

**Radjiskumar Mohan**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS: BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUPORTE ALTERNATIVO NA FASE DE  
ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MACIEIRA,  
MORANGUEIRO E CAFEIRO**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor no Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, área de concentração Agroindústria, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Carlos R. Soccol  
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz A. Biasi

**CURITIBA – 2005**

À minha avó Ramradjie Boedhan Mohan (In memoriam), pelo apoio à minha educação e sonhos.

Aos meus pais Swamipersad Mohan e Radjpatie Mathoera, pelo distante apoio no decorrer deste trabalho.

Aos meus irmãos e irmãs pela grande força de continuidade em qualquer momento.

E, aos meus estagiários que sempre estiveram ao meu lado em todos os instantes no decorrer deste trabalho.

## **Agradecimentos**

Ao Professor Carlos Ricardo Soccol, pela orientação durante a realização deste trabalho, mostrando a verdadeira importância da pesquisa inovadora e útil.

Ao Professor Luiz Antonio Biasi, pela co-orientação, e o espaço cedido no seu laboratório de pesquisas e na casa de vegetação.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação e Doutorado em Processos Biotecnológicos, Professora Luciana de Porto Vanderbeghe.

Ao meu grande amigo, cientista, químico, bioquímico, biotecnólogo e craque em análises de compostos orgânicos, pela grande ajuda na realização de uma grande parte do trabalho de extração, separação e caracterização do suporte alternativa e outras idéias, Professor Dr. Jean Lorquin do “Institut de Recherche pour le Development” (IRD), França.

Aos meus estagiários: Cléo Maricio Lusa, Eduardo Assami Chui, Susan Karp, Camila Suarez e, especialmente a Marcos Felipe Wietzikoski, que esteve mais presente em todos os momentos, pela ajuda e elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas doutorandos, mestrandos, técnicos e os outros professores os quais sempre estiveram presentes no laboratório apoiando-me moralmente.

Ao consórcio Embrapa-Café pela liberação dos recursos para a montagem e custeio parcial dos trabalhos inovadores.

À CAPES-MEC pela disponibilidade da bolsa, a qual ajudou-me na manutenção parcial durante todo este trabalho.

A “Deus” pelo sucesso do trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b> .....	III
<b>SUMÁRIO</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	VI
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	X
<b>RESUMO</b> .....	XII
<b>ABSTRACT</b> .....	XIV
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
Referências .....	4
<b>2. TRATAMENTO, ANÁLISE, E VISUALIZAÇÃO DO SUPORTE À BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR</b> .....	6
2.1. Introdução .....	7
2.2. Material e Métodos .....	11
2.3. Resultados e Discussão .....	17
2.3.1. Processo de extração do bagaço de cana-de-açúcar e a sua otimização .....	17
2.3.1.1. A escolha da melhor mistura de solventes orgânicos para a extração .....	17
2.3.2. Identificação dos compostos fenólicos e outras moléculas extraídas .....	19
2.3.2.1. Compostos fenólicos .....	19
2.3.2.2. Identificação de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) nos hidrolizados .....	23
2.3.2.3. Extração com acetato de etila e hidrólise básica .....	24
2.3.2.4. A perda de oligômeros das ligninas .....	25
2.3.3. A escolha de um processo e a caracterização parcial do bagaço tratado .....	27
2.3.3.1. Caracterização do bagaço tratado por <sup>13</sup> CP-MAS e <sup>1</sup> HR-MAS .....	27
2.3.3.2. Caracterização do bagaço tratado por <sup>1</sup> HR-MAS .....	30
2.3.4. Determinação de Açúcares .....	31
2.3.5. A conservação de um pH ácido depois de tratar o bagaço .....	32
2.3.6. A perda do peso do bagaço (tratado e não-tratado) .....	33
2.3.7. Visualização dos Suportes .....	33
2.4. Conclusão .....	37
Referências .....	38
<b>3. ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES E ACLIMATAÇÃO DAS PLANTAS DA PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’ EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT)</b> .....	40
3.1. Introdução .....	41
3.2. Material e Métodos .....	45
3.3. Resultados e Discussão .....	48
3.3.1. Efeito da Granulometria do Bagaço de Cana-de-Açúcar não tratado (BNT) no Processo de Enraizamento com Microestacas de Macieira ‘Marubakaido’ .....	48
3.3.2. Estudos Específicos de Enraizamento em Suporte a base de Bagaço de Cana-de-açúcar não tratado (BNT) e tratado (BT) em relação ao Suporte comercial a base de Ágar .....	49
3.3.3. Umidade Relativa (RH) e Atividade de Água (Qw) .....	54
3.3.4. Estudo econômico comparativo entre os três meios de enraizamentos utilizados .....	56
3.4. Conclusões .....	58
Referências .....	59
<b>4. ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE MORANGUEIRO ‘CAMAROSA E ‘DOVER’ E ACLIMATAÇÃO DOS EXPLANTES EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO (BT) MISTURADO COM BAGAÇO DE MANDIOCA</b> .....	61
4.1 Introdução .....	62

