UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS

MESTRADO PROFISSIONAL

# AVALIAÇÃO DE BIOPRODUTOS E BIOPROCESSO PARA MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CÚRCUMA ORNAMENTAL EM SISTEMA DE BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

RAPHAEL ZUCHERATO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Levi Pompermayer Machado

COORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Vieira Ferraz

ARARAQUARA - SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

# AVALIAÇÃO DE BIOPRODUTOS E BIOPROCESSO PARA MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CÚRCUMA ORNAMENTAL EM SISTEMA DE BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

RAPHAEL ZUCHERATO

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Levi Pompermayer Machado

COORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Vieira Ferraz

ARARAQUARA – SP

2024

Zucherato, Raphael.
**Z94a** Avaliação de bioprodutos e bioprocesso para micropropagação *in vitro* de cúrcuma ornamental em sistema de biorreator de imersão temporária / Raphael Zucherato. – Araraquara, 2024.
51 f. : il.

Orientador: Levi Pompermayer Machado.
Coorientador: Marcelo Vieira Ferraz.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

1. Biotecnologia. 2. Cultura de tecidos vegetais. 3. Plantas ornamentais. 4. Biorreatores de imersão temporária. 5. Biofertilizantes. I. Machado, Levi Pompermayer, orient. II. Ferraz, Marcelo Vieira, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030170P0**
**Esta ficha não pode ser modificada**

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação de bioprodutos e bioprocessos para micropropagação in vitro de Cúrcuma ornamental em sistema de biorreator de imersão temporária.

**AUTOR: RAPHAEL ZUCHERATO**

**ORIENTADOR: LEVI POMPERMAYER MACHADO**

**COORIENTADOR: MARCELO VIEIRA FERRAZ**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEVI POMPERMAYER MACHADO (Participaçao Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / Faculdade de Ciencias Agrarias do Vale do Ribeira do Campus de Registro da Unesp

Profa. Dra. CAMILLY FRATELLI PEREIRA (Participaçao Virtual)
Departamento de Nutrição / Universidade Metropolitana de Santos

Dra. BRUNA ROQUE LOUREIRO (Participaçao Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira-Câmpus Registro

Araraquara, 29 de fevereiro de 2024

A minha família,
JULIANA N. NOLLI
e meu filho BENTO ZUCHERATO,
com muita fé na vida, são meus amores eternos.

*"Eu conto os dias conto as horas para te ver não consigo te esquecer,*
*cada minuto é muito tempo sem você"*
Roberto Carlos

## AGRADECIMENTOS

A Deus pai todo poderoso criador do céu e da terra, por me conceder o dom da vida, minha saúde, força e vontade de alcançar meus objetivos.

Agradeço aos meus pais Benedito Pascoal Zucherato e Maria Aparecida Castelo Zucherato, que com muito amor e carinho me ensinou que o melhor caminho é o do bem, que a felicidade está na simplicidade, e que na vida o importante é quem você foi, não o que você teve.

Aos meus irmão Daniele Zucherato e Bruno Zucherato, que sempre estiveram perto de mim, nas piores dificuldades, vocês são meu orgulho.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Dr. Levi Pompermayer Machado, principal responsável pela concretização deste trabalho e deste sonho, orientador da maneira mais expressiva que se possa imaginar, técnico, preciso e sempre muito atento aos detalhes, meu muito OBRIGADO.

Ao Dr. Marcelo Vieira Ferraz, por sua coorientação e incentivo e muito conhecimento técnico, sempre esteve à disposição para dúvidas e construção de ideias.

No início é difícil, mas pessoas entram na vida das pessoas por algum motivo, e não posso deixar de agradecer duas pessoas que sempre me deram conselhos e sempre torceram por mim Dona Bete, minha sogra, e seu Vicente *in memoriam* meu sogro, que sempre acreditaram que eu poderia ser uma pessoa melhor, a todas as Nicoletti, tia Fer, Carla, Gabi e Cecilia.

Meu muito obrigado a empresa TERRA VIVA onde trabalho, que me mostra todos os dias que é possível *"Plantar uma vida melhor",* e onde me disponibilizaram estrutura e tempo para realização dos experimentos, meu gerente Joni Theodoro van den Broek e a todos amigos e companheiros que me incentivaram na construção desse projeto.

Agradeço as todas as meninas do laboratório que me ajudaram com muito amor e carinho na execução do experimento, equipe do preparo de meio, Dani e Carol, e as meninas da manipulação e checagem das plantas, Raquel e Fabiana.

A UNESP campus de Araraquara, que deu a oportunidade de absorver muito conhecimento, a todos os professores das disciplinas executadas, a todos alunos que compartilharam ideias e conhecimento.

A todos aqueles que não citei, mas que de alguma forma contribuiu ou me auxiliaram de alguma forma, GRATIDÃO.

## RESUMO

No setor de plantas ornamentais a micropropagação *in vitro* é uma ferramenta essencial para produção em escala comercial de mudas de diferentes espécies. Esta técnica envolve bioprocessos desenvolvidos em ambientes controlados, nos quais os tecidos vegetais são manipulados em condições assépticas com o objetivo de multiplicar plantas de interesse comercial. Dessa forma, é possível obter clones que mantenham características desejadas dos cultivares selecionados e valor comercial. Nesse contexto, a presente proposta abordará duas estratégias na produção de micropropagação *in vitro* de Cúrcuma SPLASH®, (*Cúrcuma alismatifolia* – Zingiberaceae). A primeira envolverá a micropropagação convencional utilizando meio de cultura MS sólido, substituindo os macronutrientes por Peters® 0,4 gr/l, adicionado hormônio BAP 0,6 mg/l, suplementando concentrações diferentes de extratos líquidos de macroalgas Acadian® (0,1/0,5/1,0 ml/l), Cia das Algas® (0,1/0,5/1,0 ml/l) e AquaGreen® (0,1/0,5/1,0 ml/l) com hormônio BAP (0,6 mg/l). A segunda proposta é replicar o mesmo tratamento da primeira fase, com a utilização do processo de micropropagação através de biorreatores de imersão temporária utilizando meio de cultura líquido. Com análise dos resultados o trabalho mostra que a substituição dos macronutrientes por fertilizante Peters® 0,4 gr./l é uma alternativa economicamente mais viável em comparação ao uso dos macronutrientes com alto teor de pureza, comparando os métodos de micropropagação *in vitro* de mudas, para ambas as fases, o sistema de biorreator de imersão temporária mostrou mais eficiência em comparação com o método convencional alongamento e enraizamento. A suplementação do meio de cultura com os biofertilizantes, traz benefícios para produção de mudas micropropagadas *in vitro*, AquaGreen® e Cia das Algas® na fase de multiplicação e geração de novos brotos, Acadian para fase de alongamento, AquaGreen® e Cia das Algas® para fase de enraizamento.



**Palavras chaves:** biotecnologia; cultura de tecidos vegetais; plantas ornamentais; biorreatores de imersão temporária; biofertilizantes

## ABSTRACT

In the ornamental plant sector, in vitro micropropagation is an essential tool for commercial-scale production of seedlings of different species. This involves bioprocesses developed in controlled environments, in which plant tissues are manipulated under aseptic technical conditions with the aim of multiplying plants of commercial interest. In this way, it is possible to obtain clones that have desired characteristics of the selected cultivars and commercial value. In this context, the present proposal will address two strategies in the production of in vitro micropropagation of Turmeric SPLASH®, (Cúrcuma alismatifolia – Zingiberaceae). The first will involve conventional micropropagation using solid MS culture medium, incorporating the macronutrients by Peters® 0.4 gr/l, added BAP hormone 0.6 mg/l, supplementing different concentrations of liquid extracts of Acadian® macroalgae (0.1/ 0.5/1.0 ml/l), Cia das Algas® (0.1/0.5/1.0 ml/l) and AquaGreen® (0.1/0.5/1.0 ml/l) with hormone BAP (0.6 mg/l). The second proposal is to replicate the same treatment as the first phase, using the micropropagation process through temporary transfer bioreactors using liquid culture medium. Analysis of the results of the work shows that replacing macronutrients with Peters® 0.4 gr./l fertilizer is a more economically viable alternative compared to the use of macronutrients with a high purity content, comparing in vitro seedling micropropagation methods, for both phases the experimental bioreactor system showed more efficiency compared to the conventional stretching and rooting method. Supplementing the culture medium with biofertilizers brings benefits to produce in vitro micro propagated seedlings, AquaGreen® and Cia das Algas® in the multiplication phase and generation of new shoots, Acadian® for the elongation phase, AquaGreen® and Cia das Algas® for the rooting phase.



**Keywords:** biotechnology; plant tissue culture; ornamental plants; temporary immersion bioreactors; biofertilizer.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 -** Exsicata de Cúrcuma Longa L. ..... 11
**Figura 2 -** Flor de Cúrcuma Ornamental ..... 12
**Figura 3 -** Desenho esquemático da micropropagação vegetal in vitro ..... 14
**Figura 5 -** A) Plantas Normais in vitro B) Plantas com Hiperidricidade in vitro ..... 19
**Figura 6 -** Exemplos de culturas micropropagadas in vitro em biorreator de imersão temporária ..... 20
**Figura 7 -** Desenho esquemático do sistema de biorreator de imersão temporária ..... 21
**Figura 8 -** Etapas do protocolo TV CMA - 001.2020 para obtenção de explantes in vitro ..... 23
**Figura 9 -** Equipamentos utilizados no laboratório para produção de meio de cultura ..... 26
**Figura 10 -** Tampa de plástico autoclavável e garrafa com as conexões do sistema de biorreator de imersão temporária ..... 29
**Figura 11 -** Sistema completo do biorreator de imersão temporária, compressor, secador, regulagem de pressão e as prateleiras com as garrafas acopladas ..... 29
**Figura 12 -** Cúrcuma Ornamental Splash® na garrafa estéril conectada ao sistema de biorreator de imersão temporária ..... 30
**Figura 13 -** Imagem da tabela quadriculada utilizada para coleta de resultado ..... 31
**Figura 14 -** Mudas de Cúrcuma in vitro após 42 dias (6 semanas) na sala de crescimento ..... 32
**Figura 15** - Média dos números de novos brotos do método convencional de micropropagação 33
**Figura 16 -** A) Plantas in vitro testemunha e B) Plantas in vitro T 07 – AquaGreen® 0,1 mg/l . 34
**Figura 17** - Resultado do método convencional de micropropagação altura das plantas (cm) .... 34
**Figura 18** - Resultados do método convencional quantidade de raiz (número) ..... 35
**Figura 19** - Resultado do método biorreator de imersão temporária fator de propagação (número) ..... 36
**Figura 20** - a) T 04 0,1 mg/l Cia Algas b)T 05 0,5 mg/l c) T 06 1,0 mg/l Cia Algas ..... 37
**Figura 21** - Resultados do método biorreatores de imersão temporária de micropropagação altura das plantas (cm) ..... 37

**Figura 22 -** Resultados do método biorreatores de imersão temporária quantidade de raiz (número) ..... 38
**Figura 23 -** Valores de produção de meio de cultura ..... 43

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Meio de cultura da 1 e 2° etapa do experimento ..... 22
**Tabela 2** - Solução estoque do meio de cultura MS Murashige & Skoog ..... 24
**Tabela 3** - Tratamentos compostos por extratos biofertilizantes aplicados nas concentrações finais no meio solido em mg/l ..... 27
**Tabela 4** - Tratamentos compostos por extratos biofertilizantes aplicados nas concentrações finais no meio de cultura liquido em mg/l ..... 28
**Tabela 5** - Valor dos itens para produção de Meio de Cultura - 1 litro ..... 42

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO ..... 8

2. OBJETIVOS ..... 10

3. REVISÃO DE LITERATURA ..... 11

3.1. BOTÂNICA DA CÚRCUMA ..... 11

3.2. CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS ..... 13

3.3. MEIO DE CULTURA E EXTRATOS FERTILIZANTES ..... 15

3.4. BIOFERTILIZANTES EXTRAIDOS DAS ALGAS MARINHAS ..... 17

3.5. BIORREATORES DE IMERSSÃO TEMPORÁRIA ..... 18

4. MATERIAL E MÉTODOS ..... 22

4.1. OBTENÇÃO DE EXPLANTES ..... 23

4.2. PRODUÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA ..... 23

4.3. EFEITO DE EXTRATOS BIOFERTILIZANTES NO MÉTODO DE PROPAGAÇÃO EM MEIO SÓLIDO ..... 26

4.4. ANÁLISE DOS DADOS ..... 30

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 32

5.1. RESULTADOS DO SISTEMA CONVENCIONAL DE MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CURCUMA SPLASH ..... 32

5.2. RESULTADOS DO SISTEMA DE BIORREATORES DE IMERSSÃO TEMPORÁRIA DE MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CÚRCUMA SPLASH ..... 36

5.3 RESULTADO DO CUSTO DE PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA ..... 42

6. CONCLUSÃO ..... 44

8. REFERÊNCIA ..... 45

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a profissionalização e o dinamismo comercial da floricultura são fenômenos relativamente recentes. No entanto, a atividade já contabiliza números extremamente significativos. Nos últimos cinco anos, o crescimento do setor ornamental vem se destacando, considerando que a verba de marketing e propaganda tem sido muito baixa e é nula quando se trata de promover o setor como um todo. De acordo com dados da Ibraflor (2015), o Brasil produz 15.600 hectares de flores, o que representa 8% da produção mundial e conta, atualmente, com cerca de 8 mil produtores de flores e plantas. Juntos, eles cultivam mais de 2.500 espécies com cerca de 17.500 variedades. Sendo assim, o mercado de flores é uma importante engrenagem na economia brasileira, responsável por 209.000 empregos diretos, dos quais 81.000 relativos à produção, 9.000 à distribuição, 112.000 no varejo e 7.000 em outras funções, em maior parte como apoio.

