.

3.3.1 Testes histoquímicos por microscopia de luz

As plantas adultas de *R. graveolens* mantidas em casa de vegetação e utilizadas como controle, apresentaram alto conteúdo de amido no parênquima paliçádico e menor no lacunoso (Figura 6A). Os polissacarídeos foram mais evidenciados na cutícula e nas células epiteliais das cavidades secretoras; no entanto foi possível observar polissacarídeos em todas as paredes celulares que constituem o limbo, além dos grãos de amido nas células do mesofilo (Figura 6B).

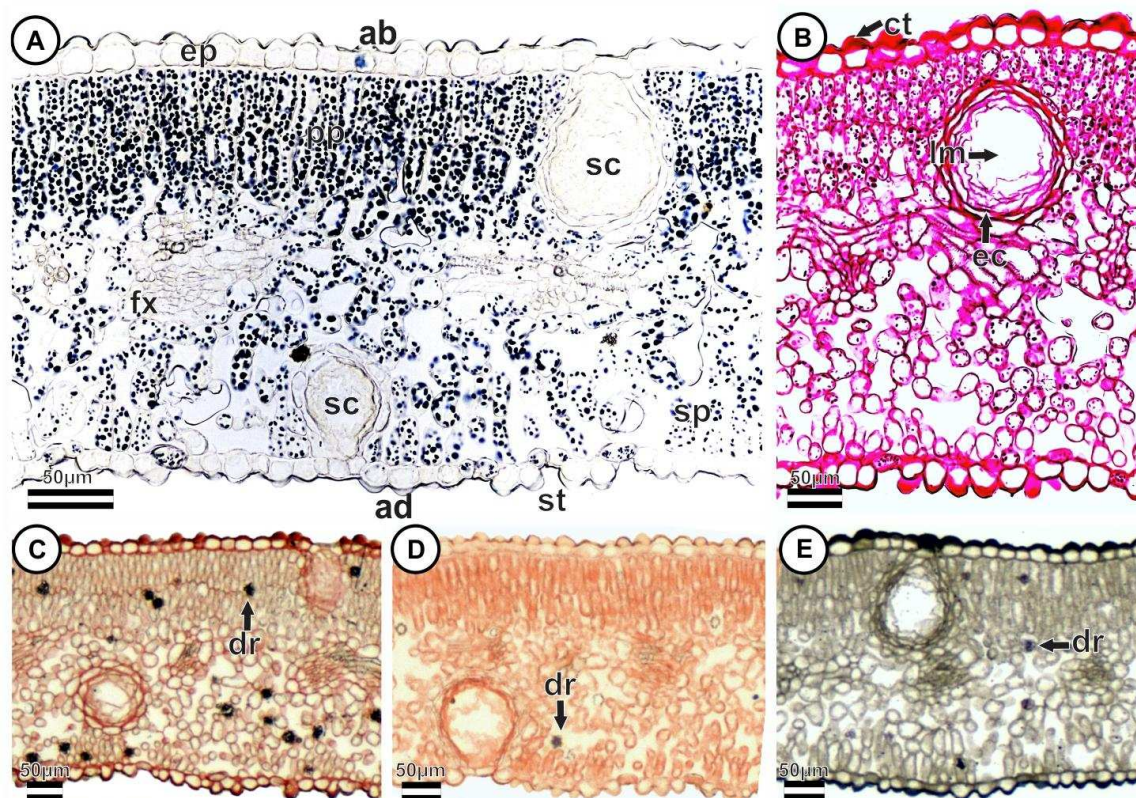


Figura 6. Cortes transversais de folhas de plantas adultas de *R. graveolens* crescidas em condições *ex vitro*, utilizadas como controle, evidenciando a presença de diferentes metabólitos primários. **A.** Amido (lugol); **B.** Polissacarídeos neutros (Schiff/ácido periódico, PAS); **C.** Pectinas (vermelho de rutênio); **D.** Proteínas (xilidine ponceau, XP); **E.** Lipídeos totais (sudan black B); **ad:** face adaxial; **ab:** face abaxial; **ct:** cutícula; **dr:** drusa; **ep:** epiderme; **fx:** feixe vascular; **pp:** parênquima paliçádico; **sp:** parênquima lacunoso; **sc:** cavidade secretora; **st:** estômato.

Pectinas e proteínas foram detectadas principalmente na epiderme de ambas as faces da folha e nas células que formaram tanto o lúmen como o epitélio das cavidades secretoras (Figuras 6C e 6D). Ao utilizar o reagente Sudan Black B, foram detectados lipídeos na cutícula e fosfolipídios nas células do mesofilo e do epitélio das cavidades secretoras (Figura 6E). Além disso, foram observadas drusas, cristais de oxalato de cálcio, no parênquima lacunoso e em menores quantidades no parênquima paliçádico (Figuras 6C, 6D e 6E).

Ao realizar os testes histoquímicos dos cortes transversais das folhas de plântulas cultivadas em diferentes níveis de trocas gasosas, foram detectadas

variações no conteúdo de amido, polissacarídeos e pectinas, enquanto que a presença de lipídeos e proteínas foi similar em todos os tratamentos (Figura 7).

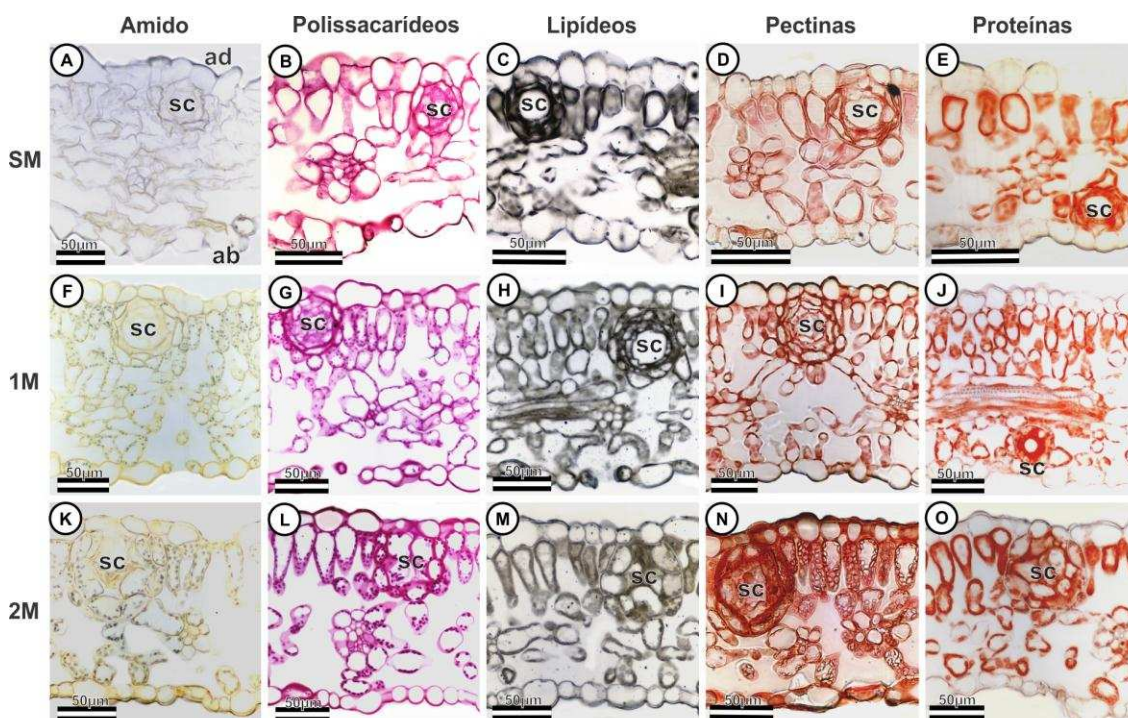


Figura 7. Efeito do nível de trocas gasosas sobre a produção de metabólitos em folhas de vitoplantas de *Ruta graveolens*. **A, F e K.** Amido (lugol); **B, G, L.** Polissacarídeos neutros (Schiff/ácido periódico, PAS); **C, H, M.** Lipídeos totais (sudán black B). **D, I, N.** Pectinas (vermelho de rutênio); **E, J, O.** Proteínas (xilidina ponceau, XP). **SM:** tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana; **1M:** TRP com uma membrana; **2M:** TRP com duas membranas; **ad:** face adaxial; **ab:** face abaxial; **sc:** cavidade secretora.

Grãos de amido foram observados somente nas folhas das plantas dos tratamentos 1M e 2M (Figuras 7A, 7F e 7K), sendo observado maior estímulo da biossíntese de polissacarídeos (Figuras 7B, 7G e 7L), no entanto, sua produção foi menor comparada com folhas de plantas adultas (Figuras 6A e 6B). Houve maior presença de pectinas nas células das folhas no tratamento 2M (Figura 7N), seguido do 1M (Figura 7I) e menor produção no tratamento SM (Figuras 7D).

Ao comparar as folhas das plântulas expostas a diferentes níveis de irradiância ($30, 31$ e $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de lipídios, pectinas e proteínas, os quais foram detectados principalmente nos parênquimas paliçádico e lacunoso, no lúmen e

nas células epiteliais das cavidades secretoras e nas paredes das células dos feixes vasculares (Figura 8). A presença de amido somente foi observada nas folhas do tratamento 4L (Figura 8K) e houve maior abundância de polissacarídeos nas células epiteliais da cavidade secretora e na parede celular das demais células (Figuras 8B, 8G e 8L).