4.2. Material e Métodos.....	64
4.3. Resultados e Discussão.....	67
4.3.1. Estudos preliminares .....	67
4.3.2. Testes Específicos de Enraizamento em meio à base de melhor mistura de bagaço de Mandioca e Cana-de-açúcar (suporte alternativo), e o meio Comercial (Ágar) com materiais vegetais cv. <i>Dover</i> e <i>Camarosa</i> .....	68
4.3.3. Umidade Relativa (RH) e Atividade de Água (Qw).....	74
4.3.4. Testes de Aclimatização .....	75
4.3.5. Estudo Econômico.....	78
4.4. Conclusão .....	80
Referências .....	81
<b>5. ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES E ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS DE CAFEIRO ‘CATUAÍ VERMELHO’ EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO (BT)</b> .....	<b>83</b>
5.1 Introdução.....	84
5.2 Material e Métodos.....	87
5.3. Resultados e Discussão.....	92
5.3.1. Obtenção de Material Vegetal.....	92
5.3.2. Enraizamento <i>in vitro</i> em meio à base de Gelrite® e meio alternativo a base de bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT).....	94
5.3.3. Umidade Relativa (RH) e Atividade de Água (Qw).....	97
5.3.4. Estudos de aclimatização.....	97
5.3.5. Estudo Econômico.....	99
5.4. Conclusões.....	101
REFERÊNCIAS .....	102
<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>104</b>
Anexo I.....	105
I - PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGAR PARA ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> (PARA 1000 EXPLANTES).....	105
II – PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA PARA ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> À BASE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT) (PARA 1000 PLANTAS).....	106
<b>Anexo II.....</b>	<b>110</b>
I – PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGAR PARA ENRAIZAMENTO DE 1000 EXPLANTES PARA cv. <i>CAMAROSA</i> .....	107
II – PLANILHA DE CÁLCULO COMPARATIVO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA E DE PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE 1000 EXPLANTES ENRAIZADOS E ACLIMATIZADOS À DE BASE DE MISTURA BAGAÇO DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR (40/60%) E ÁGAR PARA cv. <i>CAMAROSA</i> .....	108
<b>Anexo III.....</b>	<b>113</b>
I – PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA À BASE DE GELRITE PARA ENRAIZAMENTO DE 1000 EXPLANTES DE CAFÉ VAR. <i>CATUAÍ VERMELHO</i> .....	110
II – PLANILHA DE CÁLCULO COMPARATIVO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA E DE PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE 1000 EXPLANTES ENRAIZADOS E ACLIMATIZADOS À DE BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO E GELRITE DE CAFÉ VAR. <i>CATUAÍ VERMELHO</i> .....	111
Anexo IV: .....	112
MEIO MURASHIGE E SKOOG (1962): COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE.....	115

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - APRESENTAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CANA-DE-AÇÚCAR .....	8
<b>TABELA 2</b> – AS VÁRIAS TENTATIVAS APLICADAS NA EXTRAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SELECIONADO (<0,18 MM).....	13
<b>TABELA 3</b> – EFEITOS DOS DIFERENTES TRATAMENTOS NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E AÇÚCARES. ....	18
<b>TABELA 4</b> – VALORES DE pH REGISTRADOS A PARTIR DE UMA SOLUÇÃO AQUOSA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (TRATADO E NÃO-TRATADO). 32	
<b>TABELA 5</b> – RESUMO DA PERDA DO PESO NA BASE DE FENÓLICOS E DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES. VALORES SÃO MÉDIAS DE EXPERIMENTOS E ANÁLISES DE TRIPLICADOS. ....	33
<b>TABELA 6</b> – EFEITO DA GRANULOMETRIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE O ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE ‘MARUBAKAIDO’ .....	48
<b>TABELA 7</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE CANA NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT) (Granulometria < 0,18mm) QUANTO À FORMAÇÃO DE RAÍZES COM MICROESTACAS DE PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’ .....	50
<b>TABELA 8</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE CANA NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT) (Granulometria < 0,18mm) QUANTO AO COMPRIMENTO DAS RAÍZES DE MICROESTACAS DA PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’ .....	51
<b>TABELA 9</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE CANA NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT) (Granulometria < 0,18mm) QUANTO A ALTURA CAULINAR DAS MICROESTACAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’ .....	52
<b>TABELA 10</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO À BASE DE ÁGAR E O MEIO SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT) COM GRANULOMETRIA < 0,18 MM, QUANTO A PERCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO COM MICROESTACAS DA PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’ .....	53
<b>TABELA 11</b> – APRESENTAÇÃO DE UMIDADE RELATIVA (RH) E ATIVIDADE DE ÁGUA (Q <sub>w</sub> ) NOS TRÊS DIFERENTES MEIOS, A BASE DE ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO (BNT) E (BT) DETERMINADOS DURANTE O CULTIVO.....	55
<b>TABELA 12</b> - APRESENTAÇÃO DOS CUSTOS ESTIMADOS PARA ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> E ACLIMATAÇÃO À BASE DE 1000 EXPLANTES NOS MEIOS COM DIFERENTES SUPORTES (ÁGAR, BNT, BT).....	56
<b>TABELA 13</b> - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DE MANDIOCA....	63
<b>TABELA 14</b> – RESULTADOS DOS ESTUDOS PRELIMINARES OBTIDOS EM RELAÇÃO À DIFERENTES NÍVEIS DE COMBINAÇÕES DOS SUPORTES COM cv. CAMAROSA. ....	67
<b>TABELA 15</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO À BASE DE ÁGAR (PLANT AGAR) E O MEIO SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE MANDIOCA + CANA-DE-AÇÚCAR, 40:60% (GRANULOMETRIA < 0,18 MM) QUANTO AO NÚMERO DE RAÍZES EM MORANGUEIRO cv. CAMAROSA E cv. DOVER.....	68
<b>TABELA 16</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR (COMERCIAL) E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE MANDIOCA + CANA-DE-AÇÚCAR, 40:60% (GRANULOMETRIA < 0,18 MM) QUANTO AO COMPRIMENTO DAS RAÍZES EM MORANGUEIRO cv. CAMAROSA E cv. DOVER .....	70