O setor de plantas ornamentais dentre os segmentos produtivos do agronegócio no país, tem por característica sua diversificação em produtos. De acordo com Oliveira et al. (2021), a cadeia de flores e plantas ornamentais também é extremamente dinâmica, o que requer constantemente ações de inovações em produtos e serviços para melhor atender a demanda do mercado por novidades, qualidade e preços competitivos.

De acordo com o Ibraflor (2015), as flores movimentaram 10,9 bilhões de reais no Brasil. Esse desenvolvimento está fundamentado na qualidade da produção e na mudança de hábito da população, que tem hoje produtos com beleza e vida útil, correspondente ao valor gasto, houve uma evolução no padrão de exigência do consumidor final, fazendo que os produtores busquem cada vez mais, melhorias no processo de produção de mudas.

Nesse contexto de expansão do setor, merece destaque a promulgação de uma Lei Federal que estabelece a Política Nacional de Incentivo à Cultura de Flores e de Plantas Ornamentais de Qualidade. Essa medida promete impulsionar o setor produtivo, proporcionando linhas de crédito específicas, implementando práticas fitossanitárias para elevar a excelência na produção de flores,

fortalecendo as estruturas para a comercialização nos mercados interno e externo, conforme delineado pela Lei 14.637, de 2023.

O mercado de flores no mundo, assim como no Brasil, utiliza-se das novidades, isto é, da introdução de novas cultivares, para manter e estimular o interesse dos consumidores nos produtos. Nesta questão, as principais necessidades do mercado de flores são cultivares mais adequado ao cultivo intenso, de baixo custo e de fácil cultivo, além de aprimoramentos nas técnicas de cultivo *in vitro*, que permite a produção em larga escala, controlando todos os fatores bióticos e abióticos.

A micropropagação é uma das principais aplicações da cultura de tecidos vegetais (Barbosa et al., 1993) com o objetivo principal de reproduzir plantas idênticas às plantas matrizes, essa técnica é baseada na totipotência de uma única célula vegetal, a capacidade por si só, originar uma nova planta, com as mesmas características genéticas, clonagem de plantas (Pinto, 2001).

A cultura de tecidos vegetais se configura como uma ferramenta essencial para micropropagação em grande quantidade das principais espécies ornamentais. Em decorrência, diversas formulações químicas e substâncias complexas tem sido explorado, como componente dos meios nutritivos a fim de reduzir o tempo de cultivo *in vitro* e ampliar a qualidade de plantas produzidas (Arditti; Ernst, 1984).

Meios nutritivos simplificados representam aqueles formulados a partir de materiais corriqueiros e de baixo custo, como por exemplo, o uso de fertilizantes comerciais, polpa de frutas, biofertilizantes  entre outros produtos quando comparado as formulações estabelecidas por químicos com alto teor de pureza.

## 2. OBJETIVOS

Produzir mudas micropropagadas de Cúrcuma ornamental, substituindo macronutrientes por fertilizante comercial Peters ®, e utilizar suplementação a base de biofertilizantes a fim de reduzir custos e aumentar as taxas de multiplicação *in vitro*.

Objetivo específico

- Experimento 1 – Avaliação da eficiência da utilização do fertilizante comercial Peters e suplementação com biofertilizantes em diferentes meios de cultura.
- Experimento 2 – Produzir mudas micropropagadas em sistema de biorreatores de imersão temporária meio de cultura liquido substituir macronutrientes por fertilizante comercial Peters® e fazer a suplementação com biofertilizantes
- Aumentar produtividade das mudas micropropagadas *in vitro* de Cúrcuma ornamental e diminuir custos de produção.

# 3. REVISÃO DE LITERATURA

## 3.1. BOTÂNICA DA CÚRCUMA

A Cúrcuma pertence à família Zingiberaceae, também conhecida como açafrão terra, gengibre dourado e mangarataia. Trata-se de um arbusto perene, nativo do sul e sudoeste asiático e extensivamente cultivado na Índia, principalmente em Madras, Bengal e Bombay, e Taiwan, Burna, China, Japão e Indonésia, e no continente Africano (Goldwyn, 1997; Scartezzini; Speroni, 2000).

A planta, a exemplo na figura 1, apresenta folhas grandes oblonga-lanceoladas e oblíquo-enervadas de coloração verde clara, a parte aérea é ereta e pode atingir, de acordo com as condições de solo e clima, até 120 cm de altura na fase adulta, flores de diversas cores que exalam um odor agradável, geralmente cada planta tem de 5-7 folhas. O pseudocaule é formado na base da planta pelo agrupamento das folhas que possuem pecíolos tão compridos quanto os limbos (Hertwig, 1986; Cecílio Filho, 1996; Péret-Almeida, 2000).



**Figura 1 -** Exsicata de Cúrcuma Longa L.
Fonte: REFLORA (2015)

A inflorescência da Cúrcuma é facilmente reconhecida, ela possui um formato de espiga formada por brácteas amarelo claro disposto em espiral que compõem os cachos. A floração ocorre geralmente após 180 dias do plantio, desenvolvendo-se bem em diversas condições tropicais (Govindarajan, 1980; Péret-Almeida, 2000), na figura 2, segue registro fotográfico da flor em destaque.

O sistema radicular possui rizoma primário, composto por um bulbo central ou pião e os rizomas secundários chamados de dedos. Estes possuem cerca de 9 a 12 cm (central) e 4-6 cm (secundários), respectivamente, variando de acordo com as condições de propagação e cultivo. Os rizomas são tuberosos de centro arredondado com laterais alongadas. Possuem uma coloração alaranjada quando novos e escurecem com o passar do tempo. Cresce abaixo do colo da planta, agrupados formando uma estrutura denominada mão. (Maia, 1991; Tainter; Grenis, 1996; Scatezzini; Speroni, 2000).

A propagação da Cúrcuma é assexuada ou vegetativa, existindo duas formas de condução: pelo plantio diretamente no solo, sendo o bulbo plantado no local onde será efetivado o desenvolvimento da planta. A formação das mudas se dá num período de 15-30 dias de cultivo, desenvolvendo uma ou duas folhas quando é transplantado para o vaso definitivo (Donalisio, 1980).



**Figura 2 -** Flor de Cúrcuma Ornamental
Fonte: TERRA VIVA (2023)

Outra forma da Cúrcuma ser propagada vegetativamente é através do plantio de uma parte do rizoma. No entanto, seu desenvolvimento pode ser afetado por alguns microrganismos presentes no solo, causando várias doenças. Os principais problemas indicados na literatura estão relacionados ao amolecimento dos rizomas, causados pelos fungos: *Pythium myriotylum e Pythium gramnicolum* e pela bactéria *Pseudomonas solanacearum* (Mello; Amaral; Melo, 2002).

## 3.2. CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com amplas aplicações na agricultura. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vegetal vivo, chamados de explantes, são isolados de um organismo vegetal desinfetado e cultivados assepticamente por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado essa técnica está descrita na figura 3. O objetivo é obter uma nova planta idêntica à original, realizando assim uma clonagem vegetal, que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos (Torres et al., 1998).

Essa regeneração é fundamental na capacidade de proliferação das células vegetais se organizarem em tecidos e em uma planta completa, essa capacidade é denominada totipotência e considera que as células vegetais manifestam em momentos diferentes, sob o estímulo apropriado a potencialidade de iniciar um novo indivíduo multicelular (Kerbauy, 1997), conforme representação histológica apresentado na figura 4.

A teoria da totipotencialidade das células vegetais, sugere que qualquer tipo de tecido vegetal pode ser utilizado para regeneração de plantas *in vitro*. Ápices caulinares, segmentos nodais de caules e ramos, folhas, raízes, cotilédones, segmentos de hipocótilo, inflorescência, embriões e outros tipos têm sido utilizados para regeneração de muitas espécies e vários gêneros. A preferência deve ser mantida do explante que contenha maior proporção de tecidos meristemáticos, aumentando sua capacidade de regeneração (Mantovani; Franco, 1998).

De acordo com Grattapaglia e Machado, (1998) a clonagem ou a micropropagação é a propagação vegetativa *in vitro*, utilizados principalmente naquelas plantas de difícil multiplicação

pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grandes números de plantas geneticamente uniformes, em um curto período.

O sucesso desta técnica está associado à multiplicação em massa de indivíduos, com características genéticas superiores e livres de vírus e patógenos, além de favorecer a preservação da biodiversidade pela rápida multiplicação de espécies ameaçadas de extinção (Lovato; Gianinazzi; Trouvelet, 1996).

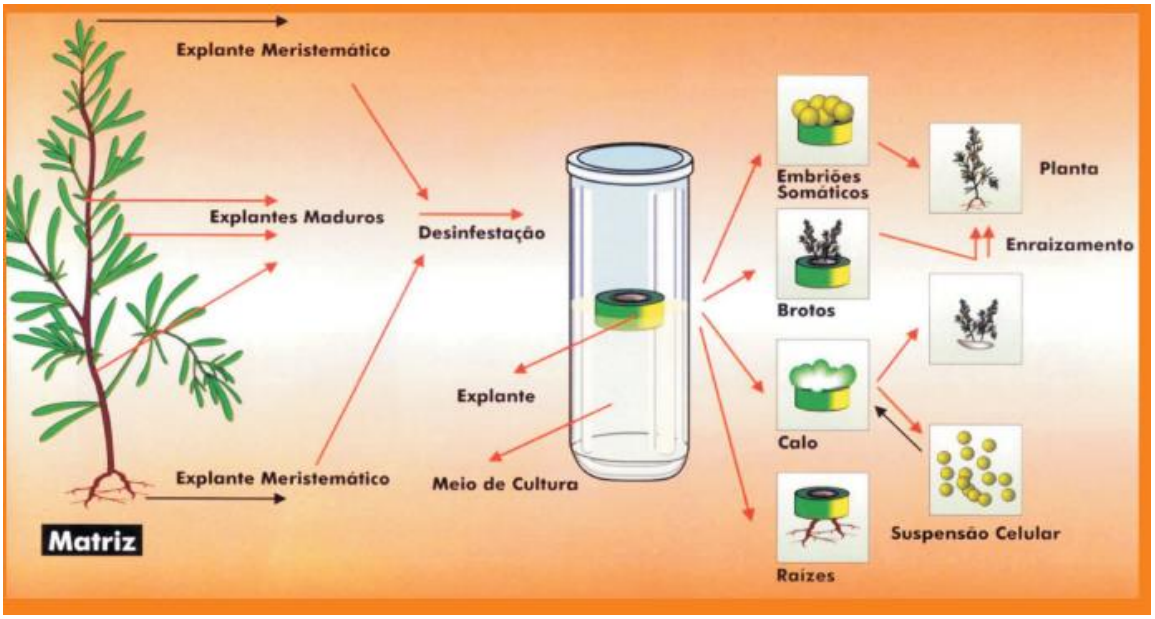



**Figura 3 -** Desenho esquemático da micropropagação vegetal *in vitro*

Fonte: KERBAUY (1997).

O cultivo de meristema é uma técnica utilizada para limpeza de vírus e contaminações endógenas, baseando-se no princípio de que essa parte da planta é a única não infectada, devido à velocidade de multiplicação celular, ausência de um sistema vascular (conforme observado na figura 4). Nos últimos anos o cultivo de meristema tem ganhado uma certa importância por ser utilizado para obtenção de tecidos para transformação genética (Gould et al, 1991).

As dificuldades na cultura de tecidos vegetais estão ligadas nos microrganismos contaminantes que competem com os explantes pelos nutrientes e carboidratos do meio de cultura e, provocam

danos diretos ou indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio metabólicos tóxicos às plantas (Montarroyos, 2000).

De acordo com Grattapaglia e Machado, (1998), para controlar essas contaminações bacterianas, normalmente são utilizados antibióticos que são incorporados ao meio de cultura ou usados diretamente sobre os explantes contaminados.

### 3.3. MEIO DE CULTURA E EXTRATOS FERTILIZANTES

O meio de cultura é constituído de produtos essenciais e opcionais dependendo da espécie inoculada *in vitro,* dentre os essenciais estão água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento, outro componente como aminoácidos, amidas, ácido orgânico, e substâncias naturais como, água de côco, banana, batata entre outros, podem ser adicionados para otimizar determinada resposta (Torres et al., 2001).

Além dos nutrientes básicos, outras substâncias podem ser adicionadas aos meios de cultura com fins específicos. À exemplo, os fungicidas e antibióticos são utilizados para o controle da contaminação; o carvão ativado, para adsorção de impurezas e substâncias tóxicas como os fenóis (Mantovani; Franco, 1998).

Em 1962, Murashige e Skoog desenvolveram o meio MS a partir do meio White, onde além de minerais, vitaminas e sacarose, foi suplementado com compostos inorgânicos. O meio MS é identificado como básico, pois é utilizado na cultura de tecidos na maioria das espécies vegetais. Além desses, outros meios foram especificamente desenvolvidos para fornecer requisitos particulares à espécie trabalhada, como o meio WPM (Woody Plant Medium) de (Lloyd; McCown, 1981) para espécies lenhosas.

Os meios de cultura Murashige & Skoog – MS (Murashige; Skoog, 1962) e o B5 (Gamborg et al.,1968) têm sido muito utilizados nos últimos tempos devido aos efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento de muitas espécies. Para acelerar o processo das respostas fisiológicas nas plantas e possibilitar uma diferenciação celular, pode-se suplementar com reguladores de

crescimento principalmente dos grupos das auxinas e citocininas, com diversas concentrações e combinações de acordo com a fase e objetivo de cultivo (Pletsch, 1998). Outros componentes podem ser modificados assim como os sais minerais. No meio de cultura, os sais minerais são utilizados em quantidades superiores à necessidade efetiva dos tecidos, entretanto altos teores destes sais podem causar alteração do equilíbrio do potencial osmótico (Hess, 1975; Malavolta; Vitti; Oliveira, 1997).