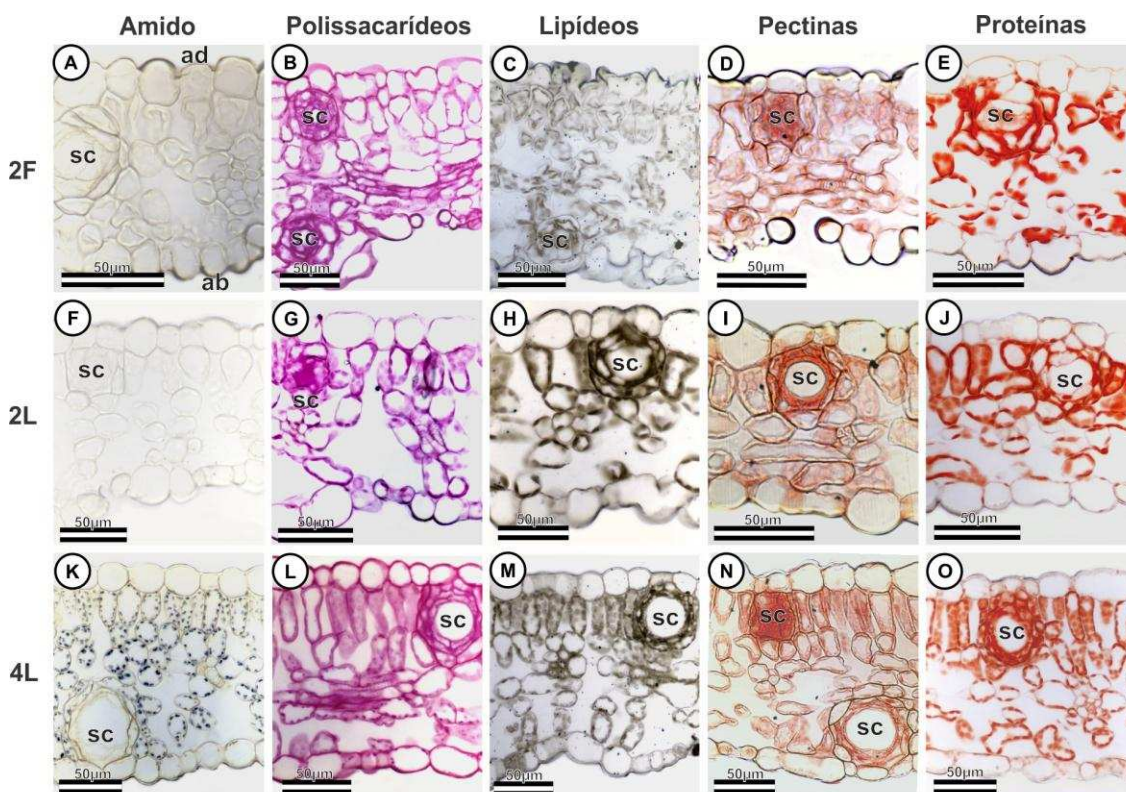


Figura 8. Efeito da irradiância e do tipo de lâmpada utilizada sobre a produção de metabólitos em folhas de vitroplantas de *Ruta graveolens*. **A, F e K.** Amido (lugol); **B, G, L.** Polissacarídeos neutros (Schiff/ácido periódico, PAS); **C, H, M.** Lipídeos totais (sudan black B). **D, I, N.** Pectinas (vermelho de rutênio); **E, J, O.** Proteínas (xilidine ponceau, XP). **2F:** 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **2L:** 2 lâmpadas LED ($31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **4L:** 4 LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **ad:** face adaxial; **ab:** face abaxial; **sc:** cavidade secretora.

Similarmente às plantas adultas de *R. graveolens*, foram observados fosfolipídios compondo todas as células, assim como no lúmen e no epitélio das cavidades secretoras das folhas de plântulas expostas a diferentes níveis de trocas gasosas e irradiância; entretanto, não foram detectados lipídeos na cutícula (Figuras 7C, 7H, 7M, 8C, 8H e 8M). Corpos proteicos foram observados nas células do parênquima paliçádico e esponjoso, nos feixes vasculares e principalmente nas células que compõem as cavidades

secretoras, nas folhas das plântulas obtidas nos seis tratamentos avaliados (Figuras 7E, 7J, 7O, 8E, 8J, 8O).

Quanto à presença de alcaloides nas plântulas de *R. graveolens* crescidas sob diferentes níveis de trocas gasosas e irradiância, foram observadas reações positivas ao reagente de Wagner em algumas das cavidades secretoras das folhas (Figura 9A) nos tratamentos SM e 2F. Nos caules (tratamentos 1M, 2M, 2F e 2L) foram observados em algumas das células epidérmicas (Figura 9B) e em raízes (tratamentos SM, 2M e 2F), detectados dos pelos absorventes (Figura 9C), no parênquima cortical, na endoderme e no periciclo (Figura 9D). Porém, não foi possível estabelecer, pelos testes histoquímicos, qual ambiente estimulou a maior produção desse metabólito, devido ao baixo conteúdo evidenciado nos tecidos.

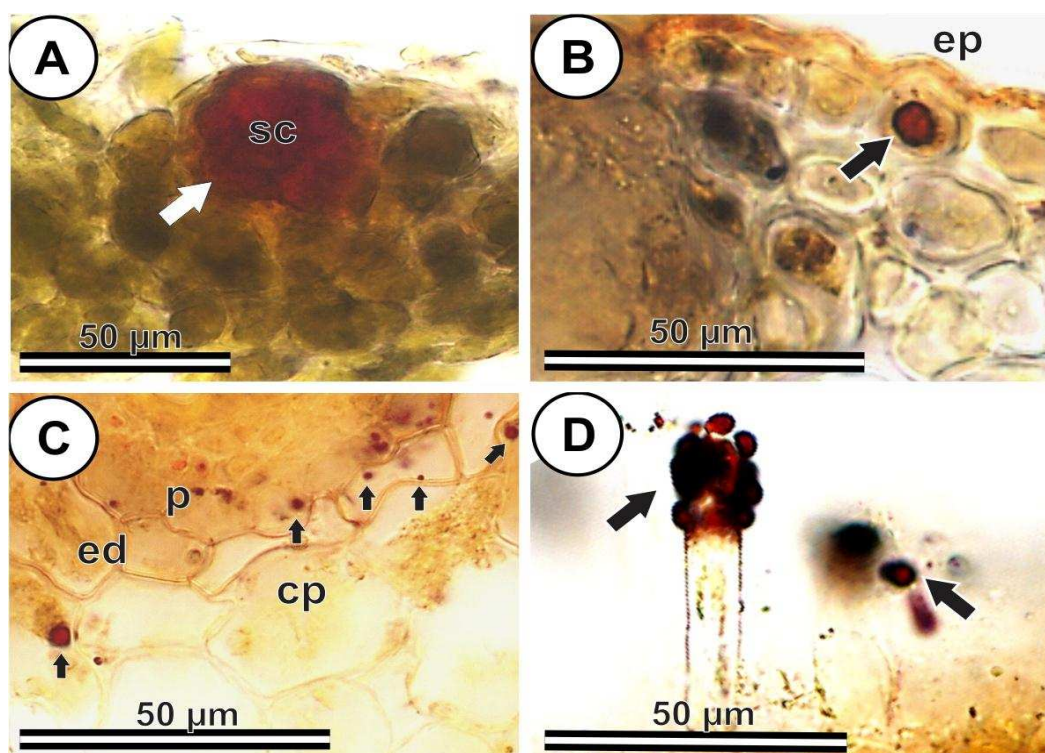


Figura 9. Cortes transversais de folha (A), caule (B) e raiz (C e D) de plântulas de *R. graveolens* germinadas *in vitro* (tratamentos 1M, 2M, 2F e 2L) com reação positiva para alcaloides (reagente de Wagner); **sc**: cavidade secretora; **ep**: epiderme; **p**: periciclo; **ed**: endoderme; **cp**: parênquima cortical; **sc**: cavidade secretora.

3.3.2 Prospecção fitoquímica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Em total foram obtidos 36 extratos etanólicos provenientes de raízes, caules e folhas de plântulas produzidas nos tratamentos 2FSM, 2F1M, 4LSM e 4L1M. Os extratos provindos das raízes apresentaram consistência mais viscosa e colorações claras (alaranjada, amarela e marrom) em comparação com os obtidos de caules e folhas, os quais foram de cor verde, marrom e café-escuro. Todos os extratos foram parcialmente solúveis em água, etanol, clorofórmio e hexano, indicando a presença de compostos de polaridade e natureza diferentes.

Por meio da CCD foi confirmada a presença de alcaloides, cumarinas, compostos antracênicos como antronas e antranolas, terpenos (provavelmente do tipo dos monoterpenos), saponinas e flavonoides da classe das isoflavonas, catequinas, flavononas, flavonas e flavonóis, chalconas e auronas, principalmente nas partes aéreas das plântulas (Tabela 6).

Os alcaloides foram mais abundantes em folhas independentemente das condições de cultivo, enquanto que, em caules, os tratamentos nos quais foram utilizadas tampas com uma membrana seu acúmulo ou sua biossíntese decresceram (Tabela 6). Além disso, as raízes foram as que evidenciaram os menores níveis de alcaloides e de outros metabólitos secundários como cumarinas, compostos antracênicos e flavonoides.

No caso dos flavonoides, houve menor presença de isoflavonas nas raízes (em todos os tratamentos) e nas folhas de plântulas mantidas em recipientes com tampa sem membrana (2FSM e 4LSM). As catequinas e flavononas foram mais abundantes em folhas e raízes (exceto nas raízes do tratamento 4L1M), e as chalconas e auronas em folhas dos tratamentos 4LSM e 2F1M. As flavonas e os flavonóis foram os menos abundantes, estando ausentes em raízes e sendo produzidos principalmente em caules nos tratamentos FSM e 4LSM.

Tabela 6. Prospecção fitoquímica de extratos de folha, caule e raiz de vitroplantas de *Ruta graveolens* mediante cromatografia em camada delgada (CCD)

Extrato	Núcleo fitoquímico								
	Alcaloides	Cumarinas	Compostos antracênicos	Saponinas	IF	Flavonoides Ca Fn	F Fv	Ch-A	Esteróides e triterpenos
4LSM-F	+++	+++	+++	++	++	+++	+	+++	++
4L1M-F	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+
2FSM-F	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	++	+
2F1M-F	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+
4LSM-C	+++	++	+++	+	+++	+	++	++	++
4L1M-C	++	++	+++	+	+++	+	+	+	++
2FSM-C	+++	++	+++	++	+++	+	++	++	+++
2F1M-C	++	++	+++	+++	+++	+	+	++	++
4LSM-R	+	+	+	+++	++	+++	-	+	+++
4L1M-R	+	+	+	+++	+	+	-	+	++
2FSM-R	+	+	+	+++	++	+++	-	+	++
2F1M-R	+	+	+	+++	++	+++	-	+	+++

4LSM: 4 lâmpadas LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sem membrana; **4L1M:** 4 lâmpadas LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 1 membrana; **2FSM:** 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sem membrana; **2F1M:** 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 1 membrana; **F:** Folha; **C:** Caule; **R:** Raiz; **IF:** Isoflavonas; **Ca:** Catequinas; **Fn:** Flavononas; **F:** Flavonas; **Fv:** Flavonóis; **Ch-A:** Chalconas- Auronas

(-): Ausência (+): Presença moderada (++) Presença intermedia (+++): Presença abundante

Os diferentes tratamentos avaliados aparentemente não tiveram efeito significativo na síntese de metabólitos como cumarinas e compostos antracênicos, já que ao comparar os resultados das folhas, caules e raízes das plântulas obtidas sob diferentes condições não houve diferença em seus níveis, mas sim entre órgãos em um mesmo tratamento. As cumarinas foram mais abundantes em folhas e os compostos antracênicos tanto em folhas como em caules (Tabela 6).