<b>TABELA 17</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR (COMERCIAL) E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE MANDIOCA + CANA-DE-AÇÚCAR, 40:60 % (GRANULOMETRIA < 0,18 MM) QUANTO À ALTURA DOS EXPLANTES DE MORANGUEIRA cv. <i>CAMAROSA</i> E cv. <i>DOVER</i> .....	71
<b>TABELA 18</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR (COMERCIAL) E SUPORTE ALTERNATIVO (GRANULOMETRIA < 0,18 MM) QUANTO À PERCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DOS EXPLANTES DE MORANGO cv. <i>CAMAROSA</i> E cv. <i>DOVER</i> DEPOIS DE 40 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	72
<b>TABELA 19</b> – APRESENTAÇÃO DE UMIDADE RELATIVA (RH) E ATIVIDADE DE ÁGUA (Q <sub>w</sub> ) NOS DOIS DIFERENTES MEIOS: À BASE DE AGAR E SUPORTE ALTERNATIVO DETERMINADOS DURANTE O CULTIVO.....	75
<b>TABELA 20</b> – PLANTAS DE MORANGO cv. <i>CAMAROSA</i> E cv. <i>DOVER</i> COM SUCESSO ACLIMATIZADOS (%) ORIGINADOS DE DOIS SUPORTES DIFERENTES, À BASE DE AGAR E À BASE DE MISTURA BAGAÇO DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR (40/60%, SUPORTE ALTERNATIVO).....	75
<b>TABELA 21</b> - APRESENTAÇÃO DOS CUSTOS ESTIMADOS PARA ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> E ACLIMATAÇÃOPARA 1000 PLANTAS A PARTIR DE MEIOS DE CULTIVO COM DIFERENTES SUPORTES (ÁGAR E BT) COM cv. <i>CAMAROSA</i> . ..	78
<b>TABELA 22</b> – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA USADOS NOS EXPERIMENTOS (mg.L <sup>-1</sup> ). .....	90
<b>TABELA 23</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO À BASE DE GEL (GELRITE®) E O MEIO SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COM GRANULOMETRIA < 0,18 MM, QUANTO AO NÚMERO DE RAÍZES FORMADAS E PERCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO COM EXPLANTES DE CAFÉ VAR. <i>CATUAÍ VERMELHO</i> .....	94
<b>TABELA 24</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO À BASE DE GEL (GELRITE®) E O MEIO SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COM GRANULOMETRIA < 0,18 MM, QUANTO AO COMPRIMENTO DAS RAÍZES FORMADAS COM EXPLANTES DE CAFÉ VAR. <i>CATUAÍ VERMELHO</i> .....	95
<b>TABELA 25</b> – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO À BASE DE GEL (GELRITE) E O MEIO SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COM GRANULOMETRIA < 0,18 MM, QUANTO AO NÚMERO DAS NOVAS FOLHAS GERADAS (COMPLETAS) NOS EXPLANTES DE VAR. <i>CATUAÍ VERMELHO</i> .....	96
<b>TABELA 26</b> – APRESENTAÇÃO DE UMIDADE RELATIVA (RH) E ATIVIDADE DE ÁGUA (Q <sub>w</sub> ) NOS DOIS DIFERENTES MEIOS: À BASE DE GELRITE® E SUPORTE ALTERNATIVO DETERMINADOS DURANTE O CULTIVO.....	97
<b>TABELA 27</b> – RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE OS DOIS SUPORTES, À BASE DE GELRITE® E À BASE DE BAGAÇO CANA-DE-AÇÚCAR TRATADOS, APRESENTADOS DURANTE A ETAPA DE ACLIMATIZAÇÃO, QUANTO AO NÚMERO DE FOLHAS NOVAS E À PORCENTAGEM ACLIMATAÇÃODOS EXPLANTES DE CAFÉ, var. <i>CATUAÍ VERMELHO</i> .....	98
<b>TABELA 28</b> - APRESENTAÇÃO DOS CUSTOS ESTIMADOS PARA ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> E ACLIMATAÇÃOPARA 1000 PLANTAS A PARTIR DE MEIOS DE CULTIVO COM DIFERENTES SUPORTES (GELRITE® E BT) COM CAFFEEIRO cv. <i>CATUAÍ VERMELHO</i> . .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – APRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA GERAL DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. CADA COR REPRESENTA UM DETERMINADO GRUPO QUÍMICO.9	
<b>FIGURA 2</b> – MATERIAL SELECIONADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ANTES DE SER PROCESSADO .....	12
<b>FIGURA 3</b> – FRAGMENTADOR DO TIPO FACA- ROTATIVO USADO PARA TRITURAR O BAGAÇO EM PARTÍCULAS MENORES (A), E AS PENEIRAS DIMENSIONADAS E UTILIZADAS (B). .....	12
<b>FIGURA 4</b> – COLUNA MONTADA PARA EXTRAÇÃO TIPO SÓLIDO-LÍQUIDO COM VÁRIOS TIPOS DE SOLVENTES (MISTURAS) .....	13
<b>FIGURA 5</b> – SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS POR HPLC FASE-REVERSO COM ETOH/H <sub>2</sub> O (1:1) SEM (A) E COM 2% ÁCIDO SULFÚRICO (B). CONDIÇÕES: λ <sub>MAX</sub> 280 NM. GRADIENTE DE ACETONITRILA COM ÁGUA ÁCIDIFICADO (VEJA MÉTODOS). IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS: PICO 1, 5-HIDROXIMETILFURFURAL; PICO 2, NÃO IDENTIFICADO; PICO 3, P-HIDROXIBENZALDEÍDE; PICO 4, VANILINA; PICO 5 E 7, ISÔMEROS DE ÁCIDO P-CUMÁRICO; PICO 6, ÁCIDO P-CUMÁRICO; PICO 8 (VEJA B), NÃO IDENTIFICADO.21	
<b>FIGURA 6</b> – ESPECTRO DE MASSA FRAGMENTADO DE ÁCIDO P-CUMÁRICO ELUIDO POR LC-MS E MOSTRANDO ION PARENTAL EM M/Z 163 E DE OUTROS FRAGMENTOS CORRESPONDENTES .....	22
<b>FIGURA 7</b> – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO 8 ELUIDO POR RP-HPLC DEPOIS DE EXTRAÇÃO COM MISTURA ETOH/H <sub>2</sub> O (1:1) CONTENDO 2% ACIDO SULFURICO.23	
<b>FIGURA 8</b> – GC-MS ESPECTRUM DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL (5-HMF) PURIFICADO E OBTIDO A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR. ....	24
<b>FIGURA 9</b> – DOIS TIPOS DE LIGNINAS PRESENTES NO EXTRATO. EXTRAÇÃO REALIZADO COM EtOH/H <sub>2</sub> O CONTENDO 2% ACIDO SULFÚRICO (EM 4 ETAPAS, VEJA METODO), QUAL FOI RE-EXTRAÍDO COM ACETATO DE ETILA. IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS: PICO 1 (B), 5-HIDROXIMETILFURFURAL; PICO 3, p-HIDROXIBENZALDEÍDO; PICO 6, ACIDO P-CUMÁRICO; PICO 8 (B), NÃO IDENTIFICADO. ....	26
<b>FIGURA 10</b> – <sup>13</sup> C RMN ESPECTRA EM ESTADO-SÓLIDO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR SELECIONADO E TRATADO POR UMA MISTURA ORGÂNICA. ....	28
<b>FIGURA 11</b> – <sup>1</sup> HR-MAS NMR ESPECTRO DE (A) BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ORIGINAL COLETADO (BAGAÇO 2) E (B) BAGAÇO TRATADO COM MISTURA ETANOL (VEJA MÉTODO), TAMBÉM CHAMADO BAGAÇO 1. DESLOCAMENTO QUÍMICO SÃO INDICADOS POR * = PRÓTON VISUALIZADO (α OU β). ....	29
<b>FIGURA 12</b> – <sup>1</sup> H HR-MAS NMR SPECTRUM EM ZONA DE 3,3-4,5 PPM MOSTRANDO A DIFERENÇA ENTRE O BAGAÇO SELECIONADO (EM PRETO) E O BAGAÇO TRATADO (EM VERMELHO). ....	31
<b>FIGURA 13</b> – VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO SUPORTE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM TAMANHO DA PARTICULA < 0,18 mm ANTES (A) E DEPOIS (B) DE TRATAMENTO COM MISTURA ETANOL/H <sub>2</sub> O (1:1) ÁCIDIFICADO COM 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , AUMENTO DE 50X. ....	34
<b>FIGURA 14</b> – VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO SUPORTE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM TAMANHO DA PARTICULA < 0,18 mm ANTES (A) E DEPOIS (B) DE TRATAMENTO COM MISTURA ETANOL/H <sub>2</sub> O (1:1) ÁCIDIFICADO COM 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , AUMENTO DE 1700 X. ....	35
<b>FIGURA 15</b> - VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV) DO MISTURA DOS SUPORTES DE BAGAÇO DE MANDIOCA/CANA-DE-	