Além dos nutrientes básicos, outras substâncias podem ser adicionadas aos meios de cultura com fins específicos. À exemplo, os fungicidas e antibióticos são utilizados para o controle da contaminação; o carvão ativado, para adsorção de impurezas e substâncias tóxicas como os fenóis (Mantovani et al., 2008).

Dos fatores abióticos, o pH pode ser considerado como limitante. uma vez que sua alteração no meio de cultura provoca mudanças na permeabilidade das membranas, influenciando na absorção e utilização de certos compostos pelas células, como, por exemplo dos reguladores de crescimento e do nitrogênio liberado pelo amônio, influenciando também na solidificação do agar no meio, na maioria dos casos o pH situa-se na faixa de 5-6, ajustado antes da autoclavagem (Mantovani et al, 2008).

Ainda sobre este parâmetro, ele determina a acidez relativa de um meio, podendo variar de 7,0 a 14,0, sendo que valores abaixo de 5,0 são considerados como ácidos; acima de 7,0 como básico e entre 5,0 e 7,0 como neutros. O pH pode ser considerado como um dos critérios químicos de maior importância para o desenvolvimento da planta, em razão do seu efeito direto de disponibilidade de nutrientes, particularmente dos micronutrientes (Mantovani et al, 2008).

As mudanças na absorção de água e nutrientes, proporcionadas pela variação da condutividade do meio nutritivo, levam a alterações da fisiologia das plantas (Beltrão; Trindade; Correa, 1997). Essas alterações relacionam-se, dentre outros fatores, a abertura dos estômatos e ao aumento ou diminuição da área foliar, estando esses fatores intimamente ligados com a eficiência fotossintética, e consequentemente , com a produção de material seco das plantas.

Quanto maior for a quantidade de íons dissolvidos, maior será a condutividade elétrica do meio, no entanto, a condutividade não determina especificamente quais íons que estão presentes em determinada amostra, apenas a totalidade deles (Mantovani et al, 2008).

Por definição o hormônio vegetal ou fito hormônio é uma substância química biologicamente ativa, produzida por uma planta que, em baixas concentrações, regulam determinados processos fisiológicos, sendo em geral, produzida em uma certa parte da planta e translocada para promover a ação em outra parte, os hormônios ou fitormônios são, portanto, substâncias naturais produzidas pelo próprio vegetal (Biasi, 2002).

A descoberta dos hormônios e reguladores de crescimento vegetal promoveu avanços na área de fisiologia, principalmente no entendimento do controle da diferenciação celular, o que permitiu o surgimento da cultura de células e tecidos isolados in vitro a micropropagação, uma das principais ferramentas para o desenvolvimento da agricultura (Torres et al., 1998).

A constituição, ocorrência, transporte e efeitos de cada hormônio não atuam de forma isolada, mas funcionam como aditivo ou oposição um ao outro, resultando em uma condição final de crescimento ou desenvolvimento representativo do efeito e balanço hormonal (Davis, 1995).

### 3.4. BIOFERTILIZANTES EXTRAIDOS DAS ALGAS MARINHAS

Os produtos derivados de extratos de algas são produzidos principalmente a partir de espécies que habitam águas salgadas. A espécie *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, destaca-se das algas marinhas comumente utilizadas (Ugarte; Sharp; Moore, 2006). E tem sido muito estudada por suas propriedades que incluem desde a promoção de crescimento vegetal ao uso na alimentação humana e animal (Khan et al., 2009). É uma alga marrom encontrada nos mares árticos e nas costas rochosas do oceano Atlântico no Canadá e no norte da Europa (Colapietra; Alexander, 2006), onde a temperatura da água não excede 27°C (Keser; Swenarton; Foertch, 2005). Diversos extratos comerciais dessa alga demonstraram melhorar o crescimento de plantas, mitigar alguns estresses abióticos e bióticos, além de melhorar as defesas das plantas pela regulação de processos moleculares, fisiológicos e bioquímicos (Shukla et al., 2019).

Algumas pesquisas mostram que, mesmo em baixas concentrações, os produtos à base de extratos de algas ajudam no desenvolvimento vegetal, sugerindo que os derivados dos extratos de algas possuem compostos bioativos (Khan et al., 2009). De modo geral, a matriz orgânica dos extratos é caracteristicamente complexa, sendo composta de nutrientes (macro e micro), aminoácidos, oligossacarídeos e hormônios vegetais (Craigie; Mackinnon; Walter, 2007).

Especificamente, os extratos de *Ascophyllum nodosum* são constituídos por citocininas, auxinas, ácido abscisico, giberelinas, betaínas e alginatos (Mackinnon et al., 2010); existem ainda compostos não identificados que possuem atividade similar à de alguns hormônios vegetais e que também podem estimular sua produção nas plantas (Khan et al., 2009).

## 3.5. BIORREATORES DE IMERSSÃO TEMPORÁRIA

Os primeiros protótipos de biorreator descritos na literatura utilizados para micropropagação, os explantes em cultivo, permaneciam imersos, continuamente no meio de cultura (Levin et al.; 1988; Takayama et al.; 1986; Preil et al., 1988). Essa imersão contínua causa problemas de hiperidratação, conhecida também por vitrificação, onde a célula vegetal tem a quebra da parede celular, aspecto translúcido do tecido e entumecimento das células.

Dependendo das espécies cultivadas e do tipo de meio de cultura proposto, a hiper-hidratação dos tecidos pode causar distúrbios fisiológicos e genéticos sérios, que irão afetar diretamente o desenvolvimento do material de cultivo, diminuindo o potencial de multiplicação e qualidade das plantas.

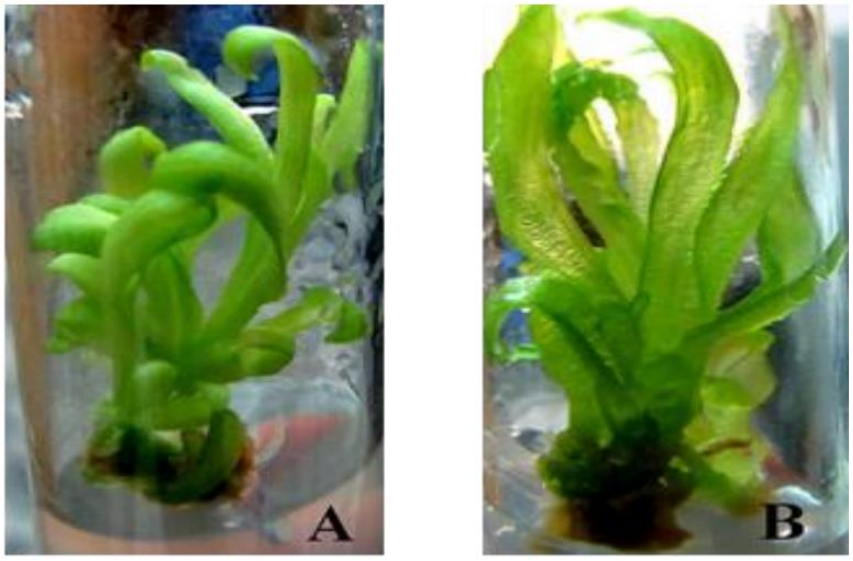



**Figura 4 -** A) Plantas Normais *in vitro* B) Plantas com Hiperidricidade *in vitro*
Fonte: KHARRAZI (2017)

Para eliminar ou minimizar este problema, foi desenvolvido um protótipo de Biorreator chamado de imersão temporária (Alvard; Cote; Teisson, 1995). Neste tipo de biorreator, o meio de cultura permanece em contato com o explante por um período pré-determinado.

Descrições comuns sobre micropropagação na literatura, geralmente se referem a sistemas tradicionais de micropropagação *in vitro* nos quais os explantes são cultivados no meio sólido, com um agente solidificante de extrato de algas marinhas, o ágar em pequenos frascos, este sistema os explantes são posicionados um a um no meio, com a extremidade basal do corte para baixo e a extremidade apical acima do meio de cultura. O desempenho, portanto, semelhante ao modo de como as estacas são colocados no substrato, esse processo é trabalhoso e precisa de automação para a produção em larga escala.

Nos últimos anos, o sistema de cultivo em biorreator de imersão temporária vem se mostrando eficiente para multiplicação de várias espécies de plantas, sua eficiência está ligada a uma melhor nutrição através do meio liquido, melhor oxigenação das culturas, melhoramento na qualidade dos

propágulos e consequentemente melhor sobrevivência durante a aclimatação nas estufas (Murch; Liu; Romero; Saxena, 2004).




**Figura 5 -** Exemplos de culturas micropropagadas *in vitro* em biorreator de imersão temporária
Fonte: AUTOR (2023)

De acordo com Escalona et al., (1999), afirmam que os entraves à comercialização de mudas micropropagadas são o alto custo da mão de obra, baixa taxa de sobrevivência das mudas após a aclimatação.

A tecnologia adotada por esse sistema de cultivo proporciona a produção de mudas em larga escala, com maior rapidez e eficiência em relação aos demais métodos convencionais, além disso, essa tecnologia proporciona uma redução no custo de mudas micropropagadas (Ziv, 2000).

O modelo acima descrito consiste em um frasco de dois compartimentos, superior e inferior, interligados. O meio de cultura é introduzido no compartimento inferior, enquanto os explantes são cultivados no compartimento superior. A transferência de meio de cultura do compartimento inferior para o superior é realizada por meio da injeção de ar, alimentando as plantas. Quando todo o meio de cultura migra para o compartimento superior, ocorre borbulhamento, promovendo aeração do meio em contato com o material de cultivo (Figura 7). O Ar é expelido através do

orifício na tampa do compartimento superior. Após o período pré-estabelecido, a pressão do ar no compartimento inferior é aliviada, com a gravidade, fazendo com que o meio de cultura retorne ao compartimento inferior novamente, permanecendo ali até que o ciclo do processo reinicie (Alvard et al., 1993).

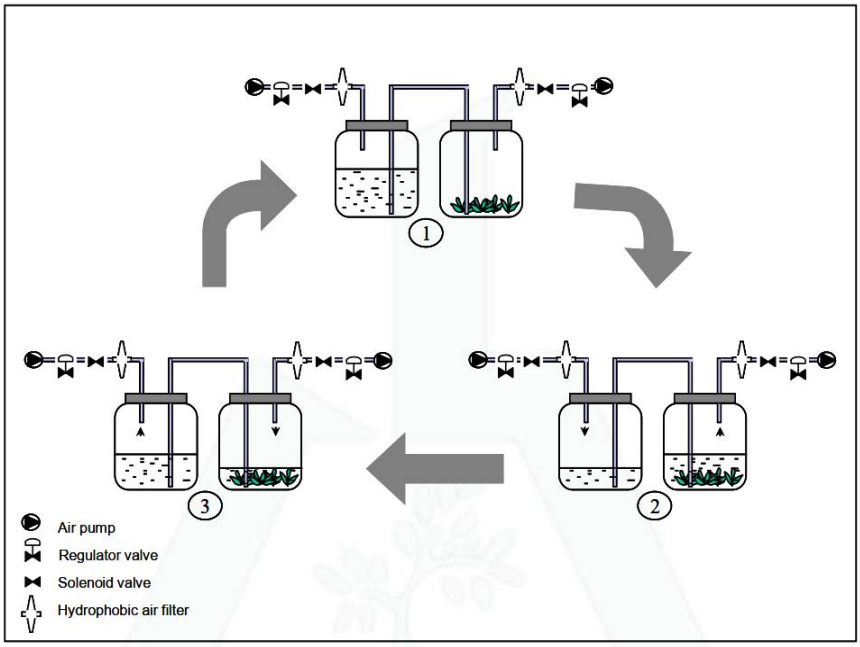



**Figura 6 -** Desenho esquemático do sistema de biorreator de imersão temporária
Fonte: LYAM (2012)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da empresa Terra Viva, localizada na cidade de Santo Antônio da Posse - SP, dividida em duas etapas, a primeira englobou a realização dos experimentos no processo convencional de micropropagação vegetal onde o meio de cultura é solidificado com Ágar, utilizando diferentes concentrações de extratos biofertilizante suplementados ao meio de cultura e os macronutrientes do meio MS substituídos por Peters®, A segunda fase contou com os mesmos processos adotados na primeira fase, com exceção da presença do agar na segunda, uma vez que este é utilizado para solidificar o meio.

Os produtos utilizados forma (1) Extrato de *Ascophyllum nodosum* – AMPEP da empresa canadense ACADIAN®; (2) Extrato de macroalgas arribadas NETUNO da empresa CIA DAS ALGAS® e Extrato de *Lemna minor* da empresa AQUAGREEN®, com um total de 9 tratamentos. Os melhores resultados extraídos da primeira etapa, nos requisitos avaliados foram replicados nos biorreatores de imersão temporária na segunda etapa do projeto.

**Tabela 1** - Meio de cultura da 1 e 2° etapa do experimento

**Micropropagação Vegetal *in vitro***

| **1° Etapa**<br>**Método Convencional** | **2° Etapa**<br>**Método Biorreator** |
|---|---|
| Meio Sólido | Meio Líquido |
| Agar | -- |
| Macro - PETERS® | Macro - PETERS® |
| Micro - MS | Micro – MS |
| Vitamina – MS | Vitamina – MS |
| Hormônio - BAP | Hormônio – BAP |
| Acadian® | Acadian® |
| Cia Algas® | Cia Algas® |
| AquaGreen® | AquaGreen® |

## 4.1. OBTENÇÃO DE EXPLANTES

As matrizes da Cúrcuma foram obtidas a partir de seleção positiva das melhores plantas na estufa seguindo os requisitos genéticos e morfológico da variedade em questão, as melhores plantas foram selecionadas e levadas para adaptação, em casa de vegetação denominada como jardim clonal, assim as plantas são submetidas a pré-tratamentos com fungicida e bactericida, após esses tratamentos, são coletados material vegetal, aplicando os protocolos específicos para cada particularidade da planta, esses protocolos de estabelecimento da Cúrcuma estão descritos no procedimento operacional da empresa Terra Viva (TVCMA-001.2020, figura 8).