As saponinas foram produzidas em menor quantidade em caules, excetuando os provenientes de plântulas mantidas sob irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes) em frascos com tampas com membrana (2F1M), e nas folhas expostas a 4 lâmpadas LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em frascos sem membrana (4LSM). Raízes obtidas nos tratamentos 4LSM e 2F1M, e caules do 2FSM, produziram maior quantidade de esteróis, esteróides e similares, os quais foram sintetizados em menor quantidade nas folhas

3.3.3 Perfil cromatográfico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.3.3.1 Perfil cromatográfico de alcaloides

Ao comparar os cromatogramas das amostras de folha, caule e raiz de plântulas de *R. graveolens*, no comprimento de onda de 275 nm para a quantificação de alcaloides, pode-se observar que nos caules e nas folhas de plântulas do tratamento 2F1M houve maior número de picos comparado com o obtido no tratamento 4L1M. As amostras analisadas apresentaram alguns picos de tempos de retenção (Tr) similares, com exceção do caule em 4L1M, destacando-se três compostos com Tr próximos a 3, 8 e 15 min, como os componentes majoritários em três das amostras.

É nítida a diferença na concentração de alguns compostos, evidenciado pela área dos picos (Tabela 7). O tratamento 2F1M, tanto para folhas quanto para caule, apresentou maior área em quase todos os picos. O perfil cromatográfico pode ser observado nas figuras 11 e 12.

Tabela 7. Áreas e tempos de retenção de alguns dos compostos detectados por CLAE durante o análise para quantificação de alcaloides em plântulas de *R. graveolens*.

Pico Nº	Tr (min)	Área do pico por tratamento					
		2F1M-C	4L1M-C	2F1M-F	4L1M-F	2F1M-R	4L1M-R
1	2,86 2,9	-	328313	155523	382853	602414	392517
2	3,1	255504	5514	-	-	-	-
3	3,2	154144	7412	1005269	1034594	240806	132747
4	4,29	-	698808	-	-	-	-
5	4,36 4,39	664192	961873	541519	669254	1071451	600193
6	4,84	-	2094380	-	-	-	-
7	5,06	1184891	-	-	-	721689	535552
8	5,24	-	1169708	620333	738208	-	-
9	6,01	-	1160271	-	-	-	-
10	6,2	-	255324	389018	516199	313944	361085
11	7,5 7,6	56360	346631	89285	75697	643981	425606
12	8,89	1515482	-	3453867	3119038	-	-
13	9,04	-	-	-	-	1808386	1005155
14	10,6 10,8	98781	-	187146	174021	1067534	531196
15	15,6 15,8	1529825	-	3851530	2782014	203325	68879

Tr: tempo de retenção; **2F1M**: 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 1 membrana; **4L1M**: 4 lâmpadas LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 1 membrana; **F**: Folha; **C**: Caule; **R**: Raiz.

O perfil cromatográfico dos extratos radiculares dos tratamentos 2F1M e 4L1M foi semelhante, com picos maioritários em Tr próximo a 2,9; 4,3; 9,05 e 10,8 min (Figura 13), os quais foram produzidos em quantidades similares em ambos os tratamentos. No entanto, as raízes em 2F1M exibiram maior área na maioria dos picos (Tabela 7). Além disso, em ambos os tratamentos, foram detectados picos com Tr de 7,6 e 9,04, os quais estiveram ausentes em caules e folhas.

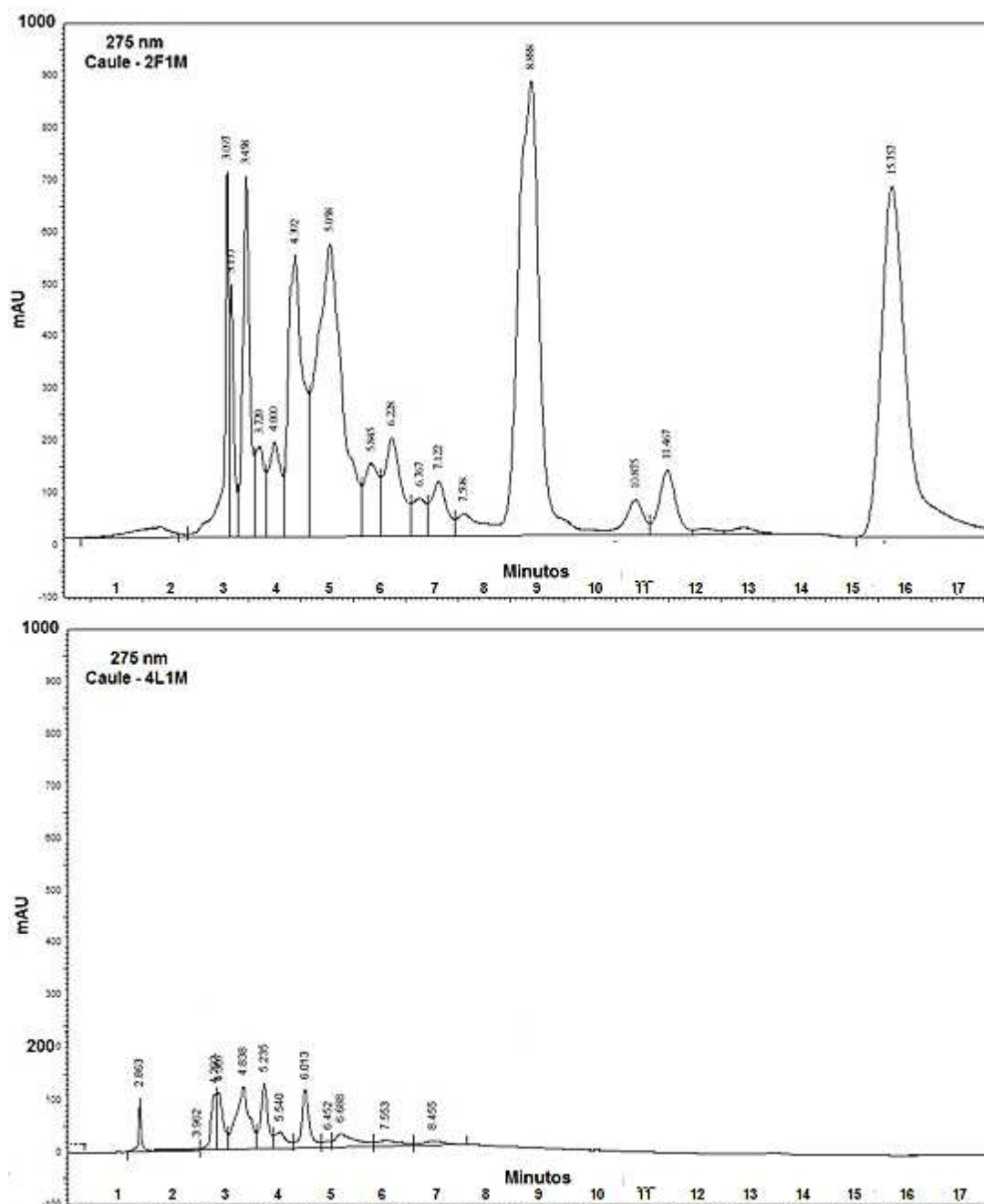


Figura 11. Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de alcaloides de extratos etanólicos de caules de plântulas de *R. graveolens*. Detector UV/visível a 275 nm, coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μm), fase móvel: acetonitrila:metanol:água (10:45:45), fluxo 0,6 mL min⁻¹ e tempo de corrida 30 min. **2F1M:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) com uma membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂) 21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$] + 2 lâmpadas fluorescentes (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **4L1M:** TTCO₂ de 21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ + 4 LED (41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

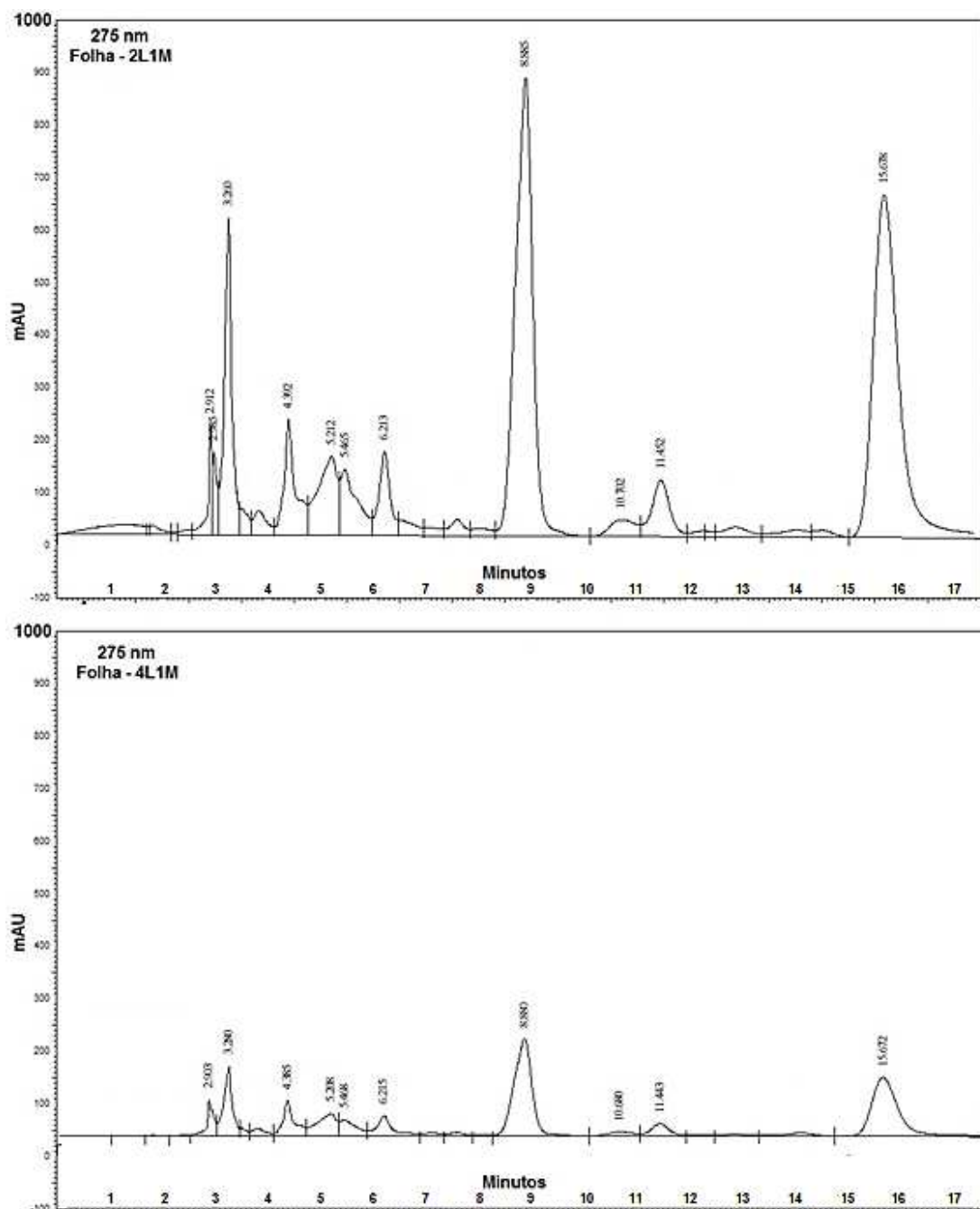


Figura 12. Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de alcaloides de extratos etanólicos de folhas de plântulas de *R. graveolens*. Detector UV/visível a 275 nm, coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m), fase móvel: acetonitrila:metanol:água (10:45:45), fluxo 0,6 mL min⁻¹ e tempo de corrida 30 min. **2F1M:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) com uma membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂) 21 μ L L⁻¹ s⁻¹] + 2 lâmpadas fluorescentes (30 μ mol m⁻² s⁻¹); **4L1M:** TTCO₂ de 21 μ L L⁻¹ s⁻¹ + 4 LED (41 μ mol m⁻² s⁻¹).