AÇÚCAR COM TAMANHO DA PARTICULA < 0,18 mm TRATADO COM MISTURA ETANOL/H <sub>2</sub> O (1:1) ÁCIDIFICADO COM 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , AUMENTO DE 330 X.....	36
<b>FIGURA 16</b> – COMPARAÇÃO DAS PLANTAS ENRAIZADAS NO MEIO COM ÁGAR (A) E NO MEIO ALTERNATIVO, BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO, GRANULOMETRIA < 0,18 MM (B) APÓS 38 DIAS <i>IN VITRO</i> .....	55
<b>FIGURA 17</b> – VISUALIZAÇÃO DAS RAÍZES OBTIDAS NO MEIO COM ÁGAR (A) E NO MEIO ALTERNATIVO À BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, GRANULOMETRIA < 0,18 MM (B), APÓS 38 DIAS.....	56
<b>FIGURA 18</b> – FORMAÇÃO DE RAÍZES cv. CAMAROSA, APÓS 40 DIAS: A – MEIO COMERCIAL; B – MEIO ALTERNATIVO MISTO.....	73
<b>FIGURA 19</b> – ALTURA DOS EXPLANTES cv.CAMAROSA APÓS 40 DIAS: A - MEIO COMERCIAL B – MEIO ALTERNATIVO MISTO .....	73
<b>FIGURA 20</b> – VISÃO PELO FUNDO DO FRASCO ENTRE OS MEIOS, APÓS 40 DIAS cv. CAMAROSA, QUANTO AO NÚMERO DE RAÍZES: A – MEIO COMERCIAL B – MEIO ALTERNATIVO MISTO (SETAS PRETAS INDICANDO AS RAÍZES).....	74
<b>FIGURA 21</b> – ILUSTRAÇÃO DAS PLANTAS EM FASE DE ACLIMATAÇÃO ORIGINADAS A PARTIR DOS DOIS DIFERENTES SUPORTES: À BASE DE AGAR (A) E À BASE DE MISTURA DE BAGAÇOS DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR (B) PARA A cv. CAMAROSA EM 10 DIAS .....	76
<b>FIGURA 22</b> – ILUSTRAÇÃO DAS PLANTAS EM FASE DE ACLIMATAÇÃO ORIGINADAS A PARTIR DOS DOIS DIFERENTES SUPORTES: À BASE DE AGAR (A) E À BASE DE MISTURA DE BAGAÇOS DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR (B) PARA A cv. CAMAROSA EM 25 DIAS .....	77
<b>FIGURA 23</b> – ILUSTRAÇÃO DAS PLANTAS EM FASE DE ACLIMATAÇÃO ORIGINADAS A PARTIR DOS DOIS DIFERENTES SUPORTES: À BASE DE AGAR (A) DEPOIS DE 60 DIAS E À BASE DE MISTURA DE BAGAÇOS DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR (B) DEPOIS DE 30 DIAS PARA A cv. CAMAROSA.....	78
<b>FIGURA 24</b> – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM EXPLANTES FOLIARES DE CAFEEIRO cv. CATUAÍ VERMELHO.....	88
<b>FIGURA 25</b> – INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS A PARTIR DE FOLHAS DE CAFÉ, var. CATUAÍ VERMELHO (1); DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DE CAFÉ, OBTIDOS A PARTIR DOS CALOS 1 <sup>a</sup> SEMANA (2); DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DEPOIS DE 1 MÊS (3) E DEPOIS DE 2 MESES (4); MULTIPLICAÇÃO DAS GEMAS APICAIAS A PARTIR DO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES DEPOIS DE 8 SEMANAS (5) E 10 SEMANAS DEPOIS (6).....	93
<b>FIGURA 26</b> – INDUÇÃO DE RAÍZES E CRESCIMENTO DO EXPLANTE <i>IN VITRO</i> APÓS 45 DIAS EM CÂMERA DE CULTIVO. A–MEIO COM GELRITE®; A–MEIO ALTERNATIVO.....	96
<b>FIGURA 27</b> – APARÊNCIA DAS MUDAS NA ETAPA DE ACLIMATAÇÃO DEPOIS DE 15 DIAS. A – MEIO GELRITE®; B – MEIO ALTERNATIVO.....	98
<b>FIGURA 28</b> – APARÊNCIAS DAS MUDAS EM ACLIMATAÇÃO DEPOIS DE 30 DIAS, A – MEIO GELRITE®; B – MEIO ALTERNATIVO.....	99
<b>FIGURA 29</b> – VISUALIZAÇÃO DOS TORRÕES FORMADOS (RAÍZES E SUBSTRATO) DEPOIS DE 30 DIAS DE PERMANÊNCIA NA CASA-DE-VEGETAÇÃO. A – MEIO GELRITE®; B – MEIO ALTERNATIVO.....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amu	unidade de massa atômica
CAS	Chemical abstract services
C <sup>13</sup> RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
CP-MAS	Polarização Cruzada- Rotação de Ângulo Mágico
GC-MS	Cromatografia Gasoso acoplado ao Espectrofotômetro de Massa
H <sup>1</sup> RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
HR-MAS	Alta Resolução- Rotação de Ângulo Mágico
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
NIST	National institute of science and technology
Rt	Tempo de retenção
UV	Ultra Violeta