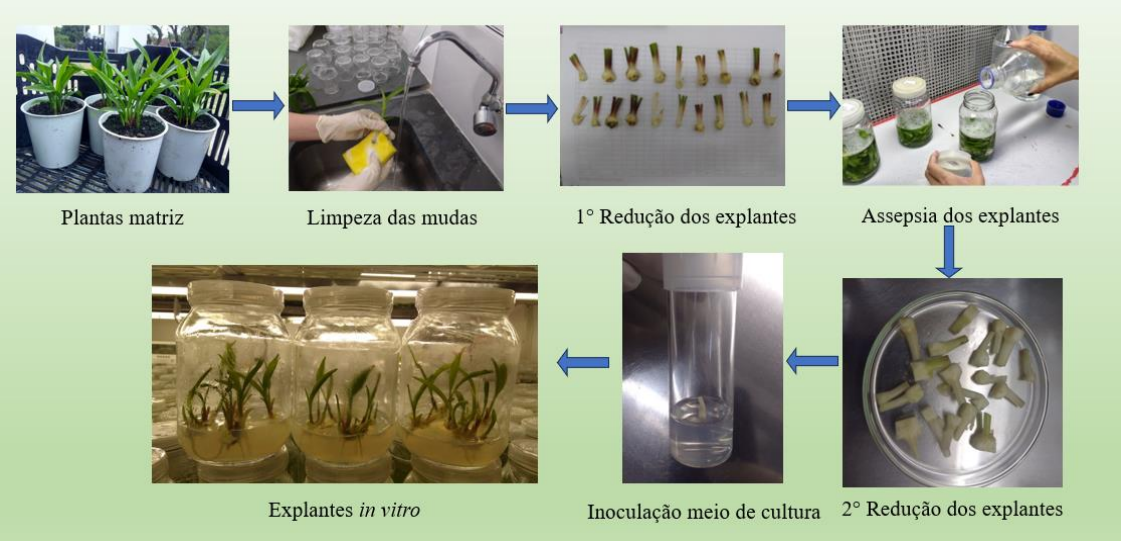



**Figura 7 -** Etapas do protocolo TV CMA - 001.2020 para obtenção de explantes *in vitro*
Fonte: AUTOR (2021)

## 4.2. PRODUÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura foram feitos a partir de receitas pré-determinadas, seguindo os processos e padrão de qualidade necessário dentro de um laboratório de cultura de tecidos.

Primeiro passo para o preparo do meio de cultura é ter uma água de boa qualidade, seguindo os parâmetros químicos, físico e biológico, para isso é muito importante ter no laboratório um equipamento que permita ter essa água pura, no caso do laboratório do Terra Viva, empresa onde

está sendo realizado o experimento conta com um equipamento de Osmose Reversa marca Ecozon®.

Os meios de culturas foram preparados a partir de soluções estoques, com as concentrações determinadas de cada item, estas soluções estoques variam de laboratório para laboratório, dependendo da quantidade de meio de cultura produzido por semana, assim facilita da diluição e permite que o executor erre menos na hora da preparação do meio de cultura.

Para cada fase de desenvolvimento da cultura *in vitro*, as formulações e concentrações dos meios variam conforme as necessidades da planta cultivada. Esses meios se baseiam nas exigências nutricionais das espécies compostos por sais, vitaminas e reguladores de crescimento. Existem modificações, para atender as necessidades específicas *in vitro*.

Todas as soluções devem ser preparadas, com água destilada ou por osmose reversa, sempre observando as exigências de solubilidade química, a tabela abaixo apresenta as quantidades de sais minerais utilizado para o preparo das soluções estoque do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962).

**Tabela 2** - Solução estoque do meio de cultura MS Murashige; Skoog

| Solução Estoque | Componente | Concentração g/l |
|---|---|---|
| Micronutrientes | | |
| F | $MnSO_4.H_2O$ | 1,69 |
| | $H_3BO_3$ | 0,62 |
| | $ZnSO_47H_2O$ | 0,86 |
| | Kl | 0,083 |
| | $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0,025 |
| | $CuSO_4.5H_2O$ | 0,0025 |
| | $CoCl_2.6H_2O$ | 0,0025 |
| Fe.EDTA | $Na_2EDTA.2H_2O$ | 3,73 |
| G | $FeSO_4$ | 2,78 |
| Misturas Orgânicas | Tiamina.HCL | 0,01 |
| H | Ácido Nicotínico | 0,05 |
| | Piridoxina.HCL | 0,05 |
| | Glicina | 0,2 |
| | Mio-Inositol | 10,0 |

O estoque de micronutrientes (F) é preparado dissolvendo cada um dos micronutrientes, um após o outro, em 300 ml de água de osmose, completando o volume para 1000 ml, seguindo agitação, o preparado deve ser colocado em frasco e armazenado em geladeira.

Estoque (G) Fe.EDTA é preparado com a diluição de $Na_2$ EDTA.$_2H_2O$ em 800 ml de água de osmose, após a dissolução manter a agitação e adicionar lentamente $FeSO_4.7H_2$.Após a dissolução completar volume de 1000 ml agitar novamente e armazenar na geladeira. Dessa forma, para o preparo de 1000 ml de meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) deve-se usar 10 ml de cada uma das soluções estoques.

Para as vitaminas também são preparadas soluções estoques, nesse caso por tratar de uma solução orgânica, recomenda-se armazenar em frascos menores e estocar no freezer, a fim de evitar a contaminação por microrganismos.

O estoque (H) é preparado dissolvendo os três componentes em 300 ml de água de osmose, em seguida completando o volume para 1000 ml, agitando bem e armazenado em frascos na geladeira, da mesma maneira são preparados a soluções (I e J).

Os meios de cultura da primeira fase consistem na utilização do meio MS (Murashige; Skoog, 1962) retirando os macronutrientes e acrescentado 0,4 gr/l de Peters® suplementado com 0,6 mg/l de hormônio Benzilaminopurina (BAP), acrescido dos extratos de algas em diversas concentrações, por fim foram submetidos a esterilização em autoclave marca Ortosintese® por 121°C por 20 minutos.

Após esterilização, os meios de culturas são identificados através de uma etiqueta de rastreabilidade onde consta as informações de lote, receita de meio de cultura, autoclave utilizada para esterilização e colaborador responsável pelo processo. Após a identificação, os meios de cultura são armazenados em uma sala de estoque por 14 dias, a 25-27°C, e umidade relativa do ar de 40-80%.



**Figura 8 -** Equipamentos utilizados no laboratório para produção de meio de cultura
Fonte: AUTOR (2023)

### 4.3. EFEITO DE EXTRATOS BIOFERTILIZANTES NO MÉTODO DE PROPAGAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

A primeira etapa do experimento foi conduzida visando verificar se os biofertilizantes a base de extratos de algas ou planta aquática, contribuem para algum aspecto no desenvolvimento das mudas micropropagadas *in vitro*, utilizando método convencional através de meios sólidos. Para tanto, foi utilizado o material inicial composto por explantes obtidos por meio do estabelecimento *in vitro*, seguindo os protocolos da empresa Terra Viva, TVCMA-001.2020.

Dentro do fluxo laminar, os explantes foram manipulados seguindo os protocolos padrão TVCMA-001.2020, corte das folhas, desbaste de raízes e individualmente inoculação ao meio de cultura, 100 ml de meio solidificado em frascos de volume útil de 600 ml. Em seguida, os explantes inoculados foram cultivados durante 42 dia (6 semanas) em sala de crescimento, fotoperíodo de 16 horas de luz/ 8 horas de escuro, intensidade da lâmpada 1500-2000 lux, temperatura de 25-27°C e umidade de 50-80%.

A composição básica do meio (Condição controle) foi MS, retirando os macronutrientes e adicionado o produto comercial PETERS® 0,4 gr/l + 30gr/L Sacarose + 5,5 gr/L Ágar + 0,6 mg/L BAP, estabilizando o p.H = 5,8. Os demais tratamentos foram compostos pela adição dos extratos biofertilizantes, de acordo com a tabela 3.

**Tabela 3** - Tratamentos compostos por extratos biofertilizantes aplicados nas concentrações finais no meio solido em mg/l

| Biofertilizante | Tratamento | Concentração aplicada no meio de cultura (mg/L) | PETERS® (gr/l) | Ágar (gr/l) |
|---|---|---|---|---|
| Testemunha | T 00 | - | 0,4 | 5,5 |
| Acadian® | T 01 | 0,1 | 0,4 | 5,5 |
| | T 02 | 0,5 | 0,4 | 5,5 |
| | T 03 | 1,0 | 0,4 | 5,5 |
| Cia das algas® | T 04 | 0,1 | 0,4 | 5,5 |
| | T 05 | 0,5 | 0,4 | 5,5 |
| | T 06 | 1 | 0,4 | 5,5 |
| AquaGreen® | T 07 | 0,1 | 0,4 | 5,5 |
| | T 08 | 0,5 | 0,4 | 5,5 |
| | T 09 | 1´0 | 0,4 | 5,5 |

O segundo experimento foi realizado para comparar os métodos de micropropagação convencional, que envolvem o uso de meio sólido, com os métodos que fazem uso de biorreatores de imersão temporária. Os meios de cultura empregados foram os mesmos utilizados no método convencional, sem a adição de produtos solidificante, resultando em um meio de cultura líquido, conforme detalhado na Tabela 4.

**Tabela 4 -** Tratamentos compostos por extratos biofertilizantes aplicados nas concentrações finais no meio de cultura liquido em mg/l

| Biofertilizante | Tratamento | Concentração aplicada no meio de cultura (mg/L) | PETERS® (gr/l) | Ágar (gr/l) |
|---|---|---|---|---|
| Testemunha | T 00 | - | 0,4 | * |
| Acadian® | T 01 | 0,1 | 0,4 | * |
| | T 02 | 0,5 | 0,4 | * |
| | T 03 | 1,0 | 0,4 | * |
| Cia das algas® | T 04 | 0,1 | 0,4 | * |
| | T 05 | 0,5 | 0,4 | * |
| | T 06 | 1 | 0,4 | * |
| AquaGreen | T 07 | 0,1 | 0,4 | * |
| | T 08 | 0,5 | 0,4 | * |
| | T 09 | 1,0 | 0,4 | * |

Para a montagem dos recipientes dos biorreatores, foram utilizadas duas garrafas plásticas transparente do tipo pet, com capacidade de 5 litros, conectadas entre si e esterilizadas com Hipoclorito de Sódio a 2,5%, nesse processo, adicionou-se 1 ml de detergente neutro, a uma exposição de 5 minutos as conexões foram feitos através de mangueiras autoclavável de silicone atóxico, com diâmetro externo de 8 mm e interno de 4 mm, com as tampas de plástico rosqueada em polipropileno randômico, com duas saídas externas e uma saída interna, rosca de ¼ de volta, esterilizadas em autoclave por 121°C por 30 minutos, após a esterilização das garrafas e as tampas com as mangueiras os biorreatores figura 10 foram montadas dentro da câmara de fluxo laminar.



**Figura 9 -** Tampa de plástico autoclavável e garrafa com as conexões do sistema de biorreator de imersão temporária

Para conexão das garrafas com o sistema do biorreator de imersão temporária, ao final das mangueiras são utilizado filtro de polipropileno autoclavável, com membrana filtrante com porosidade 0,22 µm, diâmetro externo do filtro de 40 mm e sua membrana filtrante de 33 mm, sua área de filtração é de 8,5 cm², com pressão máxima de 75 psi (5,2 bar).

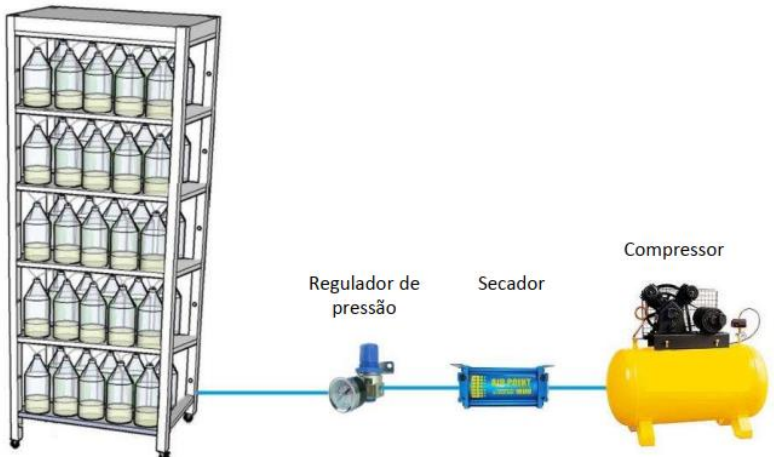



**Figura 10 -** Sistema completo do biorreator de imersão temporária, compressor, secador, regulagem de pressão e as prateleiras com as garrafas acopladas

As garrafas foram mantidas em estoque por 48 horas após a esterilização antes de serem inoculadas com os explantes, visando reduzir a incidência de contaminantes. Os biorreatores foram

instalados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz/ 8 horas de escuro, intensidade da lâmpada 1500-2000 lux, temperatura de 25-27°C e Umidade de 50-80%, as imersões ao meio de cultura foram feitas 8 vezes ao dia, durante 5 minutos de imersão, e a cada intervalo entre os horários, foi realizada uma inserção de ar por 5 minutos.