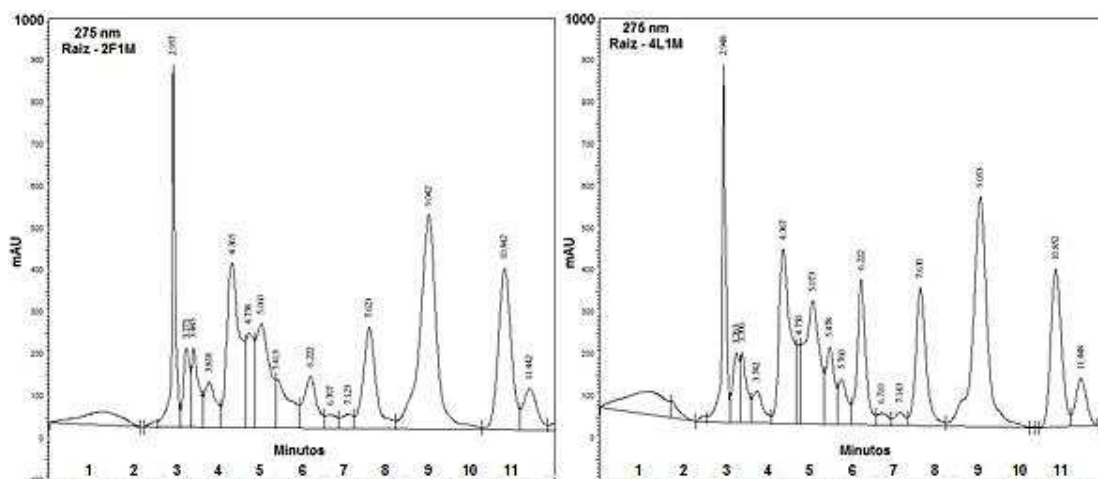


Figura 13. Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de alcaloides de extratos etanólicos de raízes de plântulas de *R. graveolens*. Detector UV/visível a 275 nm, coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m), fase móvel: acetonitrila:metanol:água (10:45:45), fluxo 0,6 mL min⁻¹ e tempo de corrida 30 min. **2F1M:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) com uma membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂) 21 μ L L⁻¹ s⁻¹] + 2 lâmpadas fluorescentes (30 μ mol m⁻² s⁻¹); **4L1M:** TTCO₂ de 21 μ L L⁻¹ s⁻¹ + 4 LED (41 μ mol m⁻² s⁻¹).

3.3.3.2 Perfil cromatográfico de cumarinas

Quanto ao perfil cromatográfico das amostras utilizando a metodologia para a quantificação de cumarinas, de modo geral, foram obtidos picos com tempos de retenção (Tr) similares em todas as amostras. No caso dos caules, foram detectados dois picos maioritários com Tr de 4,3 e 5,2, sendo mais abundante o primeiro (Figura 14). A maioria dos picos apresentaram concentrações superiores nos caules de 2F1M (Tabela 8).

Em folhas, os sinais maioritários apareceram nos Tr de 4,2, 4,3 (possivelmente trata-se de compostos com características similares, cuja concentração foi mais alta no tratamento 4L1M) e 5,2 min, sendo mais abundante em folhas do tratamento 2F1M (figura 15).

Nas raízes de ambos os tratamentos avaliados (2F1M e 4L1M), foram detectados outros compostos com Tr de 2,9, 6,8 e 8,4 min, sendo mais abundantes no tratamento 2F1M (Figura 16). Além disso, com base na área do pico em Tr de 4,3 pode-se perceber que foi o mais produzido nas raízes, principalmente em 2F1M, cuja área do pico foi similar a apresentada nos

caules; no entanto, o composto com Tr 5,5 foi mais acumulado em raízes que em caules e folhas (Tabela 8).

Tabela 8. Áreas e tempos de retenção de alguns dos compostos detectados por CLAE durante o análise para quantificação de cumarinas em plântulas de *R. graveolens*.

Pico N°	Tr (min)	Área do pico por tratamento					
		2F1M-C	4L1M-C	2F1M-F	4L1M-F	2F1M-R	4L1M-R
1	2,9	-	-	247001	296297	1688552	1585266
2	3,1	404974	540193	-	-	-	-
3	4,2	-	-	2290172	2459181	-	-
4	4,3	6513385	5128149	4246372	4783786	5459754	4025584
5	4,8	-	-	-	-	1611233	1275468
6	5,2	1950999	1447959	5286139	4624796	618170	571099
7	5,5	524420	359957	1220547	1071149	1765908	1297320
8	6,0	310150	199284	771153	563809	514967	243782
9	6,8	101754	-	-	-	883673	648608
10	7,0	-	-	2025941	1427032	-	-
11	7,2	545922	-	-	-	517239	328565
12	7,4	-	714275	-	-	-	-
13	7,5	293109	-	-	282373	-	-
14	8,4	-	-	-	-	883767	375762
15	8,5	556296	357187	572950	515974	-	-
16	10,2	-	227938	-	-	45197	33012

Tr: tempo de retenção; **2F1M**: 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 1 membrana; **4L1M**: 4 lâmpadas LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 1 membrana; **F**: Folha; **C**: Caule; **R**: Raiz.

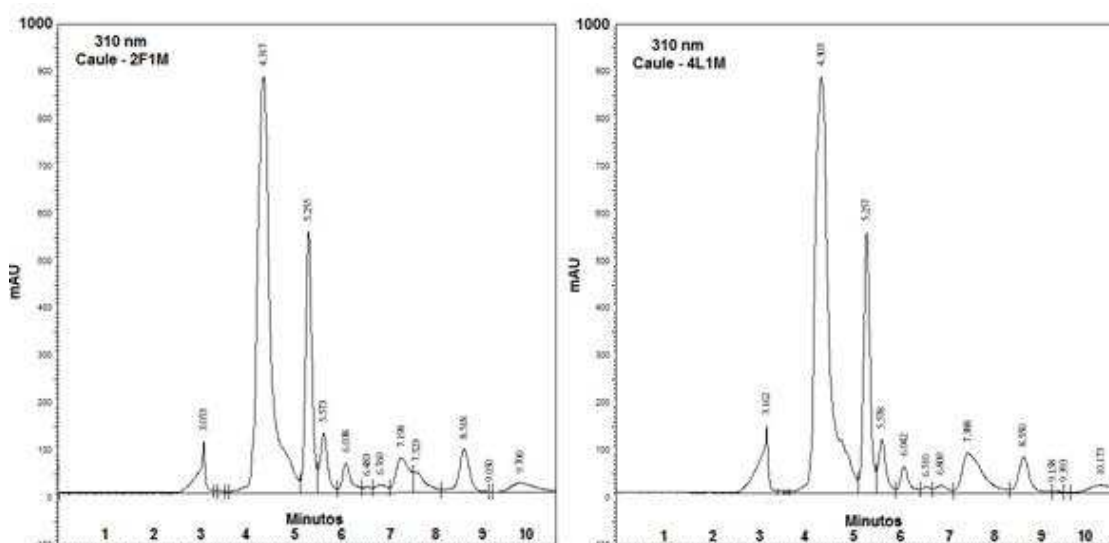


Figura 14. Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de cumarinas de extratos etanólicos de caules de plântulas de *R. graveolens*. Detector UV/visível a 310 nm, coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μm), fase móvel: (A) acetonitrila/metanol/água (30:30:40) e (B) acetonitrila/metanol (50:50), com proporções de A/B de 50:50, fluxo $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de corrida 30 min. **2F1M**: Tampas rígidas de polipropileno (TRP) com uma membrana [taxa de troca de CO_2 (TTCO_2) $21 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$] + 2 lâmpadas fluorescentes ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **4L1M**: TTCO_2 de $21 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ + 4 LED ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

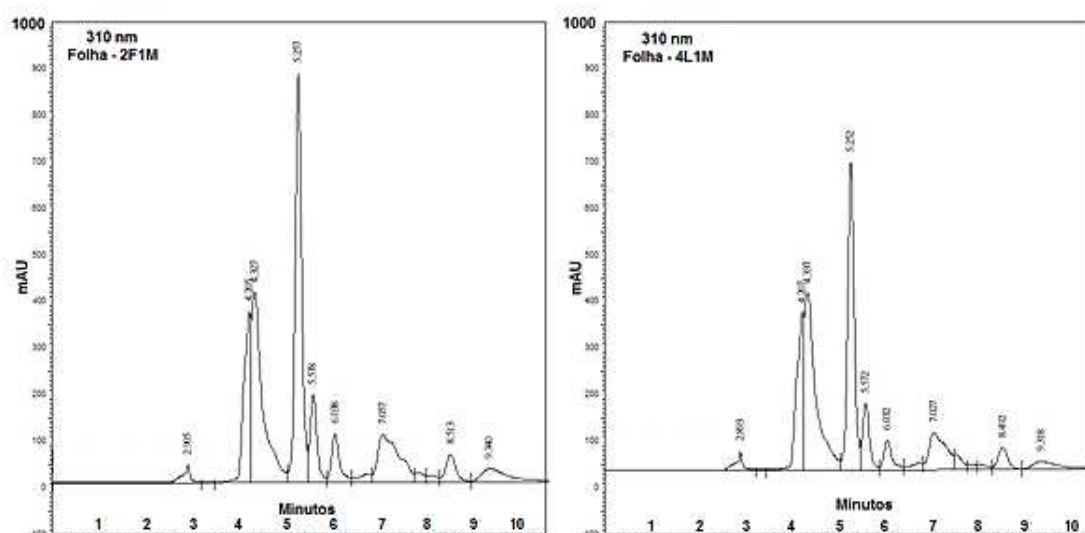


Figura 15. Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de cumarinas de extratos etanólicos de folhas de plântulas de *R. graveolens*. Detector UV/visível a 310 nm, coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m), fase móvel: (A) acetonitrila/metanol/água (30:30:40) e (B) acetonitrila/metanol (50:50), com proporções de A/B de 50:50, fluxo 0,6 mL min⁻¹ e tempo de corrida 30 min. **2F1M:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) com uma membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂) 21 μ L L⁻¹ s⁻¹] + 2 lâmpadas fluorescentes (30 μ mol m⁻² s⁻¹); **4L1M:** TTCO₂ de 21 μ L L⁻¹ s⁻¹ + 4 LED (41 μ mol m⁻² s⁻¹).