### Formulas Químicas

AgSO <sub>4</sub>	SULFATO DE PRATA
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NITRATO DE AMÔNIA
KNO <sub>3</sub>	NITRATO DE POTÁSSIO
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	ÁCIDO BÓRICO
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO
KI	IODETO DE POTÁSSIO
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	MOLIBDATO DE SÓDIO DI-HIDRATADO
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	CLORETO DE COBALTO HEXA-HIDRATADO
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	CLORETO DE CÁLCIO DI-HIDRATADO
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	SULFATO DE MAGNÉSIO HEPTA-HIDRATADO
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	SULFATO DE MANGANÊS TETRA-HIDRATADO

ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	SULFATO DE ZINCO HEPTA -HIDRATADO
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	SULFATO DE COBRE PENTA-HIDRATADO
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	SULFATO DE FERRO II HEPTA-HIDRATADO
Na <sub>2</sub> EDTA	ETILENO DIAMINO TETRA ACETATO DE SÓDIO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	ÁCIDO NICOTÍNICO
C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> CIN <sub>4</sub> OS. HCL	TIAMINA.HCL
C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> . HCL	PIRIDOXINA. HCL
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	GLICINA
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	MIO-INOSITOL
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	SACAROSE
BA	BENZILADENINA
BAP	BENZILAMINO PURINA
AIB	ÁCIDO INDOLBUTÍRICO
IAA	ÁCIDO INDOLACÉTICO
DNS	ÁCIDO 3,5 DI-NITROSALICÍLICO
ETOH	ETANOL
MEOH	METANOL
(M-H) <sup>-</sup>	HIDROGÊNIO LIGADO A GRUPO METIL
(M-CHO) <sup>-</sup>	CARBONILA LIGADO A GRUPO METIL
5-HMF	5 HIDROXI METIL FURFURAL
2,4-D	ÁCIDO 2,4 DICLORO FENOL ACÉTICO
2 IP	N-(2-ISOPENTIL) ADENINA

## RESUMO

BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUPORTE ALTERNATIVO NA FASE DE ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS DE MACIEIRA, MORANGUEIRO E CAFEIEIRO.

A agroindústria açucareira é uma das mais importantes do mundo. Sendo o Brasil, o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Esse tipo de agroindústria gera vários subprodutos como: bagaço, torta dos filtros, e melaço. O aproveitamento racional desses subprodutos é de extrema importância ao setor produtivo brasileiro. Este trabalho tem por objetivo avaliar o uso de bagaço de cana-de-açúcar como suporte alternativo na micropropagação de macieira, morangueiro e cafeeiro, uma vez que, esta técnica tem grande importância por permitir a clonagem de plantas selecionadas. Para poder melhorar seu desempenho, o suporte alternativo foi submetido a um processo de tratamento com uma mistura de solvente e água (1:1), extraindo partes dos compostos fenólicos como ácido *p*-cumárico, 4-hidroxibenzaldeído, 5-hidroxiacetilfurfural, oligômeros (ligados à lignina) e polissacarídeos, os quais são considerados inibidores do crescimento de tecidos vegetais. Esta pesquisa permitiu a seleção de melhor tratamento para o suporte alternativo. Quando foram utilizados suportes à base de bagaço de cana-de-açúcar com granulometria < 0,18 mm não tratado (BNT) em substituição ao ágar (composto geleificante) nos meios de cultivo (Patente INPI nº 931/2001 de Carlos R. Soccol, Radjiskumar Mohan e Marguerite Quoirin) uma importante melhoria no processo de enraizamento das portas-enxertos de macieira ‘Marubakaido’ com redução nos custos de (13,35%) foi conseguida na fase de enraizamento. Os ensaios foram realizados utilizando o meio de cultura Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração de sais, sacarose 3% e ácido indolbutírico 0,1 mg.L<sup>-1</sup>. Os explantes enraizados foram testados, na fase de aclimatização, oriundos de ambos os suportes obtendo uma redução de 37,00% nos custos no meio com suporte à base de bagaço de cana-de-açúcar comparado ao meio com suporte à base de ágar. Quando avaliados os números e o comprimento das raízes, assim como a altura de cada planta depois 28 dias de cultivo, observou-se que, no meio contendo bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) obteve-se um desempenho superior da ordem de 62,23% em relação ao número das raízes formadas, 43,56% para o tamanho das raízes e 18,82% para o tamanho das explantes. Quando avaliados os números e o comprimento das raízes, assim como a altura de cada explante em diferentes tempos de cultivo, observou-se que, no meio contendo bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT) obteve-se desempenho superior em período de cultivo antecipado (28 dias) da ordem de 105,55% em relação ao número de raízes formadas,