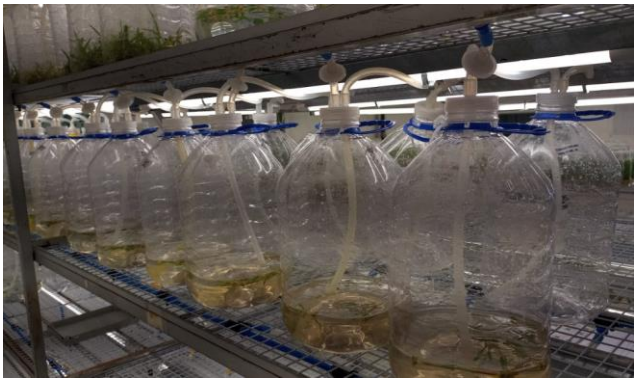


**Figura 11 -** Cúrcuma Ornamental Splash® na garrafa estéril conectada ao sistema de biorreator de imersão temporária

### 4.4. ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram coletados ao fim do ciclo de multiplicação, seguindo informações do protocolo desenvolvido dentro da empresa Terra Viva (TVCMA – 001.2020), que preconiza que o ciclo finaliza após 42 dias (6 semanas) de crescimento. Para a coleta dos dados, os explantes foram retirados de dentro do frasco estéril, através de uma pinça e colocados em papel quadriculado para medição do tamanho das plantas, 1 cm por 1 cm, onde a visualização do tamanho das plantas, quantidade de raiz, fator de propagação são mais visíveis na figura 10, pode ser observado o papel utilizado como referência.

Para o primeiro experimento processo convencional de micropropagação, foram avaliados três frascos contendo vinte plantas em cada frasco, totalizando sessenta amostras de cada tratamento, sendo assim nove tratamentos mais  o controle, para o segundo experimento processo de micropropagação foi feita em sistema de biorreator de imersão temporária foram avaliadas duas garrafas contendo cinquenta plantas, totalizando cem amostras de cada tratamento mais o controle.

As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância com nível de probabilidade ($p < 0.01$). Quando detectado diferença significativa entre as médias, as mesmas comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, foi utilizado o SIVAR, sistema computacional de análise estatística.

Para os cálculos de custo dos meios de cultura foi utilizada uma planilha de Excel, da empresa Terra Viva, que contempla informações cadastrais e consumo de todos os insumos utilizados para produção de meio de cultura.

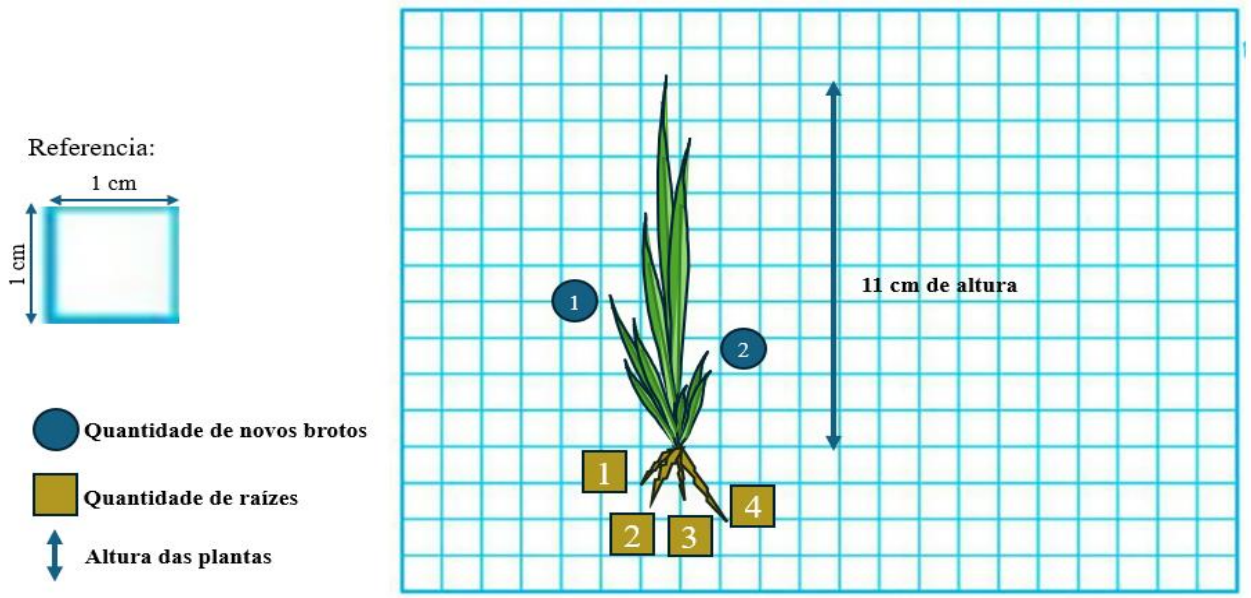



**Figura 12 -** Imagem da tabela quadriculada utilizada para coleta de resultado
Fonte: AUTOR (2023)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 42 dias (6 semanas) de ciclo de crescimento, as mudas cultivadas foram removidas do meio de cultura para comparação e avaliação dos parâmetros estabelecidos entre a testemunha e os tratamentos. Cada muda foi avaliada individualmente de forma a comparar o efeito dos tratamentos no bioprocesso de cultivo *in vitro*.

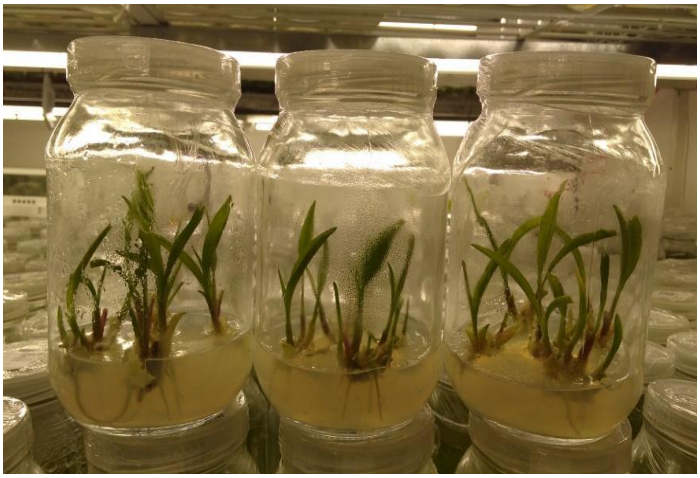


**Figura 13 -** Mudas de Cúrcuma in vitro após 42 dias (6 semanas) na sala de crescimento
Fonte: AUTOR (2023)

### 5.1. RESULTADOS DO SISTEMA CONVENCIONAL DE MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CURCUMA SPLASH

Para o fator de propagação (numero) de Cúrcuma micropropagadas, no sistema convencional comparando, em respostas aos extratos biofertilizantes e substituição dos macronutrientes do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) por Peters® 0,4 gr/l. T0 testemunha; T01, T02, T03 Acadian®; T04, T05, T06 Cia das Algas®; T07, T08, T09 AquaGreen® nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l respectivamente, conforme apresentado na figura 15.

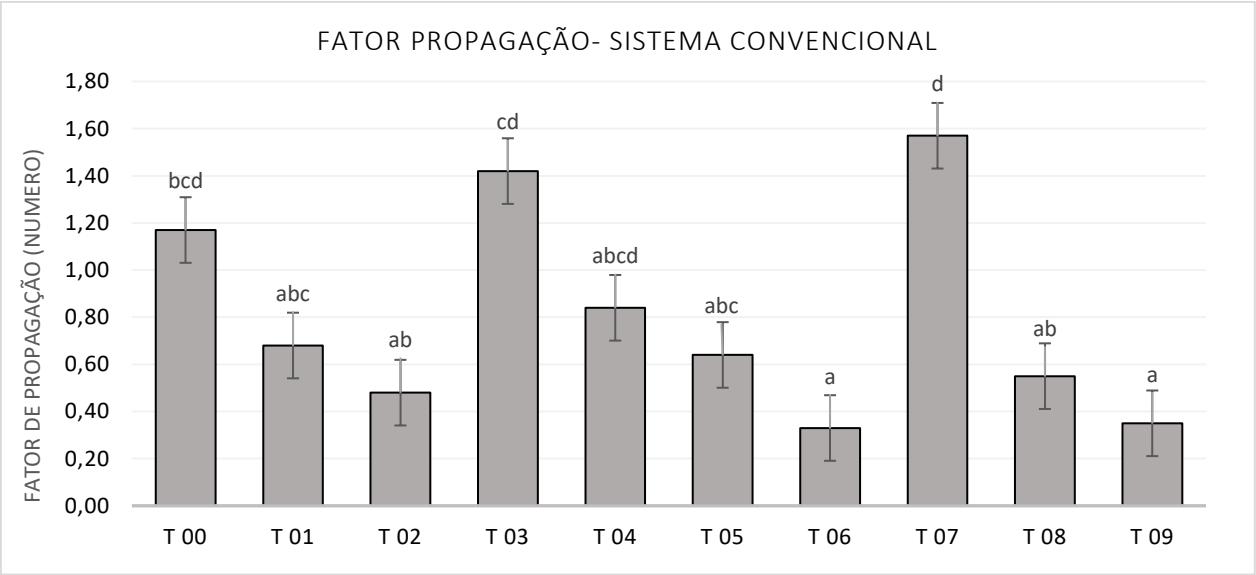



**Figura 14** - Média dos números de novos brotos do método convencional de micropropagação

Na fase de multiplicação *in vitro* utilizando o método convencional de micropropagação, podemos observar que apesar de alguns extratos não apresentarem diferença significativa, cabe destacar as concentrações entre eles, sendo que alguns demonstram melhor eficiência na menor concentração. Exemplo dessa figura15 onde nos tratamentos Cia Algas® e AquaGreen®, pode-se observar que as menores concentrações apresentam melhores resultados, em uma análise individual por tratamento.

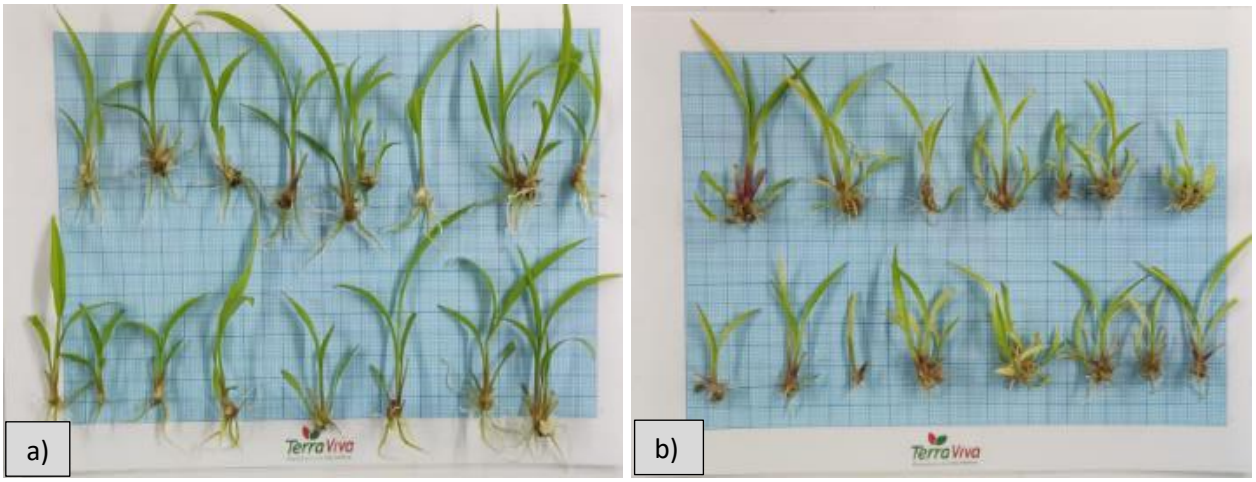



**Figura 15 -** A) Plantas *in vitro* testemunha e B) Plantas *in vitro* T 07 – AquaGreen® 0,1 mg/l
Fonte: AUTOR (2023)

A altura das plantas (cm) de Cúrcuma micropropagadas em sistema convencional em respostas aos extratos biofertilizantes e substituição dos macronutrientes do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) por Peters ®0,4 gr/l. T0 testemunha; T01, T02, T03 Acadian®; T04, T05, T06 Cia das Algas®; T07, T08, T09 AquaGreen® nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l respectivamente, conforme apresentado na figura 17.

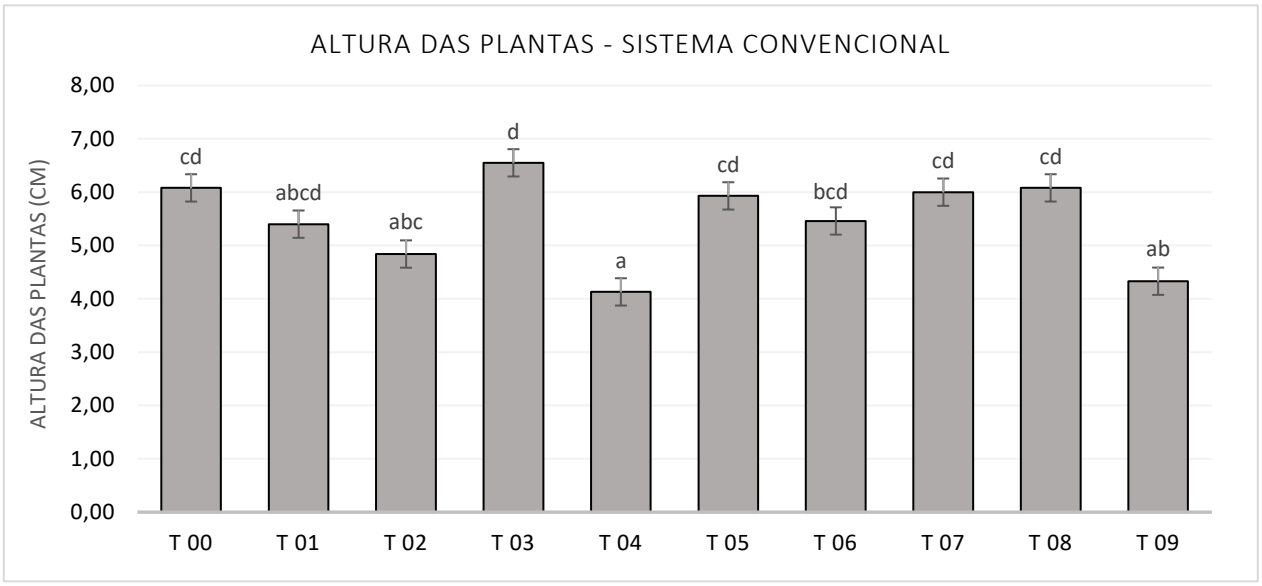



**Figura 16 -** Resultado do método convencional de micropropagação altura das plantas (cm)

O desenvolvimento das folhas e o alongamento das plantas *in vitro* são fatores fundamentais para um bom protocolo de micropropagação, é uma preparação das estruturas celulares para enraizamento dos explantes, o resultado dos tratamentos com os biofertilizantes não apresentaram diferenças significativas, e também nenhuma diferença entre as concentrações sugeridas, inclusive a testemunha obteve um ótimo resultado, a cúrcuma ornamental Splash® não possui dificuldade em alongamento dos explantes, o menor resultado T04 Cia Algas® na menor concentração ainda é considerado um bom tamanho de desenvolvimento 4,13 cm de altura.