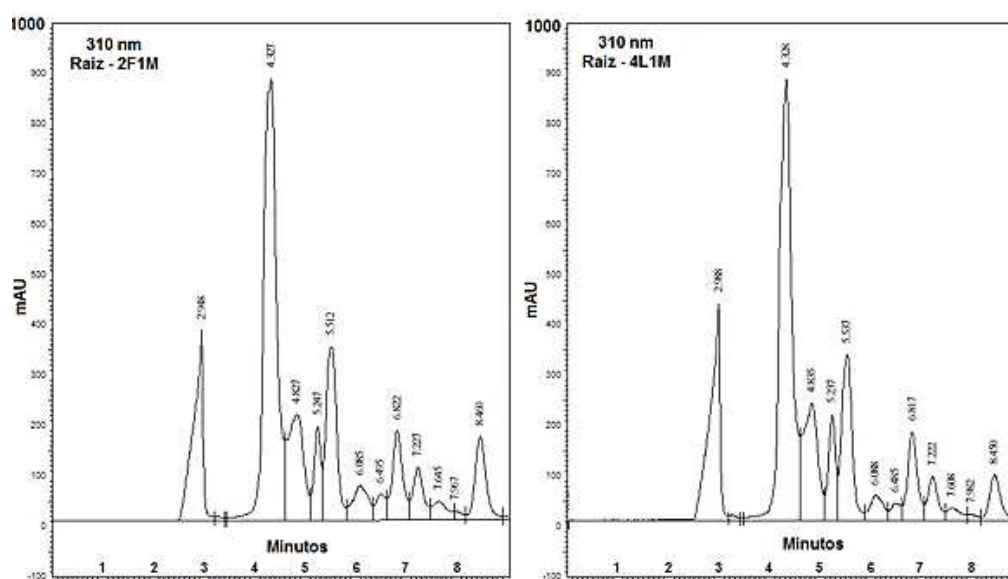


Figura 16. Perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de cumarinas de extratos etanólicos de raízes de plântulas de *R. graveolens*. Detector UV/visível a 310 nm, coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m), fase móvel: (A) acetonitrila/metanol/água (30:30:40) e (B) acetonitrila/metanol (50:50), com proporções de A/B de 50:50, fluxo 0,6 mL min⁻¹ e tempo de corrida 30 min. **2F1M:** Tampas rígidas de polipropileno (TRP) com uma membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂) 21 μ L L⁻¹ s⁻¹] + 2 lâmpadas fluorescentes (30 μ mol m⁻² s⁻¹); **4L1M:** TTCO₂ de 21 μ L L⁻¹ s⁻¹ + 4 LED (41 μ mol m⁻² s⁻¹).

4. DISCUSSÃO

4.1 Níveis de trocas gasosas alteram o desenvolvimento e a morfologia de plântulas *in vitro* de *Ruta graveolens*

Neste trabalho, maiores trocas gasosas propiciaram variações nas características morfológicas, no crescimento e no desenvolvimento de plântulas de *R. graveolens*, afetando, ao mesmo tempo, sua taxa de sobrevivência quando transferidas as condições *ex vitro*. Resultados similares foram reportados em plântulas de *Scrophularia yoshimurae* (Tsay et al. 2006; Chen et al. 2006) e *Kniphofia leucocephala* (McCartan et al. 2004). Além disso, similar ao encontrado neste trabalho, Mohamed e Alsadon (2012) tinham reportado que a ventilação durante o cultivo *in vitro* de brotos de *R. graveolens* aumentou o índice de crescimento, o conteúdo de pigmentos fotossintéticos e a massa fresca e seca dos brotos.

O efeito dos diferentes níveis de trocas gasosas sobre a morfologia das folhas de *R. graveolens* corrobora com o reportado para plântulas de *Dianthus caryophyllus* cv. Nelken (Majada et al. 2000), *Solanum tuberosum* (cv. Sandy) (Mohamed e Alsadon, 2010), *Nicotiana tabacum* e *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. (Zobayed et al. 2001), as quais apresentaram cutícula mais espessa, células e espaços intercelulares menores, parênquima paliçádico mais definido e mesofilo homogêneo concomitante ao aumento da taxa de ventilação no cultivo.

O desenvolvimento das plântulas de *R. graveolens* não foi diretamente proporcional ao aumento dos níveis de ventilação, sendo necessárias taxas de trocas de CO₂ intermediárias (21 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$, 1M) para atingir melhor crescimento, alto conteúdo de clorofilas *a* e *b* e carotenoides e pouca alteração morfológica nas folhas. Estes resultados corroboram com o relatado por Mohamed e Alsadon (2012), ao determinar que a relação do crescimento *in vitro* de *R. graveolens* com os diferentes níveis de ventilação não foi linear, havendo uma taxa de intercambio gasoso ótima. Do mesmo modo que para brotos de *Simmondsia chinensis*, nos quais níveis de ventilação intermediários estimularam mais o desenvolvimento (Mills et al. 2004).

É possível que em resposta as altas trocas gasosas do tratamento 2M, as quais levaram à rápida dessecação do meio de cultivo induzindo estresse hídrico, os tecidos de *R. graveolens* sintetizaram e/ou acumularam compostos que diminuíram seu crescimento, como o ácido abscísico (ABA), hormônio chave na mediação da resposta das plantas a dito tipo de estresse (Mills et al. 2004).

Embora, o tratamento SM tenha apresentado alto nível de umidade relativa dentro do recipiente de cultivo, foi mais efetivo que o tratamento 2M no crescimento e desenvolvimento das plântulas de *R. graveolens* durante o processo *in vitro* e o período de aclimatização; contrário ao reportado por Jeon et al. (2006), em que a alta umidade relativa dentro do recipiente de cultivo reduziu a taxa de transpiração de orquídeas do gênero *Doritaenopsis* 'NewCandy', limitando sua adaptação durante a aclimatização às condições *ex vitro*.

A baixa densidade estomática foi uma das características associadas ao sucesso da adaptação às condições *ex vitro* de plântulas *in vitro* como: *Capsicum annuum* (Mohamed e Alsadon 2011) e *Solanum tuberosum* (cv. Sandy) (Mohamed e Alsadon 2010). Porém, no presente estudo, o maior índice estomático observado nas plântulas de *R. graveolens* no tratamento 1M, não afetou sua aclimatização, mas provavelmente sim à morfologia dos estômatos, os quais foram mais elípticos à medida que aumentaram os níveis de trocas gasosas, similar ao reportado para plântulas de *Annona glabra* L (Annonaceae) (Deccetti et al. 2008), *Solanum tuberosum* (cv. Sandy) (Mohamed e Alsadon, 2010), *Nicotiana tabacum* e *Brassica oleracea* (Zobayed et al. 2001). Assim, estômatos mais elípticos são característicos dos tecidos *in vivo*, em que possuem função normal, em contraste com os ovalados que são menos funcionais (Khan et al. 2003).

4.2 Irradiância e o tipo de lâmpada utilizada afetam diferentes parâmetros de crescimento e características morfológicas de plântulas *in vitro* de *Ruta graveolens*.

As diferentes qualidades de luz avaliadas neste trabalho não afetaram a porcentagem de germinação de sementes de *R. graveolens*, obtendo resultados similares aos reportados por Yamashita et al. (2009) para a germinação de sementes desta mesma espécie, a qual foi afetada somente quando variou a temperatura ou o potencial osmótico do meio de cultivo.

Além disso, o nível de irradiância e não o tipo de lâmpada utilizada influenciou na variação de alguns dos parâmetros de crescimento das plântulas germinadas *in vitro* de *R. graveolens*. Porém, independentemente do tratamento, as plântulas aclimatadas exibiram comprimentos e número de folhas similares, não havendo diferenças na taxa de sobrevivência as condições *ex vitro*. Contrário ao reportado para plântulas de *Lactuca sativa* L., e *Brassica napus* L., cujo crescimento foi afetado pelo tipo de lâmpada empregada, sendo mais eficientes as lâmpadas LEDs que as fluorescentes (Lin et al. 2013; Li et al. 2013).

No entanto, o tipo de lâmpada utilizada afetou a produção de pigmentos fotossintéticos nas plântulas de *R. graveolens*, sendo mais estimulada pelas lâmpadas LEDs. Resultados similares foram reportados em plântulas de *Seyval blanc* (Seibel 4995 x Seibel 4986) e de *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* (Düring e Harst, 1996), *Phyllanthus tenellus* Roxb (Victório et al. 2007), *Pisum sativum* L (Wu et al. 2007) e *Brassica napus* L (Li et al. 2013). As lâmpadas LEDs ao produzir fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) ou irradiância com comprimentos de onda específicos, principalmente luz azul e vermelha, cujos picos de emissão coincidem com os picos de absorção das clorofilas *a* e *b*, estimulam a atividade fotossintética e o crescimento de plântulas *in vitro* (Kim et al. 2004; Park et al. 2013; Kaewjampa e Shimasaki 2012).

Ao aumentar o nível de irradiância ($41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a folha de *R. graveolens* apresentou melhor desenvolvimento estrutural, com características similares às das folhas de plantas adultas (*ex vitro*). Porém, a epiderme

demonstrou-se mais susceptível a deformações e alterações morfológicas, possivelmente por deposição irregular dos componentes de parede celular das células epidérmicas. Outros autores relataram que ao utilizar lâmpadas LED monocromáticas (azuis ou vermelhas) e luz branca, foram induzidas mudanças, por exemplo, no número de estômatos, na espessura do parênquima paliçádico e esponjoso, e no arranjo das células no mesofilo em folhas de plântulas de espécies como *Cattleya intermedia* × *C. aurantiaca* (Orchidaceae) (Cybularz-Urban, 2007) e *Alternanthera brasiliana* Kuntze (Amaranthaceae) (Macedo et al. 2011). Todavia, assim como em *R. graveolens*, em folhas de plântulas de *Glycyrrhiza uralensis* Fisch a deformação das células epidérmicas aumentaram com alta irradiância (Hou et al. 2010).

Similarmente ao ocorrido com as folhas das vitroplantas de *R. graveolens*, o efeito dos diferentes níveis de irradiância sobre os tecidos, também tem sido observado em plantas crescidas em condições *ex vitro*. Em folhas de *Raulinoa echinata*, por exemplo, foram observadas diferenças na área foliar e na espessura dos tecidos do mesofilo dependendo da intensidade de exposição ao sol, sendo que o parênquima paliçádico foi mais espesso com o aumento da intensidade luminosa (Arioli et al. 2008). Em plântulas de *Gevuina avellana*, altas irradiâncias em conjunto com sistemas de ventilação também estimularam a formação de mesofilo e de parênquima paliçádico mais organizado (Alvarez et al. 2012).

4.3 Caraterísticas anatômicas das folhas de plântulas *in vitro* de *Ruta graveolens* foram similares às das folhas de plantas *ex vitro*.