122,77% para o tamanho das raízes e 54,11% para o tamanho das explantes comparado ao meio com suporte à base de ágar. A redução do custo na parte de enraizamento ficou em torno de 8,26%, e na parte de aclimação ficou em 44,00% comparado ao meio com suporte à base de ágar. Aplicando os mesmos testes com morangueiro cv. *Camarosa e Dover* e com uma modificação na composição do suporte (mistura bagaço de cana-de-açúcar/mandioca) obteve-se também desempenhos superiores da ordem de 85,71; 54,04% em relação ao número de raízes formadas, 15,09; 11,02% para o tamanho das raízes e 11,65; 12,00% para o tamanho das explantes, respectivamente, comparado ao meio com suporte à base de ágar. A redução do custo no enraizamento ficou em 11,38%, e na parte de aclimação ficou em 43,00% comparado ao meio com suporte à base de ágar. Para finalizar, foram realizados os mesmos testes com cafeeiro cv. *Catuai Vermelho*, e foram também obtidos resultados superiores a partir do suporte à base de bagaço de cana-de-açúcar tratado com granulometria  $< 0,18$  mm. Para o número das raízes foi obtida uma diferença de 82,00%, para tamanho de raízes 34,21% e número de folhas novas *in vitro* 29,91% comparado ao meio com suporte à base de Gelrite<sup>®</sup>. O estudo do custo ligado na fase de enraizamento não mostrou redução na técnica aplicada, mas um aumento (1,54%) devido ao processo de tratamento do suporte à base de bagaço de cana-de-açúcar. Enquanto na fase aclimação obteve-se uma redução de 38,00% comparada ao meio com suporte à base de Gelrite<sup>®</sup> (comercial). Este trabalho permitiu demonstrar que, o bagaço de cana-de-açúcar devidamente tratado possui grande potencial para ser utilizado como substituto dos agentes geleificantes tradicionais, com inúmeras vantagens no processo de enraizamento e de aclimatização, em técnicas de micropropagação vegetal.

## ABSTRACT

The sugar industry is one of the most important agro-industries of the world. Being Brazil, the largest sugarcane producer. This industry generates a large variety of by-products such as bagasse, filters residues and molasses. A rational exploitation of these by-products is of extreme importance to the Brazilian techno-industrial sector. The objective of this study is to evaluate the use of sugarcane bagasse as an alternative support in the micropropagation technique using agro-industrial residues. This technique has great importance for allowing the cloning of selected plants. To improve its performance, the alternative support was subjected to a treatment with a mixture of solvent and water (1:1), extracting parts of phenolic components as *p*-coumaric acid, 4-hydroxybenzaldehyde, 5-hydroxymethylfurfural, oligomers (from the lignin) and polysaccharides, which have been considered as growth inhibitors for plant cultures. This study allowed the selection of the best treatment for the alternative support. An important improvement in the stage of *in vitro* rooting of apple root stock was obtained with cost reduction (13,35%) through the use of the support based on not treated (BNT) sugarcane bagasse with particle size of < 0,18 mm as substitution to the agar (gelling agent) in the rooting medium (Patent INPI: 931/2001 from Carlos R. Soccol, Radjiskumar Mohan and Marguerite Quoirin). The tests had been carried out using MS salts (1962) half force, sucrose 3%, 0,5  $\mu$ M indol-butyric acid with micro-cuttings of 'Marubakaido'. The rooted explants, from both supports had been used in the acclimatization tests, showing cost reduction of 37,00% from the medium with the support based on sugarcane bagasse compared to the medium with the support prepared with agar. When evaluated the numbers and the length of the roots, as well as the height of each explant in different times of culture, it was observed that the medium containing sugarcane bagasse showed superior performance in the order of 62.23% for root numbers, 43.56% for root size and 18.82% for explant size compared to the agar gelled medium. For the evaluation of the treated support (BT), rooting and acclimatization tests had been carried using again micro-cuttings of 'Marubakaido'. When evaluated the root numbers and the length of the roots, as well as the explant height of each, during different culture times, it was observed that the medium containing sugarcane bagasse support showed superior performance within expected culture period (28 days) with 105.55% for the root numbers, 122.77% for the roots size and 54.11% for the explants size compared to the medium with the agar base support. The reduction of the cost for the rooting part was around 8.26% and in the acclimatization part was 44.00% compared to the medium with the agar base support. Applying the same tests with strawberry plants cultivars *Camarosa* and

*Dover* and the modification in the support composition (mixture of sugarcane/cassava bagasse) superior performances were also obtained with about 85.71; 54.04% for the root numbers, 15.09; 11.02% for the roots size and 11.65; 12.00% for the explants size, respectively, compared to the medium with the agar base support. The cost reduction in the rooting part was around 11.38% and in the acclimatization part it was 43.00% compared to the medium with the agar base support. Similar tests with coffee plants var. *Catuai red* had been carried out and also superior results have been obtained from the sugarcane bagasse (BT) support with particle size < 0.18 mm. For the root numbers a difference of 82.00% was obtained, 34.21% for root size and 29.91% for the number of new *in vitro* formed leaves compared to the medium with Gelrite<sup>®</sup> base support. The cost study for the rooting phase did not show any reduction for the applied technique, but an increase of 1.54%, due to treatment process of the sugarcane bagasse, while in the acclimatization phase a reduction of 38,00% had been obtained compared to the medium with Gelrite<sup>®</sup> base support (commercial). These work allowed to demonstrate that the sugarcane bagasse well treated possesses great potentiality to be used as substitute of the agar/gel with advantages during the rooting and acclimatization phases, in plant micropropagation techniques.





## 1. INTRODUÇÃO

Praticamente todos os produtos de natureza orgânica (produtos ou subprodutos da agricultura ou do processamento de vegetais), podem servir como suportes nos processos fermentativos (SOCCOL *et al.*, 1995; SOCCOL, 1996; REGULY, 1998).

Em geral, as culturas agrícolas produzem volumes consideráveis de resíduos e subprodutos, os quais são muito pouco utilizados, ou quando são, utiliza-se apenas para produção de calor pela sua queima. Dentre os possíveis usos desses resíduos, destaca-se a sua biotransformação para obtenção de enzimas, alimentos, pigmentos, aromas, ácidos orgânicos, solventes orgânicos, hormônios vegetais, bioinsecticidas, etc. (SOCCOL *et al.*, 2000).

Nos processos de produção de álcool, açúcar e outros derivados da cana-de-açúcar são gerados grandes volumes de resíduos. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e seus mais diretos derivados, representados pelos produtos: açúcar e álcool. O bagaço da cana-de-açúcar é descartado, podendo ser utilizado na geração de energia por meio de incineração, adubo na produção agrícola, matéria – prima para produção de celulose e polpas, etc. Para cada 100 kg de cana-de-açúcar, o bagaço representa aproximadamente 27 a 30 kg nos processos de extração do caldo. Na maioria das vezes, este resíduo não é aproveitado, sendo deixado em pilhas perto das usinas causando um grande problema ambiental. O bagaço, do ponto de vista físico, é constituído por quatro frações: fibra ou bagaço, sólidos insolúveis, sólidos solúveis e água com 45 %, 2-3 %, 2-3 % e 50 % respectivamente (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990).