Para a avaliação da quantidade de raízes (número) de cúrcuma micropropagadas, no sistema convencional, em respostas aos extratos biofertilizantes e substituição dos macronutrientes do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) por Peters® 0,4 gr/l. T0 testemunha; T01, T02, T03 Acadian®; T04, T05, T06 Cia das Algas®; T07, T08, T09 AquaGreen® nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l respectivamente, conforme apresentado na figura 18.

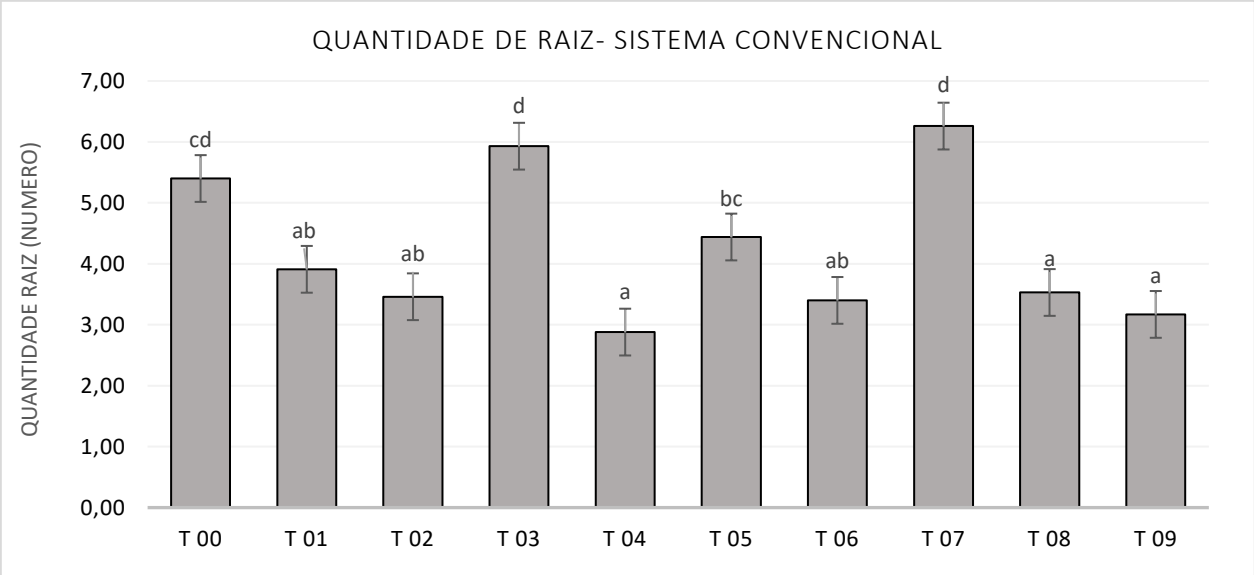



**Figura 17** - Resultados do método convencional quantidade de raiz (número)

A última fase dentro do laboratório é o enraizamento que corresponde ao desenvolvimento do número de raízes, para esta análise podemos observar que houve uma pequena diferença significativa entre os tratamentos e o destaque está no T 03 e T 07 onde o produto Acadian® na

maior concentração 1,0 ml/l obteve resultado igual ao AquaGreen® na menor concentração de 0,1 ml/l do biofertilizante, obtendo uma resposta do explante de uma média de 6,26 números de raízes desenvolvidas

## 5.2. RESULTADOS DO SISTEMA DE BIORREATORES DE IMERSSÃO TEMPORÁRIA DE MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CÚRCUMA SPLASH

Para o fator e propagação (Número) de brotos micropropagadas, no sistema de biorreatores de imersão temporária, em respostas aos extratos biofertilizantes e substituição dos macronutrientes do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) por Peters 0,4 gr/l. T0 testemunha; T01, T02, T03 Acadian®; T04, T05, T06 Cia das Algas®; T07, T08, T09 AquaGreen® nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l respectivamente, conforme apresentado na figura 19.

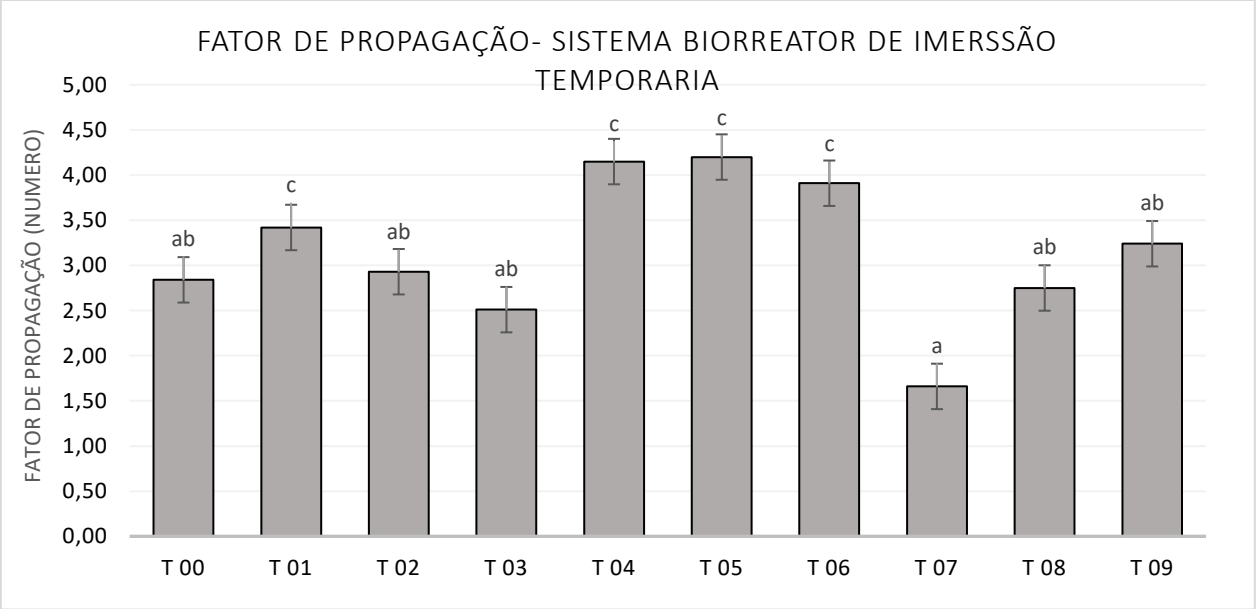



**Figura 18 -** Resultado do método biorreator de imersão temporária fator de propagação (número)

Na fase de multiplicação *in vitro* utilizando o método de biorreator de imersão temporária de micropropagação podemos observar que o biofertilizante Cia das Algas® em todas as três concentrações, registraram os resultados mais significativos, com uma média de resposta do explante de 4,15 geração de novos brotos, mas o T01 também obteve resultados significativo em

comparação com a testemunha e demais tratamentos, com uma média de 4,20 número de novos brotos, a testemunha obteve uma média de 2,84 de número de novos brotos.

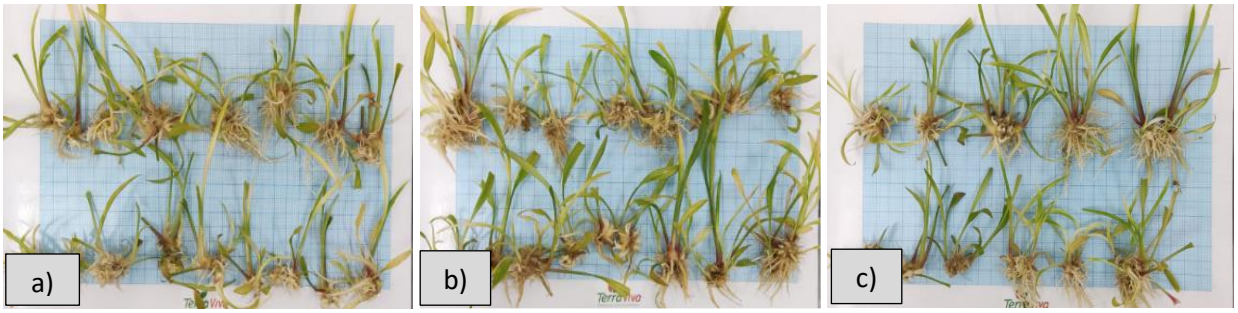



**Figura 19 -** a) T 04 0,1 mg/l Cia Algas b)T 05 0,5 mg/l c) T 06 1,0 mg/l Cia Algas

A altura das plantas (cm) de Cúrcuma micropropagadas em sistema de biorreatores de imersão temporária em respostas aos extratos biofertilizantes e substituição dos macronutrientes do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) por Peters® 0,4 gr/l. T0 testemunha; T01, T02, T03 Acadian®; T04, T05, T06 Cia das Algas®; T07, T08, T09 AquaGreen® nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l respectivamente, conforme apresentado na figura 21.

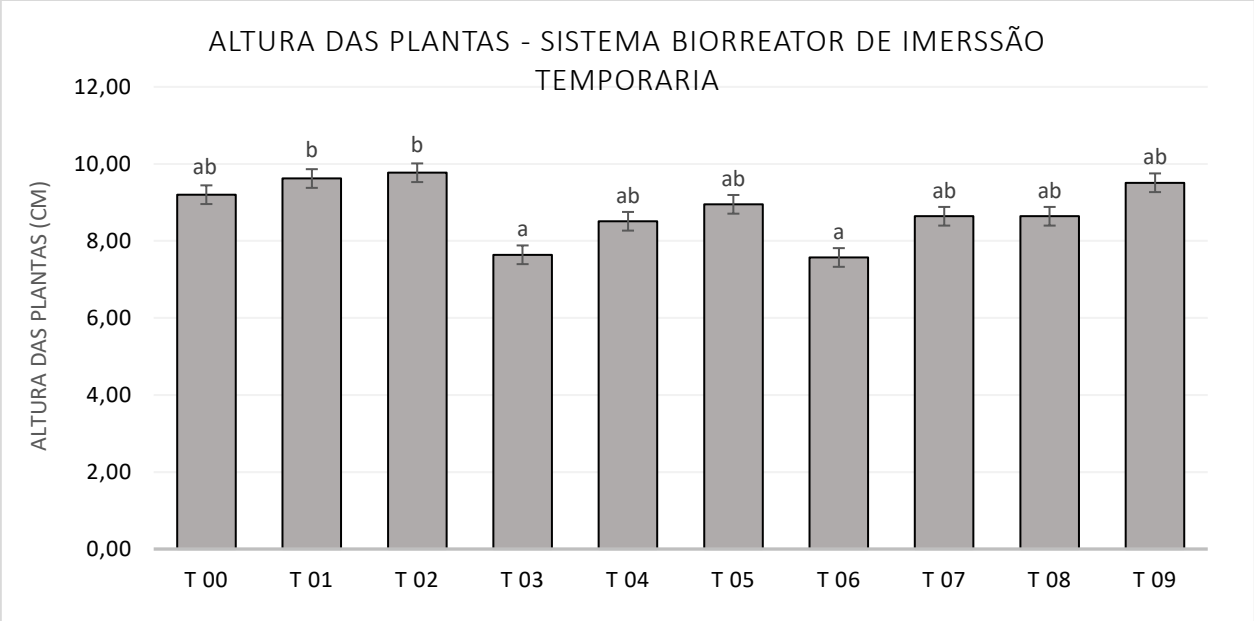



**Figura 20 -** Resultados do método biorreatores de imersão temporária de micropropagação altura das plantas (cm)

O resultado dos tratamentos com os biofertilizantes em biorreator de imersão temporária quanto ao alongamento das plantas não apresentaram diferenças significativas, e nenhuma diferença das concentrações sugeridas, inclusive a testemunha obteve um ótimo resultado uma média 9,20 cm de altura.

Para a avaliação da quantidade de raízes (número) de cúrcuma micropropagadas, no sistema biorreatores de imersão temporária, em respostas aos extratos biofertilizantes e substituição dos macronutrientes do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) por Peters® 0,4 gr/l. T0 testemunha; T01, T02, T03 Acadian®; T04, T05, T06 Cia das Algas®; T07, T08, T09 AquaGreen® nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l respectivamente, conforme apresentado na figura 22.