As caraterísticas anatômicas observadas nas folhas de plantas de *R. graveolens* tanto em condições *ex vitro* (controle) como *in vitro*, tais como mesofilo heterogêneo, dorsiventral, com duas camadas de parênquima paliçádico, presença de cavidades secretoras, tricomas globulares, epiderme unisseriada e anfiestomática (com menor número de estômatos na face adaxial), corroboram com o reportado por Metcalfe e Chalk (1950), Nazish et al. (2010) e Cavalcante (2003). No entanto, diferem do citado por Dhale et al. (2010) quanto a presença de estômatos, em que reportaram que a folha é hipoestomática.

As cavidades secretoras observadas em *R. graveolens*, cuja origem é do tipo esquizolisígeno, tinham sido descritas inicialmente por Haberlandt (1914), e são comumente descritas em outras espécies das famílias Rutaceae, Myrtaceae e Rubiaceae, as quais podem apresentar ontogenia distinta (esquizogênese, lisogênese e esquizolisogênese) (Bosabalidis e Tsekos, 1982; Turner 1999; Ascensão 2007; Armstrong et al. 2012). De acordo com Haberlandt (1914), Cavalcante (2003) e Kalachanis e Psaras (2005), as estruturas observadas na epiderme de ambas as faces da folha associadas às cavidades secretoras (Figura 1B), são células epidérmicas modificadas que formam uma abertura similar aos poros estomáticos, provavelmente com um mecanismo de abertura próprio, onde as células epidérmicas estão diretamente associadas à cavidade, fracamente ligadas pelas paredes anticlinais, regulando a abertura e assim liberando o óleo essencial volátil armazenado.

4.4 Características histoquímicas de plântulas *in vitro* de *R. graveolens* variam dependendo das condições de cultivo diferindo no conteúdo de metabólitos quando comparadas com plantas *ex vitro*

Quanto aos resultados das análises histoquímicas, a presença de amido, polissacarídeos, pectinas, proteínas e lipídeos nas diferentes partes da folha de plantas adultas de *R. graveolens* em condições *ex vitro* (controle), corroboram com o reportado por Cavalcante (2003), Duarte (2007) e Dhale et al. (2010), para esta espécie, os quais também observaram a presença de alcaloides, saponinas, taninos e antocianinas.

O menor conteúdo de amido nas plântulas de *R. graveolens* obtidas *in vitro*, em comparação com o controle, estão de acordo com o trabalho de Alvarez et al. (2012) para vitroplantas de *Gevuina avellana* quando comparadas com plantas mantidas em casa de vegetação. Segundo os resultados obtidos neste trabalho, nas plântulas de *R. graveolens* cultivadas em recipiente fechados, onde há menor TTCO_2 ($14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$), a biossíntese de carboidratos é reduzida, o qual também foi reportado por Mingozzi et al. (2011) em brotos de *Cydonia oblonga* Mill. Já a produção de carboidratos em *R. graveolens* não foi afetada significativamente pelas mudanças na irradiância, o qual tinha sido observado em plântulas de *Quillaja brasiliensis* por Costa et al. (2013).

O conteúdo de polissacarídeos, proteínas e pectinas observado nas cavidades secretoras das folhas de *R. graveolens*, independente das condições de cultivo utilizadas, corrobora com o reportado por Monteiro et al. (1995) para plantas de *Porophyllum lanceolatum* (Asteraceae), cujas cavidades secretoras apresentaram alto conteúdo de proteínas, polissacarídeos pécnicos e compostos fenólicos no epitélio, e lipídeos, polissacarídeos pécnicos e compostos fenólicos no lúmen. Esses autores relataram que a presença destes metabólitos é maior quando a cavidade encontra-se nas faces iniciais de desenvolvimento e diminui à medida que atinge a maturidade, enquanto que a coloração para lipídeos é intensa em todos os estágios de desenvolvimento.

Junghanns *et al.* (1995) e Junghanns *et al.* (1998), trabalhando com plântulas de oito meses de idade de *R. graveolens* detectaram alcaloides acridônicos, principalmente nos idioblastos, em células parenquimáticas do tecido protetor da raiz (rizoderme ou hipoderme) e nos pelos absorventes, porém em caules e folhas foram menos observados indicando que a raiz poderia ser o sítio primário de sua síntese com posterior translocação para os brotos. No entanto, neste trabalho, evidenciaram-se os alcaloides principalmente nas cavidades secretoras das folhas, indicando que possivelmente nas condições de cultivo utilizadas, os alcaloides já tenham sido transloucados para as partes aéreas (no caso de alcaloides acridônicos), ou que tenham sido produzidos outros tipos de alcaloides nas cavidades secretoras.

4.5 Níveis de trocas gasosas apresentam maior efeito sobre o crescimento e desenvolvimento de plântulas *in vitro* de *R. graveolens* que a irradiância e o tipo de lâmpada utilizada

Ao avaliar o efeito do nível de trocas gasosas x irradiância, plântulas de *R. graveolens* cultivadas em recipientes fechados com tampas com uma membrana e sob irradiância de 30 e 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fornecida por duas e 4 lâmpadas fluorescentes e LED, tratamentos 2F1M e 4L1M, respetivamente) apresentaram maior crescimento. O qual indica que a taxa de trocas gasosas entre os tecidos cultivados *in vitro* com o ambiente externo, influenciaram em

maior grau seu desenvolvimento que as condições de luz avaliadas em este trabalho.

Assim mesmo, o índice estomático das folhas de *R. graveolens* foi alterado principalmente pelo nível de trocas gasosas e não pela irradiância, o qual discorda do reportado em plântulas do híbrido interespecífico de Seyval blanc (Seibel 4995 x Seibel 4986) e a variedade porta-enxerto SO 4 (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*), nas que os estômatos responderam às mudanças de intensidade de luz, mas não às variações dos níveis de CO₂ dentro do recipiente de cultivo (Düring e Harst, 1996).

Além disso, ditos tratamentos foram os que mais estimularam a produção de clorofilas *a* e *b* e carotenoides em plântulas de *R. graveolens*, contrario ao reportado por Alvarez *et al.* (2012) para plântulas de *Gevuina avellana*, em que o conteúdo de clorofilas *a* e *b* não foram afetados pelas diferentes condições de irradiância e de trocas gasosas avaliadas.

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na resposta das plântulas de *R. graveolens* cultivadas nos tratamentos 2FSM, 2F1M, 4LSM e 4L1M ao processo de aclimatização, as plântulas dos tratamentos 2F1M e 4L1M desenvolveram maior número de folhas e comprimento durante dito processo; o que concorda com os resultados obtidos quando os níveis de trocas gasosas e a irradiância foram avaliados por separado (somente as condições de vedação utilizadas influenciaram na adaptação das plântulas às condições *ex vitro*).

Estes resultados foram similares aos reportados por Deccetti *et al.* (2008), em plantas micropropagadas de *Annona glabra* L., nas que um aumento da disponibilidade de luz e de trocas gasosas melhoraram a capacidade de regulação da perda de água, favorecendo sua sobrevivência e o crescimento após a transferência para condições *ex vitro*.

4.6 Níveis de trocas gasosas e a irradiância estimulam a produção de diferentes tipos de metabólitos secundários em plântulas *in vitro* de *R. graveolens*

Os diferentes tipos de metabólitos (alcaloides, cumarinas, compostos antracênicos, terpenos, saponinas e flavonoides) identificados nos extratos etanólicos de raízes, folhas e caules das plântulas *in vitro* de *R. graveolens* obtidas nos tratamentos 2FSM, 2F1M, 4LSM e 4L1M, correlacionam com o reportado na literatura sobre a composição química de diferentes extratos, principalmente da parte aérea, desta espécie. Outros dos compostos citados são esteróis, esteróides, aminas, fenóis, taninos, proteínas, aminoácidos, carboidratos, resinas, lipídeos, mucilagem, metilcetonas e glicosídeos; sendo os alcaloides, cumarinas, flavonoides e óleos essenciais as substâncias majoritárias (Nazish *et al.*, 2009; Hamad, 2012; de Bona *et al.*, 2013).

No presente estudo, foi detectado baixo conteúdo de alcaloides nas raízes de plântulas *in vitro* de *R. graveolens*, sendo mais abundantes nas folhas. Entre os alcaloides de maior interesse produzidos em plantas de *R. graveolens* se encontram os do tipo acridônico, cujo sítio primário da síntese é a raiz, com posterior translocação para as partes aéreas (Junghanns *et al.*, 1995; Junghanns *et al.*, 1998). Provavelmente, após 45 dias de cultivo das plântulas de *R. graveolens* nos tratamentos avaliados, esses metabólitos já tenham sido transportados para as partes aéreas da planta, acumulando-se em sítios distantes do ponto de síntese ou, possivelmente, nas folhas estivessem sendo biossintetizados outro tipo de alcaloides.

Tem sido isoladas varias classes de alcaloides nas partes aéreas de plantas de *R. graveolens*, como por exemplo, quinolínicos: graveolina, graveolinina, 2-*n*-nonil-4-quinolona, 1-metil-2-nonil-4(1*H*)-quinolona, 2-heptil-4(1*H*)-quinolona, 2-octil-4(1*H*)-quinolona e 2-decil-4(1*H*)-quinolona; furoquinolínicos: kokusaginina, eskimmianina, dictamina; acridônicos: gravacridondiol, rutacridona (abundante em raízes), 1-hidroxi-*N*-metilacridona, arborinina e o epóxido de rutacridona ((Kostova *et al.* 1999; Oliva *et al.* 2003; Wu *et al.*, 2003; Meepagala *et al.* 2005).

Independentemente do tratamento avaliado em este trabalho, houve maior abundância de cumarinas e compostos antracênicos nos caules e folhas das plântulas *in vitro* de *R. graveolens*. Das folhas e raízes de *R. graveolens* tem sido isoladas cumarinas como 5-metoxipsolareno, 8-metoxipsolareno, 4-hidroxi-cumarina, bergapteno, xantotoxina, isopimpinellina, psoraleno, chalepensina, rutamarina, escopoletina e clausindina (Alliata *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2003). Além disso, extratos de tecidos *in vitro* desta espécie, apresentaram alto conteúdo de furanocumarinas, como bergapteno e fenóis, os quais atuam sobre o bloqueio de radicais livres, a redução de metais de transição e o potencial de redução do óxido nítrico (Diwan *et al.*, 2012).

É possível que as condições de luz utilizadas neste trabalho tenham estimulado de maneira distinta a atividade das enzimas e/ou a expressão dos genes envolvidos na síntese de várias classes de metabólitos secundários nas plântulas *in vitro* de *R. graveolens*, como alcaloides, flavonoides e cumarinas, produzindo quantidades variáveis de ditos compostos. Por exemplo, os alcaloides acridônicos em esta espécie são biossintetizados a partir do ácido antranílico e um policétido pela via do acetato, utilizando a enzima antranilato sintase (AS) (Maier *et al.*, 1993; Bohlmann *et al.* 1995; Roberts e Wink, 1998). Em suspensões celulares de *R. graveolens* foi demonstrado que a AS e a clorismato mutase, competem pelo clorismato para iniciar a rota biossintética de epóxidos acridônicos, furoquinolinas e furanocumarinas (Bohlmann e Eilert, 1994).