No caso específico do bagaço de cana-de-açúcar, ao invés do mesmo ser utilizado apenas como combustível na geração de energia, buscam-se alternativas para a sua utilização como suporte de baixo custo em diferentes processos biotecnológicos. Uma dessas alternativas seria a sua utilização como suporte em processos de micropropagação (MOHAN *et al.*, 2001; MOHAN *et al.*, 2004).

A micropropagação de plantas se refere às técnicas de clonagem realizadas *in vitro*. A maioria dos protocolos comerciais de micropropagação utiliza a presença de meristemas apicais e/ou axilares da planta-mãe, os quais são induzidas a se multiplicarem pela aplicação de citocininas nos meios de cultura. Em seguida, os brotos obtidos são enraizados mediante o uso de auxinas e transferidos para a casa-de-vegetação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A aplicação dos métodos de micropropagação apresenta grandes vantagens sobre os métodos tradicionais de propagação vegetativa. Particularmente, para espécies tropicais que

produzem níveis elevados de fenóis e taninos, que podem inibir o enraizamento e a enxertia. Estes métodos encurtam o tempo requerido para o melhoramento, uma vez que permitem clonar alguns indivíduos selecionados em grande quantidade. Por outro lado, a heterozigose das populações clonadas é conservada durante a micropropagação. Igualmente, pode ser útil aplicar a micropropagação para estabelecer pomares para a produção de sementes ou para clonar linhas parentais em segregação para obter sementes de híbridos intervarietais (NORIEGA e SONDAHL, 1993). Outra vantagem destes métodos é que eles asseguram um rejuvenescimento do material vegetal (MICHAUX-FERRIÈRE *et al.*, 1989).

Segundo QUOIRIN (1996), as enormes vantagens oferecidas pela micropropagação indicam que essa técnica poderia finalmente substituir os métodos tradicionais utilizados em viveiros. Isso implica que os serviços e custos sejam reduzidos e, as taxas de multiplicação das mudas sejam incrementadas substancialmente. Mas os elevados custos geralmente limitam o uso comercial da técnica de micropropagação para produtos de altos valores como plantas ornamentais e frutíferas (SIMONTON *et al.*, 1991). A mão-de-obra ocupa entre 40-60% do custo de produção, onde a seleção (corte) e a repicagem constituem a maior parte. Outra parcela significativa de custo corresponde à perda dos explantes nas fases de enraizamento e aclimatização, como também a vitrificação dos explantes (REUTHER, 1985).

A produção comercial de mudas *in vitro* só poderá ser aplicada para algumas espécies quando novas e melhores tecnologias de enraizamento e de aclimação forem criadas (KITTO, 1997). A substituição de agentes solidificantes usados nos meios de cultura por outros suportes alternativos à base de resíduos agroindústrias (ex. bagaço de cana-de-açúcar) pode abrir uma nova frente para o desenvolvimento de uma nova tecnologia ligada na micropropagação de plantas (MOHAN *et al.*, 2004).

Neste trabalho, buscaram-se alternativas de baixo custo e de fácil acesso para a substituição do ágar na obtenção de mudas micropropagadas com alta qualidade de espécies vegetais importantes.

Em decorrência de terem sido realizados vários experimentos nesta tese, optou-se em dividir a mesma em capítulos.

No 2º capítulo, buscou-se estudar melhor as propriedades químicas (características e quantificação) e físicas (estrutura, porosidade) do bagaço de cana-de-açúcar e, também foi estudado o melhor processo, o mais barato e o mais simples para minimizar os efeitos dos compostos inibidores (tóxicos) de crescimento, caso o mesmo venha a ser aplicado nas técnicas de cultivo vegetal.

No 3º capítulo do trabalho, o resíduo agro-industrial bagaço de cana-de-açúcar, não tratado (BNT) e tratado (BT) conforme o melhor processo de extração sólido-líquido, foram testados como material alternativo na etapa de enraizamento de brotações da porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' e, em seguida, a aclimação das plantas foram avaliadas. A relação custo-benefício deste processo parcial foi estudada em comparação ao método convencional na técnica de micropropagação vegetal.

No 4º capítulo foram realizados testes de enraizamento com o bagaço de cana-de-açúcar tratado combinado com várias proporções de bagaço de mandioca, utilizando brotações de morangueiro cultivares Camarosa e Dover. Também foram realizados os testes de aclimação a partir das plantas e a avaliação custo-benefício em comparação ao método convencional na técnica de micropropagação vegetal.

No 5º e último capítulo, foram realizados os mesmos estudos do quarto capítulo, com bagaço de cana-de-açúcar tratado, sem a combinação de bagaço de mandioca, com o cafeeiro *Catuai vermelho*.

## Referências

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (eds.) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v.1, p.183-260.

ICIDCA-GEPLACEA-PNUD. Manual de los derivados de la cana de azucar. Bagazo. (eds). Cuban Institute of Research on Sugarcane, Mexico, 1990. p.62.

KITTO, S.L. Commercial micropropagation. *Hort Science*. v.32, p.1012–1014, 1997.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; BIEVSSE, D.; ALVARD, D.; DUBLIN, P. Etude histologique de l'embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. *Café, Cação, Thé*, v.XXXIII, n.4: p.207-217. 1989.

MOHAN, R.; OKAMOTO, G.T.; QUOIRIN, M.G.; SOCCOL, C.R. Estudo de um novo suporte para enraizamento de micro-estacas *in vitro*. In: *ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTO*, IX, 2001, Curitiba. 9º EVINCI. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2001. p. 103.

MOHAN, R.; SOCCOL, C.R.; QUOIRIN, M.G.; PANDEY, A. Use of sugarcane bagasse as an alternative low cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, Oxon, v. 40, n. 4, p. 408-411, 2004.