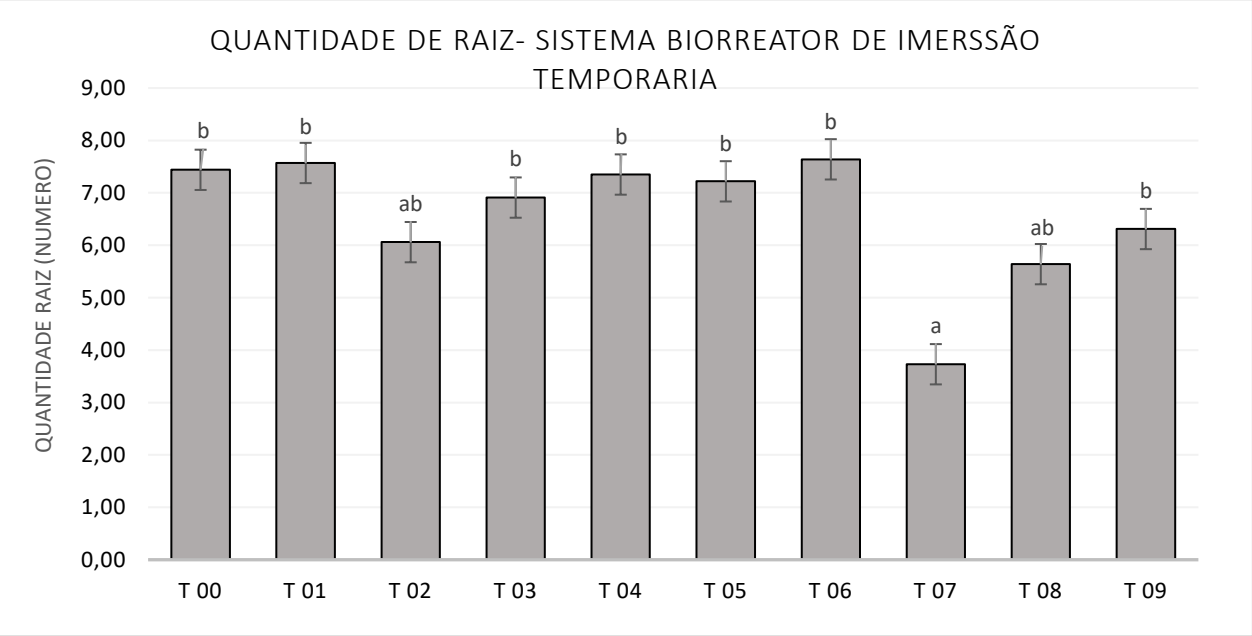



**Figura 21** - Resultados do método biorreatores de imersão temporária quantidade de raiz (número)

Na avaliação correspondente a quantidade de raízes desenvolvidas em sistema de biorreator de imersão temporária, não obteve diferença significativa entre os tratamentos e concentrações sugeridas, com uma média de 7,64 cm de altura, inclusive a testemunha, com uma média de 7,44 cm de altura, o tratamento T07 em análise no gráfico mostra o resultado menor em comparação

com os outros tratamentos, onde corresponde  a menor concentração do AquaGreen®, com uma média de 3,73 cm de altura.

Na fase de multiplicação o objetivo é conseguir o maior número de plantas possíveis, utilizando a nomenclatura de contagem como fator de propagação, geração de novos brotos, conseguir volume e quantidade exponencial de plantas *in vitro*, o presente trabalho conseguiu resultados significativos no método convencional de micropropagação, ao utilizar 0,4 gr/l do fertilizante comercial Peters®, na substituição dos macronutrientes, e também na suplementação com biofertilizantes ao meio de cultura, desta maneira o principal produto a se destacar no método convencional é a suplementação com biofertilizante AquaGreen®, utilizando baixa concentração 0,1 mg/l, conseguimos obter uma  média foi de 1,57 número de novos brotos, nos mesmos tratamentos porém utilizando biorreator de imersão temporária, meio de cultura liquido o biofertilizante que obteve melhor resultado foi o Cia das Algas® em concentração de 0,5 mg/l obtendo uma média de 4,20 número de novos brotos.

Com estes números o trabalho mostra que o método de biorreator de imersão temporária é muito mais eficiente do que o método convencional na fase de multiplicação i*n vitro*, aumentando em 200 % do número de novos brotos além da redução dos custos para produção de meio de cultura, a utilização de biofertilizantes como fonte de suplementação ao meio de cultura é algo novo no setor de micropropagação, mas na literatura é possível verificar alguns estudos que abordam sobre substituição dos macronutrientes por fertilizantes naturais, à exemplo, o trabalho apresentado por Galdiano Junior et al (2012), também utilizaram o fertilizante Peters® no meio de cultura em orquídeas *Cattleya trianaei*, utilizando método convencional de micropropagação e também comparando com o meio MS, neste trabalho foi demonstrando que houve pouca diferença entre as concentrações do meio MS com a dos fertilizantes, porém o número de raízes ainda foi maior para o meio com fertilizantes do que ao MS, fortalecendo a ideia de que o crescimento das raízes é favorecido em plantas cultivadas com fertilizantes comerciais.

Se comparar o sistema convencional com macronutrientes P.A substituindo por fertilizante Peters® como fonte de nitrato a redução no custo do meio de cultura foi de 11%, se comparar sistema em biorreator de imersão temporária substituindo os macronutrientes P.A por Peters® a

redução do custo do meio de cultura de 35%, e por fim se comparar o sistema convencional com macronutrientes P.A com sistema de biorreator de imersão temporária substituindo os macronutrientes por Peters® a redução de custo do meio de cultura foi de 80%.

Mesmo com a falta de trabalhos publicados e pouca informação que citam a suplementação de meio de cultura i*n vitro*, com biofertilizantes alguns autores citam a existência de hormônios nos extratos de algas, Saeqer et al., (2020), diz que extrato de algas marinhas é uma fonte natural de citocininas, que além de promover a divisão celular, retarda a senescência das plantas, o que pode influenciar a taxa fotossintética das culturas e consequentemente levar a um maior crescimento das plantas.

As informações de Saeger et al, (2020) justifica a utilização dos biofertilizantes em suplementação ao meio de cultura em fase de multiplicação *in vitro* tanto no método convencional quanto ao sistema de biorreator de imersão temporária, já que nesta fase as plantas necessitam de necessidade dos hormônios de divisão celular disposto ao meio de cultura.

Unemoto et al., (2007) obtiveram bons resultados na propagação in vitro de *Oncidium nanun* e *Cattleya forbesii* em meio de cultura com formulação simplificada acrescido adubo comercial NPK (6:6:8) através de dados estatístico, após 8 meses de cultivo, onde relatam melhor desempenho em meio contendo fertilizante quando comparado com o meio MS, para micropropagação de cúrcuma ornamental *in vitro* o tempo de cultivo foi de 42 dias após a inoculação e obtendo resultados bastante positivos.

O desenvolvimento das plantas *in vitro* e crescimento foliar está relacionado com a fase de alongamento dentro do laboratório de cultura de tecidos vegetais, esta fase é uma preparação da planta para fase final de enraizamento, contudo o presente trabalho, obteve resultado utilizando o biofertilizante Acadian na maior concentração 1,0 mg/l, onde obteve uma média de 6,55 cm de altura dos explantes, já em comparação com método biorreator de imersão temporária, o biofertilizante que obteve melhor resultado foi o Acadian na concentração de 0,5 mg/l, com uma média de 9,77 cm de altura.

Nesta fase de alongamento o destaque foi também para utilização de biorreator de imersão temporária, sobre esta fundamentação houve trabalhos que destacam a utilização de fertilizantes como fontes nutrição para área foliar e número de raízes como mostra os trabalhos de Favetta, Colombo e Faria, (2014), em trabalho realizado com *Vanda tricolor*, também encontraram bons resultados para área foliar, número de folhas e raízes com utilização de Biofert® o que permitiu a produção de plantas de elevada qualidade e com baixo custo de produção.

Ao fim do ciclo de alongamento, as plantas *in vitro* já apresentam folhas desenvolvidas, altura adequada, faltando o desenvolvimento das raízes, fase essencial para uma boa aclimatação, e o objetivo final é conseguir o maior número de plantas aclimatadas nas estufas, com isso quanto mais o número de raízes desenvolvidas, maior sucesso na aclimatação, no presente trabalho utilizando o método convencional o biofertilizante que obteve melhor resultado foi o AquaGreen® na menor concentração de 0,1 mg/l, com uma média de 6,26 número de raiz desenvolvida, no método utilizando biorreator de imersão temporária o biofertilizante em destaque foi o Cia das Algas®, que não teve diferença significativa entre as concentrações 0,1 mg/l, 0,5 mg/l e 1,0 mg/l, com uma média de 7,63 número de raiz desenvolvida.

Yepes e Aldwinckle, (1994) descreve que quanto ao estado físico do meio de cultura, tem se observado que algumas espécies podem estabelecer um sistema radicular mais vigoroso, quando cultivado em meio líquido com alguma fonte de aeração, como ponte de papel ou meio sob agitação, estas informações estão de acordo com o presente estudo, onde resultados significativos foram obtidos na utilização de meio de cultura liquido utilizando biorreator de imersão temporária, onde existe aeração dos explantes através da injeção de ar comprimido.

Lemos, (1996), afirma que a composição do meio de cultura, e o seu contato com os tecidos e a sua oxigenação são alguns dos fatores que parecem influenciar na capacidade de micropropagação dos explantes *in vitro*, no trabalho realizado com cana-de açúcar *Saccharum spp.*, mostrou que no sistema de biorreator de imersão temporária, a taxa de multiplicação foi 40% maior do que no sistema convencional de micropropagação, e a biomassa produzida, três vezes superior, resultado semelhante por Feria; Jiménez; Chávez, (1998), ao obter um coeficiente de 10,92 no

sistema de biorreator de imersão temporária contra 3,5 no sistema convencional de micropropagação.

## 5.3 RESULTADO DO CUSTO DE PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA

Para análise dos custos de cada produto foi utilizado uma planilha da empresa Terra Viva, atualizado os preços com a data do dia 17/02/2024. O meio de cultura para micropropagação *in vitro* de cúrcuma ornamental Splash® é constituído por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, hormônio, açúcar e agar.

Na tabela 5 abaixo podemos observar um resumo da planilha dos valores de cada subgrupo para a produção de um litro de meio de cultura, onde temos a comparação do método convencional, com o método biorreator de imersão temporária, o uso dos nitratos puro como fonte de macronutrientes, a substituição dos nitratos puro por fertilizante comercial Peters®, e o uso de agar para solidificar o meio ou não já que os biorreatores de imersão temporária utilizam meio líquido.

**Tabela 5** - Valor dos itens para produção de Meio de Cultura - 1 litro

| | Método Convencional | Método Convencional | Biorreator de Imersão Temporária | Biorreator de Imersão Temporária |
|---|---|---|---|---|
| | Nitrato P.A | Peters® 0,4 gr/l | Nitrato P.A | Peters® 0,4 gr/l |
| **Macro** | R$ 0,33 | R$ 0,06 | R$ 0,33 | R$ 0,06 |
| **Micro** | R$ 0,002 | R$ 0,002 | R$ 0,002 | R$ 0,002 |
| **Vitaminas** | R$ 0,05 | R$ 0,05 | R$ 0,05 | R$ 0,05 |
| **Hormônios** | R$ 0,18 | R$ 0,18 | R$ 0,18 | R$ 0,18 |
| **Agar** | R$ 1,73 | R$ 1,73 | R$ 0,00 | R$ 0,00 |
| **Açucar** | R$ 0,20 | R$ 0,20 | R$ 0,20 | R$ 0,20 |
| **Total** | R$ 2,49 | R$ 2,22 | R$ 0,76 | R$ 0,49 |

Para produção de mil litros de meio de cultura, média de consumo anual do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da empresa Terra Viva no sistema convencional utilizando macronutrientes provenientes de fontes de nitratos P.A foi de R$ 2.492,00 reais, para a produção dos mesmos mil litros utilizando Peters® como fonte de macronutrientes foi de R$ 2.222,00 reais, no sistema de biorreator de imersão temporária onde não usa o agar para solidificar o meio, para produção de mil litros de meio com macronutrientes P.A foi de R$ 762,00 reais, e para a produção

dos mesmos mil litros utilizando Peters® como fonte de macronutrientes foi de R$ 492,00 reais, conforme mostra a figura 23.

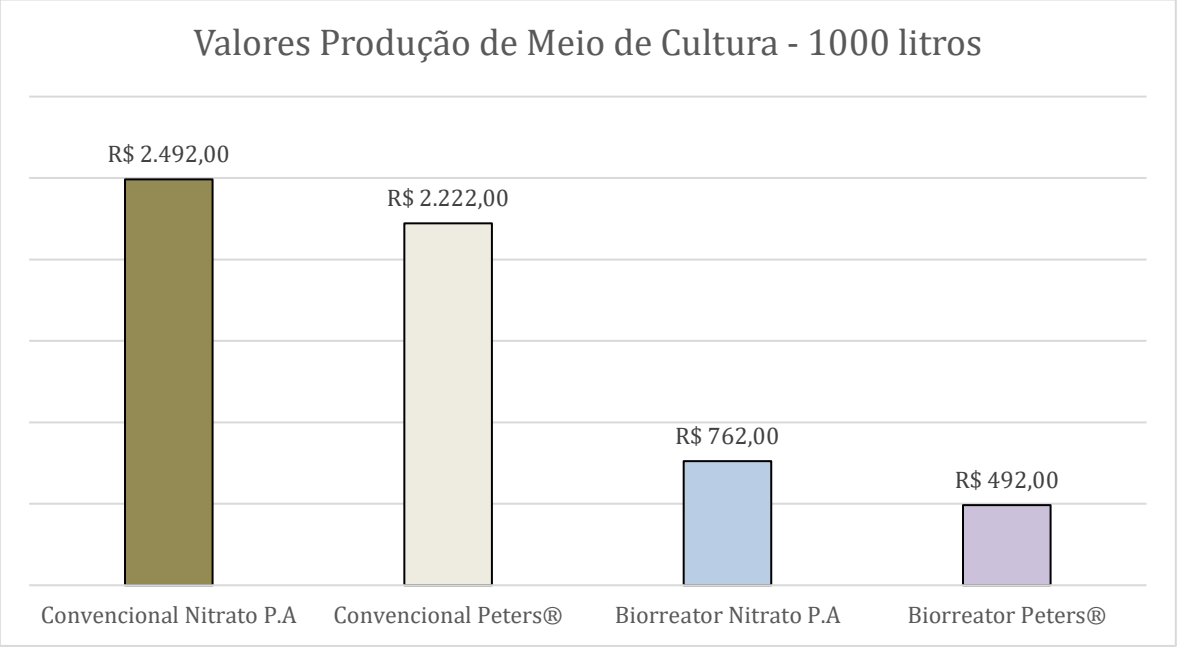



**Figura 22 -** Valores de produção de meio de cultura

Fonte: Autor, 2024.