A síntese do antranilato está associada à biossíntese de vários compostos como alcaloides, flavonoides, estilbenos, stilipironas, benzofenonas e benzalacetona, e tem sido estimulada pela irradiação simultânea de luz branca e UV-B em suspensões celulares de *R. graveolens* (Lukačín *et al.*, 1999). No entanto, em trabalhos realizados por Junghanns *et al.* (1998), a produção de flavonoides em *R. graveolens* foi estimulada pela luz, enquanto que os alcaloides acridônicos foram sintetizados em maior quantidade em tecidos mantidos no escuro.

Além disso, tem sido demonstrado que a luz interfere na biossíntese de metabólitos como aminoácidos, clorofila, alcaloides e fenilpropanoides. Em

calos de *Camellia sinensis* a expressão dos genes envolvidos no metabolismo de fenilpropanoides aumentou em resposta à luz, estimulando a produção de compostos como catequinas, flavonóis, proantocianinas, antocianinas e lignina (Wang *et al.*, 2012). Enquanto que em raízes de plantas de *Arabidopsis*, o acúmulo de fenilpropanoides como os flavonoides foi estimulado pela luz, devido, em parte, pela regulação transcricional de genes que codificam a síntese da enzima chalcona que catalisa o primeiro passo da biossíntese de flavonoides (Hemm *et al.*, 2004).

Por outro lado, é possível que, além das diferentes irradiâncias proporcionadas pelas lâmpadas fluorescentes e LED empregadas neste trabalho, a diferença no espectro de luz que ambas proporcionam tenham também influenciado na biossíntese de metabólitos secundários nas plântulas de *R. graveolens*. Quando as folhas de diferentes espécies vegetais são expostas a diferentes tipos de radiação, por exemplo, à UV, são estimulados compostos fenólicos como cumarinas: psoraleno, bergapteno, e xantotoxina, umbeliferona; flavonóis e catequinas, e alcaloides tipo purina (Pavarini *et al.*, 2012).

Em alface (*Lactuca sativa* L.), lâmpadas LEDs estimularam o crescimento e a produção de metabólitos secundários; as luzes UV-A e B induziram a produção de antocianinas, a UV-B a de carotenoides e a LED vermelha a de compostos fenólicos (Li e Kubota, 2009). Enquanto que em brotos de *R. graveolens* e *R. graveolens* Divaricata aumentou-se a concentração de compostos fenólicos e furanocumarinas com mudanças qualitativas na luz; tanto a luz branca como a azul estimularam a produção de compostos fenólicos em ambas as plantas, enquanto que a produção de furanocumarinas foi estimulada pela luz azul em *R. graveolens* (1,44 vezes mais alta que em luz branca) e pelo escuro em *R. graveolens* Divaricata (Szopa *et al.*, (2012).

Embora não estabelecer qual das condições de cultivo avaliadas estimulou a maior produção de metabólitos secundários, como alcaloides e cumarinas, nas plântulas *in vitro* de *R. graveolens*, devido a que não foi possível completar a quantificação destes compostos por CLAE, ao comparar

os perfis cromatográficos dos extratos das plântulas dos tratamentos 2F1M e 4L1M (nos que se observou melhor crescimento e desenvolvimento), pode-se observar que o tratamento 2F1M foi o que apresentou maior abundância da maioria dos picos detectados. Mohamed e Ibrahim (2012) estabeleceram que a síntese de compostos bioativos em brotos de *R. graveolens* dependem da fonte de carbono, da pressão osmótica do meio e das condições de ventilação; induzindo a síntese de cumarinas e flavonoides (rutina e o principal flavonoide isolado em esta espécie) utilizando sistemas de ventilação com aproximadamente 62,83 trocas de ar por dia.

5. CONCLUSÕES

Tanto a irradiância, o tipo de lâmpada utilizada e os diferentes níveis de trocas gasosas entre o ambiente interno e externo do recipiente de cultivo, influem no crescimento, desenvolvimento e na morfologia de plântulas germinadas *in vitro* de *R. graveolens* e, pelo tanto, na sua capacidade para se adaptar às condições *ex vitro* durante o processo de aclimatização. Variáveis de crescimento como o comprimento da raiz e caule, o número de raízes e folhas, a massa seca e fresca produzida, a área foliar e o índice estomático, podem ser afetadas pelas condições de cultivo avaliadas; além da síntese de pigmentos fotossintéticos, amido, polissacarídeos, pectinas, proteínas, lipídeos e alcaloides.

Dentre as principais variações morfológicas observadas nas folhas de plântulas de *R. graveolens* se destacam deposição irregular da cutícula sobre a epiderme, estômatos pouco funcionais, diminuição na espessura do mesófilo e aumento nos espaços intercelulares. Plântulas com desenvolvimento adequado foram obtidas quando cultivadas em recipientes fechados com tampas com membrana e sob irradiância de $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas LED.

Ao avaliar o efeito dos níveis de trocas gasosas x irradiância, houve melhor desenvolvimento das plântulas ao utilizar tampas com uma membrana, independentemente da irradiância utilizada (30 e $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ditas condições de cultivo estimularam a produção de alcaloides, cumarinas, compostos antracênicos, terpenos, saponinas e flavonoides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar T.V.; Sant'Anna-Santos B.F.; Azevedo A.A.; Ferreira R.S. 2007. Anati Quanti: Quantitative Analysis Software for Plant Anatomy Studies. **Planta Daninha** 25: 649 - 659.
- Alliota G.; Cafiero G.; De Feo V.; Sacchi R. 1994. Potential allelochemicals from *Ruta graveolens* L. and their action on radish seeds. **Journal of Chemical Ecology** 20: 2761 - 2775.
- Alvarez C.; Sáez P.; Sáez K.; Sánchez-Olate M.; Ríos D. 2012. Effects of light and ventilation on physiological parameters During *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* Mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 110: 93 - 101.
- Arioli T.; Voltolini C.H.; Santos M. 2008. Morfoanatomia foliar da reófito *Raulinoa echinata* RS Cowan–Rutaceae. **Acta Botanica Brasilica** 22: 723 - 732.
- Ascensão L. 2007. Estruturas secretoras em plantas—uma abordagem morfo-anatômica. Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Curso teórico-prático, 3ª Ed., FCUL, Lisboa, 19 - 28.
- Armstrong L.; Duarte M.D.R.; Miguel O.G. 2012. Morpho-anatomy of the leaf and stem of *Eugenia pyriformis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 22: 475 - 481.
- Bohlmann J.; Eilert U. 1994. Elicitor induced secondary metabolism in *Ruta graveolens* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 38: 189 - 198.
- Bohlmann J.; DeLuca V.; Eilert U.; Martin W. 1995. Purification and cDNA cloning of anthranilate synthase from *Ruta graveolens*: modes of expression and properties of native and recombinant enzymes. **The Plant Journal** 7: 491 - 501.
- Bosabalidis A.; Tsekos I. 1982. Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. I. Early stages of the differentiation. **Protoplasma** 112: 55 - 62.
- Cardoso-Lopes E.M.; Maier J.A.; da Silva M.R.; Regasini L.O.; Simote S.Y.; Lopes N.P.; Pirani J.R.; Bolzani V. da S.; Young M.C.M. 2010. Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. **Molecules** 15: 9205 - 9213.
- Cavalcante C.A.D. 2003. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae). Tese de mestrado, Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 41 p.
- Chen U-E.; Hsia C-N.; Agrawal D.C.; Tsay H-S. 2006. Influence of ventilation closures on plant growth parameters, acclimation and anatomy of leaf surface in *Scrophularia yoshimurae* Yamazaki - a medicinal plant native to Taiwan. **Botanical Studies** 47: 259 - 266.

Cruz C.D. 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum, Agronomy** 35: 271 - 276.

Cybularz-Urban T.; Hanus-Fajerska E.; Swiderski A. 2007. Effect of light wavelength on in vitro organogenesis of a *Cattleya* hybrid. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica** 49: 113 - 118.

De Bona E.A.M.; Pinto F.G.S.; Borges A.M.C.; Scur M.C.; Fruet T.K.; Weber L.D.; Alves L.F.A.; De Moura A.C. 2013. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente a sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde** 15: 41 - 46.

Decchetti S.F.C.; Soares A.M.; Paiva R.; de Castro E.M. 2008. Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. **Scientia Horticulturae** 117: 341 - 344.

Dhale D.A.; Markandeya S.K.; Niturkar Y.D. 2010. Standardization of homoeopathic drug *Ruta graveolens* L. **Journal of Phytology** 2: 1 - 7.

Diwan R.; Shinde A.; Malpathak N. 2012. Phytochemical composition and antioxidant potential of *Ruta graveolens* L. in vitro culture lines. **Journal of Botany**, 6 pag. doi:10.1155/2012/685427.

Düring H.; Harst M. 1996. Stomatal behaviour, photosynthesis and photorespiration of in vitro-grown grapevines: effects of light and CO₂. **Vitis Geilweilerhof** 35: 163 - 167.

Farnsworth N.R. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Science** 55: 225 - 276

Fujiwara K.; Kira S.; Kozai T. 1995. Contribution of photosynthesis to dry weight increase of in vitro potato cultures under different CO₂ concentrations. **Acta Horticulturae** 393: 119 - 126.

Furr M.; Mahlberg P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products** 44: 153 - 159.

Gupta S.D.; Jatothu B. 2013. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports** 7: 211 - 220.

Haberlandt G. 1914. Physiological plant anatomy, 4 ed. Macmillan and Co., Ltda, London, 777 p. 516 - 521.

Hamad M.N. 2012. Isolation of rutin from *Ruta graveolens* (Rutaceae) cultivated in Iraq by precipitation and fractional solubilization. **Pharmacie Globale International Journal of Comprehensive** 3: 1 - 3.

Hazarika B.N. 2006. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae** 108: 105 - 120

Hemm M.R.; Rider S.D.; Ogas J.; Murry D.J.; Chapple C. 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. **The Plant Journal** 38: 765 - 778.

Hou J.L.; Li W.D.; Zheng Q.Y.; Wang W.Q. Xiao B.; Xing D. 2010. Effect of low light intensity on growth and accumulation of secondary metabolites in roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Biochemical Systematics and Ecology** 38: 160 - 168.

Jeon M.W.; Ali M.B.; Hahn E.J.; Paek K.Y. 2006. Photosynthetic pigments, morphology and leaf gas exchange during *ex vitro* acclimatization of micropropagated CAM *Doritaenopsis* plantlets under relative humidity and air temperature. **Environmental and experimental botany** 55: 183 - 194.

Johansen D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Books: New York.