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho conclui através dos resultados coletados que a substituição dos macronutrientes por fertilizante Peters® 0,4 gr./l demonstrou como uma alternativa economicamente mais viável em comparação ao uso dos macronutrientes P.A.

Em comparação dos métodos de micropropagação *in vitro* de mudas, para ambas as fases o sistema de biorreator de imersão temporária mostrou mais eficiência em comparação com o método convencional nas fases de multiplicação, alongamento e enraizamento.

De acordo com os dados estatísticos, a suplementação do meio de cultura com os biofertilizantes, traz benefícios para produção de mudas micropropagadas *in vitro* na fase de multiplicação o Acadian® e Cia das Algas® melhoram o fator de propagação, no alongamento Acadian®, Cia Algas® e AquaGreen® ajudam no desenvolvimento e crescimento dos explantes e no enraizamento Acadian®, Cia Algas® e AquaGreen® aumentam o número de raízes, a escolha do biofertilizante e suas concentrações depende do processo escolhido entre método convencional ou biorreator de imersão temporária.

Consequentemente essa otimização das fases micropropagadas *in vitro* através da substituição dos macronutrientes por fertilizante comercial Peters®, suplementado com os biofertilizantes e uso de sistema de biorreatores de imersão temporária foram importantes para a diminuição dos custos de produção de meio de cultura.

Todas as plantas micropropagadas deste experimento, tanto do método convencional quanto de biorreator de imersão temporária foram plantadas em estufa de aclimatização para verificação de variação somaclonal, e nenhuma das plantas houve algum tipo de anomalia e 100% de ambos os teste e testemunhas sobreviveram após aclimatação nas estufas.

## 8. REFERÊNCIA

ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v. 32, p.55-60, 1993. DOI: 10.1007/BF00040116

ARDITTI, J.; ERNST, R. 1984 Physiology of Germinating Orchids Seeds. In: Arditti, J., Ed., Orchidbiology, Reviews and Perspectives III, Cornell University Press, Ithaca. 177-222

BALTAZAR, M.; CORREIA, S.; GUINAN, K.J; SUJEETH, N.; BRAGANÇA, R.; GOLÇALVES, B.; Recent Advances in the Molecular Effects of Biostimulants in Plants: an Overview. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1096, 2021. DOI: 10.3390/biom11081096

BIASI, L.A. Reguladores de crescimento vegetal. *In*: WACHOWICZ, C.M.; CARVALHO, RI.N. (ed.). **Fisiologia vegetal**: produção e pós-colheita. Curitiba: Editora Champagnat, 2002. p. 63-94.

BARBOSA, M.H. P.; PASQUAL, M., J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; I. Efeitos da Benzilaminopurina e ácido índole-3-acético sobre a propagação in vitro de Gérbera jamesonii Bolu sex Hook cv. Applebloesem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 15-19, 1993.

BELTRÃO, J.; TRINDADE, D.; CORREA, P.J. Lettuce yeld response to salinity of sprinkle irrigation water. **Acta Horticulturae**, v. 449, p. 623-627, 1997. DOI: 10.17660/ActaHortic.1997.449.86

CECÍLIO FILHO, A.B.; SOUZA, R.J.; BRAZ, L.T.; TAVARES, M. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural,** v. 30, n. 1, p. 171-175, 2000. DOI: 10.1590/S0103-84782000000100028

CRAIG, J.S.; MACKINNON, S.L.; WALTER, J.A. Liquid seaweed extract identified using 1 H NMR profiles. **Journal of Applied Phycology**, Heidelberg, v. 20, p. 665-671, 2007.

COLAPIETRA, M.; ALEXANDER, A. Effect of foliar fertilization on yeld and quality of table grapes. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 721, p. 213-218, 2006.

DAVIS, P.L. **Plant hormones**: physiology, biochemistry and molecular biology. 2nd. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 833 p.

DEBERGH, P. Physical properties of culture media. In: **Plant tissue culture 1982:** proceedings, 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at Tokyo and Lake Yamanake, Japan, July 11-16, 1982/edited by Akio Fujiwara. 1982.

DONALISIO, M.G. Instruções para o cultivo de cúrcuma. **Agronômico** v. 32, p. 171-175, 1980.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B.; DAQUINHA, M.; GONZALEZ, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G. Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant cell Reports**, v. 18, p. 743-748, 1999. DOI: 10.1007/s002990050653

FAVETTA, V.; COLOMBO, R. C.; FARIA, R. T. Cultivo *in vitro* de *Vanda tricolor* Lindl. em meios de cultura simplificados. **Revista de Ciência Agrária,** Belém, v. 57, n. 2, p. 114-117, 2014. DOI: 10.4322/rca.2014.003

FERIA, M.; JIMÉNEZ, E.; CHÁVEZ, M. Influência de las densidad de inóculo y la frecuencia de renovación del medio de cultivo em la propagacion *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp. Híbrido*) utilizando sistemas de inmersión temporal. *In:* ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 3., 1998, Cuba. **Anais** [...]. Cuba: [*s.n.*], 1998. 112 p.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, v. 50, p. 151-158, 1968. DOI:10.1016/0014-4827(68)90403-5

GALDIANO JUNIOR, R.F.; MANTOVANI, C.; LEMOS, E. G. M. Propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden & Reichenbach fil.) (Orchidaceae) em meios de culturas e com doses de fertilizante comercial. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 3, n. 3, p. 210-214, 2012.

GOLDWYN, Lisa Ann. **Methods of micropropagation of Sequoia sempervirens' Aptos Blue'**. California State University, Fresno, 1997.

GOULD, J.M.; BANISTER; S.; HASEGAWA. ; FAHIMA, M.; SMITH, R.H. Regeneration of Gossypium hirsutum and G. barbadense shoot apex tissue for transformation. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 12-16, 1991. DOI: 10.1007/BF00233024

GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric: chemistry, technology and quality. **CRC: Critical Review in Food Science and Nutrition,** v. 12, n. 3, p. 199 – 301, 1980. DOI: 10.1080/10408398009527278

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, Embrapa- CNPH, 1998. v. 1, p. 183-242.

HERTWIG, IGOR FRANCISCO VON HERTWIG. **Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem, comercialização**. Icone, 1986.

HESS, Dieter. **Plant physiology: molecular, biochemical, and physiological fundamentals of metabolism and development**. Springer Science & Business Media, 2012.

IBRAFLOR. Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil. São Paulo: IBRAFLOR, 2015.

KHARRAZI, Mahdiyeh et al. Factors Affecting Plant Tissue Hyperhydricity at in vitro Culture and Strategies to Resolve it Case Study:(Dianthus caryophyllus L.). Flower and Ornamental Plants, v. 1, n. 2, p. 85-95, 2017.

KHAN, W.; RAYIRATH, U.P.; SUBRAMANIAN, S.; JITHESH, M.N.; RAYORATH, P.; HODGES, D.M.; CRITCHLEY, A.T.; CRAIG, J.S.; NORRIE, J.; PRITHIVIRAJ, B. Seaweed extract as biostimulants of plant growth and development. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 28, p. 386-399, 2009. DOI: 10.1007/s00344-009-9103-x

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, maio 1997.

KESER, M.; SWENARTON, J.T.; FOERTCH, J.F. Effects of thermal input and climate change on growth of Ascophyllum nodosum (Fucales, Phaeophyta) in Eastern Long Island Sound (USA). **Journal of Sea Research**, Amsterdam, v. 54, p. 211-220, 2005. DOI: 10.1016/j.seares.2005.05.001

LYAM, P.T.; MUSA, M.; JAMALEDDINE, Z.O.; OKERE, U.A.; ODOFIN, W.T. (2012). The potential of Temporary Immersion Biorreactors (TIBs) in meeting crop production demand in Nigeria. **Journal of Biology and Life Science**, v. 3. n. 1, p. 66-86, 2012. DOI: 10.5296/jbls.v3i1.1156

LEMOS, E.E.P. **Experimentos em micropropagação e organogênese na graviola (*A. muricata* L.)**. Maceio: EDUFAL, 1996. 43p.

LEVIN, R; GABA, V.; TAL, B; HIRSCH, S; DE NOLA, D.; VASIL, I.K. Automated plant tissue culture for mass propagation. **Bio/Technology**, v. 6, p. 1035-1040, 1988. DOI: 10.1038/nbt0988-1035

LLOYD, G.; McCOWN B. Commercially - feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifólia by use of shoot - tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1981.

LOVATO, P. E.; GIANINAZZI, S.; TROUVELET, A., & GIANINAZZI - Pearson, V. (1996). The state of art of mycorrhizas and micropropagation.

MAIA, N.B. **A cúrcuma como corante**. *In*: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS, 2., Campinas, 1991. Campinas: ITAL, 1991. p. 65.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa de Potassa e fosfato, 1997. 319 p.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. Cultura de tecidos de plantas lenhosas. Santa Maria: UFSM, CEPEF, FATEC, 1998, 22p.

MACKINNON, S.L.; HILTZ, D.; UGARTE, R.; CRAFT, C.A. Improved methods of analysis for betaines in Ascophyllum nodosum and its commercial seaweed extract. **Journal of Applied Phycology**, Heidelberg, v. 22, p. 489-494, 2010. DOI: 10.1007/s10811-009-9483-0

MELLO, M.O.; AMARAL, A.F.C.; MELO, M. Quantificação da micropropagação de *Cúrcuma zerdoária* Roscoe. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 703-707, 2000. DOI: 10.1590/S0103-90162000000400016

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação in vitro. **ABCTP Noticas**, Brasília, DF, n. 36, p.5-10, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

MURCH, S.J.; LIU, C.; ROMERO, R.M.; SAXENA, P.K. In vitro culture and temporary immersion bioreactor production of Crescentia cujete. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 63-68, 2004.

OLIVEIRA, B.C.; NASCIMENTO, R.N.; SILVA, G.R.S.; LOPES, C.L. Revista Livre De Sustentabilidade e Empreendorismo, v.6, n.2, p. 180-200, mar-abr, 2021.

PÉRET-ALMEIDA L**. A influência da radiação gama na inibição do brotamento do rizoma e na qualidade da cúrcuma em pó.** 2000. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo horizonte, 2000.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, n. 4, p. 12-5, 1998.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Textos acadêmicos**: cultivo e processamento de plantas medicinais. Lavras: FAEPE/UFLA. 2001. 169 p.

PREIL, W.; FLORECK, P; WIX, U.; BECK, A. Towards mass propagation by use of biorreactors. **Acta Horticulturae**, v. 226, p. 99-105, 1988. DOI: 10.17660/ActaHortic.1988.226.9

REFLORA. **Curcuma longa L**. 2015. Disponível em: https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/geral/ExibeFiguraFSIUC/ExibeFiguraFSIUC.do?idFigura=227032087. Acesso em: 22 dezembro 2023

SAEQER, J.; PRAET, S.V.; VEREECKE, D.; PARK, J.; JACQUES, S.; HAN, T.; DEPUYDT, S. Toward the molecular understanding of the action mechanism of Ascophyllum nodosum extracts on plants. **Journal of Applied Psychology**, New York, v. 32, n. 1. p. 573–597, 2020. DOI: 10.1007/s10811-019-01903-9

SHUKLA, P.S; MANTIN, E.G; ADIL, M; BAIPAI, S.; CRITCHLEY, A.T.; PRITHIVIRAI, B. *Ascophyllum nodosum*-based biostimulants: sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. **Front. Plant Sci.,** v. 10, 655, 2019. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00655.

SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of indian traditional medicinal medicine with antioxidants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p. 23-43, 2000. TAINTER, D.R.; GRENIS, A.T. **Especias y aromatizantes alimentarios**. Zaragoza: Ed. Acríbia, 1996. 251 p. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00213-0

REFLORA. **Curcuma longa L**. 2015. Disponível em: https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/geral/ExibeFiguraFSIUC/ExibeFiguraFSIUC.do?idFigura=227032087. Acesso em: 22 dezembro 2023

TERRA VIVA. CURCUMA SPLASH®, 2023. Disponível em: https://www.terraviva.agr.br/curcuma. Acesso em: 09 novembro 2023

TAKAYAMA, S; ARIMA, Y.; AKITA, M. Mass propagation of plants by fermenter culture techniques. In: **Abst. 6th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Int. Assoc. Plant Tissue Cult. University of Minnesota**. 1986. p. 449.

TORRES, A.C; CALDAS, L. S. BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA Produção de Informação, Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, 1998. v. 2, p. 183-260.

TORRES, A.C. BARBOSA, N. V. DOS E.; WILLADINO, L.; GUERRA, M.P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**. Brasília, 2001. 20 p. (Circular Técnica, 24).

UGARTE, R.A.; SHARP, G.; MOORE, B. Change in the brown seaweed Acophyllum nodosum (L.) Le Jol. Plant morphoçogy and biomass produced by cutter rake harvests in Southern New Brunswick, Canada. **Journal of Applied Phycology**, Heidelberg, v. 18, p. 351-359, 2006.

UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociências,** Pelotas, v. 13, n. 2, p. 267-269, 2007.

ZIV, M. Bioreactor technology for plant micropropagation. **Horticultural Reviews**, v. 24, p. 1-30, 2000.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of thirteen Malus cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. **Plant Growth Regulation**, v. 15, p. 55-67, 1994. DOI: 10.1007/BF00024677