Junghanns K.T.; Kneusel R.E.; Baumert A.; Maier W.; Gröger D.; Matern U. 1995. Molecular cloning and heterologous expression of acridone synthase from elicited *Ruta graveolens* L. cell suspension cultures. **Plant Molecular Biology** 27: 681 - 692.

Junghanns K.T.; Kneusel R.E.; Groger D.; Matern U. 1998. Differential regulation and distribution of acridone synthase in *Ruta graveolens*. **Phytochemistry** 49: 403 - 411.

Kaewjampa N.; Shimasaki K. 2012. Effects of green LED lighting on organogenesis and superóxido dismutase (SOD) activities in protocorm-like bodies (PLBs) of *cymbidium* cultured *in vitro*. **Environment Control in Biology** 50: 247 - 254.

Kalachanis D.; Psaras G.K. 2005. Structure and development of the secretory cavities of *Myrtus communis* leaves. **Biologia plantarum** 49: 105 - 110.

Karnovsky M.J. 1965. A formaldehydeglyutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 137 - 138.

Khan PSV, Kozai T, Nguyen QT, Kubota C, Dhawan V (2003) Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum** 46: 161 – 166.

Kim S.J.; Hahn E.J.; Heo J.W.; Paek K.Y. 2004. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae** 101: 143 - 151.

Kozai T. 2010. Photoautotrophic micropropagation environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants** 10: 188 – 204.

Kubota C. 2001. Concepts and background of photoautotrophic micropropagation. **Progress in Biotechnology** 18: 325 - 334.

Kuzovkina I.; Al'terman I.; Schneides B. 2004. Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry** 65: 1095 - 1100.

Kuzovkina I.N.; Szarka Sz.; Héthelyi É.; Lemberkovics E.; Szöke É. 2009. Composition of essential oil in genetically transformed roots of *Ruta graveolens*. **Russian Journal of Plant Physiology** 56: 846 - 851.

Li Q.; Kubota Q. 2009. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. **Environmental and Experimental Botany** 67: 59 - 64.

Li H.; Tang C.; Xu Z. 2013. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis *in vitro*. **Scientia Horticulturae** 150: 117 - 124.

Lin K.H.; Huang M.Y.; Huang W.D.; Hsu M.H.; Yang Z.W.; Yang C.M. 2013. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). **Scientia Horticulturae** 150: 86 - 91.

Lukačín R.; Springob K.; Urbanke C.; Ernwein C.; Schröder G.; Schröder J.; Matern U. 1999. Native acridone synthases I and II from *Ruta graveolens* L. form homodimers. **FEBS Letters** 448: 135 - 140.

Macedo A.F.; Leal-Costa M.V.; Tavares E.S. Lage C.L.S.; Esquibel M.A. 2011. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro* cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany** 70: 43 - 50.

Maier W.; Baumert A.; Schumann B.; Furukawa H.; Gröger D. 1993. Synthesis of 1,3-dihydroxy-*N*-methylacridone and its conversion to rutacridone by cell-free extracts of *Ruta graveolens* cell cultures. **Phytochemistry** 32: 691 - 698.

Marks T.R.; Simpson S.E. 1999. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. **Plant Growth Regulation** 28: 133 - 142.

Massot B.; Milesi S.; Gontier E.; Bourgaud F.; Guckert A. 2000. Optimized cultural conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 62: 11 - 19.

McCartan S.A.; Beckett R.P.; Ivanova M.V.; Van Staden J. 2004. *In vitro* hardening—the role of ventilation on acclimation stress in *Kniphofia leucocephala*. **Plant growth regulation** 43: 49 - 55.

Metcalf C.R.; Chalk L. 1950. Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood, in relation to taxonomy, with notes on economic uses. Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood, in relation to taxonomy, with notes on economic uses. Volume 1. Oxford University Press, London, 724 p.

Mills D, Yanqing Z, Benzioni A (2004) Improvement of jojoba shoot multiplication in vitro by ventilation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** 40: 396–402

Mingozzi M.; Morini S.; Lucchesini M.; Mensuali-Sodi A. 2011. Effects of leaf soluble sugars content and net photosynthetic rate of quince donor shoots on subsequent morphogenesis in leaf explants. **Biologia Plantarum** 55: 237 - 242.

Mohamed M.H.; Alsadon A.A. 2010. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae** 123: 295 - 300.

Mohamed MA–H, Alsadon AA (2011) Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annum*. **Biologia Plantarum** 55: 370 - 374.

Mohamed M.A.; Ibrahim T.A. 2012. Enhanced in vitro production of *Ruta graveolens* L. coumarins and rutin by manitol and ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 111: 335 - 343.

Monteiro W.R.; Castro M.D.M.; Fahn A.; Caldeira W. 1995. Observations on the development of the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* (Asteraceae). **Nordic Journal of Botany** 15: 69 - 76.

Nazish I.; Kaskoos R.A.; Mir S.R.; Amin S.; Ali M. 2009. Preliminary pharmacognostical standardisation of *Ruta graveolens* L. aerial parts. **Research Journal of Medicinal Plants** 3: 41 - 44.

Nazish I, Ali M, Mir SR, Parvez N, Yadav S, Hwisa N, Al–Sharif MS, Molvi K (2010) Application of microscopy in authentication of unani traditional plant *Ruta graveolens*. **Pharma Science Monitor - An International Journal of Pharmaceutical Sciences** 1: 122 – 127.

O'Brien T.P.; Feder N.; McCully M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59: 367 - 373.

O'Brien T.P.; McCully M.E. 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. Termarcarphi PTY. LTD: Melbourne.

Oliva A, Meepagala KM, Wedge DE, Harries D, Hale A.L, Aliotta G, Duke S.O. 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L., leaves, including a new quinolone alkaloid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 890 - 896.

Pavarini D.P.; Pavarini S.P.; Niehues M.; Lopes N.P. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology** 176: 5 - 16.

Pearse A.G.E. 1972. Histochemistry: theoretical and applied. Volume 2, 3^a ed. The Williams & Wilkins Company: Baltimore.

Pinheiro MVM, Martins FB, Xavier A, Otoni WC (2013) Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore** 37: 19 - 29.

Rahman M.H.; Alsadon A.A. 2007. Photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation of three potato cultivars. **Journal of Bio-Science** 15: 111 - 116.

Roberts M.F.; Wink M. 1998. Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications. Plenum Publishing corporation (Eds), New York, 139 - 140.

Saldanha C.W.; Otoni C.G.; Notini M.M.; Kuki K.N.; da Cruz A.C.F.; Neto A. R.; Dias L.L.C.; Otoni W.C. 2013. A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** 49: 433 - 444.

Santos R.P.; Cruz A.C.F.; Iarema L.; Kuki K.N.; Otoni W.C. 2008. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres** 55: 356 - 364.

Segatto F.B.; Bisognin D.A.; Benedetti M.; Costa L.C.; Rampelotto M.V.; Nicoloso F.T. 2004. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural** 34: 1597 - 1601.

Szopa A.; Ekiert H.; Szewczyk A.; Fugas E. 2012. Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *Divaricata* (Tenore) Gams. Under different light conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 110: 329 - 336.

Tsay H.S.; Lee C.Y.; Agrawal D.C.; Basker S. 2006. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* - a medicinal plant. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 42: 445 - 449.

Turner G.W. 1999. A brief history of the lysigenous gland hypothesis. **The Botanical Review** 65: 76 - 88.

Victório C.P.; Kuster R.M.; Lage C.L.S. 2007. Qualidade de luz e produção de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 213 - 215.

Vidal B.C. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochemie** 15: 289 - 296.

Wagner H.; Bladt S. 2001. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer. 384 p.

Wang Y.; Gao L.; Wang Z.; Liu Y.; Sun M.; Yang D.; Xia T. 2012. Light-induced expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthetic pathways in callus of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). **Scientia Horticulturae** 133: 72 - 83.

Wellburn A.R 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology** 144: 307 - 313.

Wu T-S.; Shi L-S.; Wang J-J.; Iou S-C.; Chang H-C.; Chen Y-P.; Kuo Y-H.; Chand Y-L.; Teng C-M. 2003. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. **Journal of the Chinese Chemical Society** 50: 171 - 178.

Wu M.C.; Hou C.Y.; Jiang C.M.; Wang Y.T.; Wang C.Y.; Chen H.H.; Chang H.M. 2007. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. **Food Chemistry** 101: 1753 - 1758.

Yamashita O.M.; Fernandes Neto E.; Campos O.R.; Guimarães S.C. 2009. Fatores que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 11: 202 - 208.

Zobayed S.M.A.; Armstrong J.; Armstrong W. 2001. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science** 161: 537 - 548.

CONCLUSÕES GERAIS

Os explantes de *R. graveolens* que melhor responderam aos diferentes fitorreguladores avaliados, em escuridão completa e no fotoperíodo, foram os segmentos nodais de *R. graveolens*, estimulando tanto organogênese como calogênese. Os meios que continham *m*-TP em combinação com 2,4-D e ANA foram os que induziram a maior quantidade de biomassa, sendo a *m*-TP mais efetiva que a Kin.

As condições fotoautotróficas com ventilação natural e forçada com enriquecimento de CO₂ não estimularam a produção de biomassa a partir de segmentos de caule de *R. graveolens*, a qual foi maior sob condições fotoheterotróficas. No entanto, o cultivo fotomixotrófico melhorou a qualidade dos brotos, reduzindo sua hiperidricidade.

A irradiância, o tipo de lâmpada utilizada e os diferentes níveis de trocas gasosas avaliados, influíram no crescimento, desenvolvimento e na morfofisiologia de plântulas germinadas *in vitro* de *R. graveolens*. Induzindo maior desenvolvimento ao utilizar frascos com tampas de polipropileno com uma membrana e sob iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes e 4 LEDs. Porém, os diferentes tratamentos analisados geraram variações morfológicas nas folhas de plântulas de *R. graveolens*, como deposição irregular da cutícula sobre a epiderme, estômatos pouco funcionais, diminuição na espessura do mesófilo e aumento nos espaços intercelulares. Ao avaliar o efeito dos níveis de trocas gasosas x irradiância, houve melhor desenvolvimento das plântulas ao utilizar tampas com uma membrana, independentemente da irradiância utilizada (30 e 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

De modo geral, foi induzida a produção de alcaloides, cumarinas, compostos antracênicos, terpenóides, saponinas e flavonoides em todos os tecidos cultivados *in vitro* de *R. graveolens* em este trabalho. Todavia, para estabelecer quantitativamente se houve diferença na concentração de metabólitos como alcaloides e cumarinas é preciso completar a análise de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Pelo que se recomenda continuar com as análises por CLAE visando identificar quais dos fitorreguladores e das condições de cultivo avaliadas estimularam a maior produção de alcaloides e cumarinas de interesse comercial de *R. graveolens*, para definir novas metodologias que permitam obter quantidades maiores destes metabólitos.