NORIEGA, C. & SONDAHL, M.R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. *ASIC, 150 Colloque*. Montpellier-França, p. 73-81, 1993.

QUOIRIN, M. In: *Manual de Cultura de Tecidos Vegetais in vitro*. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996.

REGULY, J. C. *Biotechnologia dos Processos Fermentativos*. v.2. Pelotas: Editora Universitária – UFPel., 1998. p. 222.

REUTHER, G. Principles and application of the micropropagation of ornamental plants. In: SCHÄFER-MENUHR, A. (ed). *In Vitro Techniques: Propagation and Long-Term Storage*. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff, 1985. p.1-14.

SIMONTON, W.; ROBACKER, C.; KRUEGER, S. A programmable micropropagation apparatus using cycled medium. *Plant Cell Tiss.Org. Cult.*, London, v.27, p.211–218, 1991.

SOCCOL, C.R.; STERTZ, S.C.; RAIMBAULT, M.; PINHEIRO, L.I. Biotransformation of solid waste form cassava starch production by *Rhizopus* in solid state fermentation. part i – screening of strains. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v.38, n.4, p.1303-1310, 1995.

SOCCOL, C. R.; BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system, *Enzyme Microb Technol.*, v.27, p.127-133, 2000.

SOCCOL, C. R. Biotechnology products from cassava root by solid state fermentation.  
*Journal of Scientific and Industrial Research*, v.55, p. 358-364, 1996.

## 2. TRATAMENTO, ANÁLISE E VISUALIZAÇÃO DO SUPORTE À BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

**Resumo:** A agroindústria açucareira é uma das mais importantes no Brasil, deste modo, gera vários subprodutos e resíduos como bagaço, torta de filtros e melaço. Um tratamento adequado desses para aproveitamento ou aplicação racional será de extrema importância ao setor produtivo brasileiro. Este trabalho tem por objetivo encontrar uma melhor técnica, simples e de baixo custo no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para seu posterior uso como um suporte alternativo de baixo custo nas técnicas de micropropagação vegetal. Em sua composição natural o bagaço de cana-de-açúcar apresenta altos teores de compostos inibidores de crescimento celulares como os fenólicos que são componentes diretamente ligados à lignina um dos constituintes básicos do bagaço de cana-de-açúcar, e os furanos, que resultam da desidratação das hexoses. Na tentativa de ter um processo com uma melhor taxa de remoção destes componentes indesejáveis e ao mesmo tempo ser um processo simples, rápido e de baixo custo, a mistura de etanol e água acidificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi a melhor. Quando expressos em composição de ácido *p*-cumárico e fenóis totais, quantidades de 0,50 e 0,736 mg.g<sup>-1</sup> de bagaço seco foram removidos, respectivamente. Com o mesmo processo foram também extraídos os açúcares redutores em uma quantidade de 13,4 mg.g<sup>-1</sup> de bagaço seco.

Palavras chaves: *bagaço de cana-de-açúcar, compostos fenólicos, extração sólido-líquido, caracterização.*

**Abstract:** The sugar industry is one of the most important in Brazil, and so generating a large variety of byproducts and residuals such as bagasse, filter cakes and molasses. A rational exploitation of those by-products is of extreme importance to the Brazilian techno-industrial sector. The objective of this study is to find a simple, good and low cost process for the treatment of sugarcane bagasse for its posterior use as an alternative low cost support material in the plant micropropagation techniques. The sugarcane bagasse in his natural form presents levels of phenolic compounds which are directly linked to the lignin, one of the basic constituent of the sugarcane bagasse and furans which results from the dehydration of hexoses. In an attempt to get a process with a high removal rate of the undesirable components with a simple, fast and low cost procedure, an acidified with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mixture of ethanol and water showed to be the best. When expresses in compositions of coumaric acid and total phenols, quantities of 0.50 and 0.736 mg.g<sup>-1</sup> of dry bagasse were extracted, respectively. Together with the process reduction sugars were also extracted in a quantity of 13.4 mg.g<sup>-1</sup> of dry bagasse.

Keywords: *sugarcane bagasse, characterization, solid-liquid extraction, phenolic compounds.*

## 2.1. Introdução

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum spp.*, é uma das gramíneas mais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais devido à enorme contribuição sócio-econômica que representa a sua exploração, em razão de sintetizar e armazenar concentrações importantes de sacarose. A cana-de-açúcar é utilizada como matéria-prima básica na produção de três importantes produtos agro-industriais: açúcar, aguardente e álcool (PARANHOS, 1987).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, sendo responsável por 25% da produção mundial e de seus mais importantes derivados, representados pelos produtos açúcar e álcool. O Brasil lidera também em produtividade agrícola com 77 t.ha<sup>-1</sup> seguido de perto pela China com 67 t.ha<sup>-1</sup> e Índia com 66,9 t.ha<sup>-1</sup>, enquanto a média a nível mundial é de 61,9 t.ha<sup>-1</sup>. A produção da matéria-prima, em 2003, no Brasil foi de 368,0 milhões de toneladas. O Brasil expandiu a sua produção em 77,7 %, tornando-se o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (SEAB, 2004).

O Paraná é o 3º maior produtor nacional de cana-de-açúcar, obtendo na safra 2003/2004 uma produção de 28,89 milhões de toneladas. O setor sucroalcooleiro do Brasil é altamente competitivo na área econômica e social. Sob o enfoque da renda bruta gerada, a cana-de-açúcar deve ter contribuído com o correspondente a R\$ 5,4 bilhões, em 2004, ou 8,6 % da renda agrícola total brasileira. Situa-se em 2º lugar no contexto agrícola e em 3º no contexto agropecuário, atrás da soja e da carne bovina. Por sua vez, os empregos gerados pelo setor são estimados em 1 milhão de pessoas no Brasil (SEAB, 2004).

A tecnologia usada para extração do caldo consiste em moendas. Antes disso, a cana-de-açúcar passa por três fases: facas, desfibradores e esmagadores. Estas fases são chamadas de preparação da cana-de-açúcar. As moendas são constituídas por rolos pesados que rompem, por compressão, as células da cana, extraindo a maior parte do caldo (LEME & BORGES, 1965).

O bagaço de cana-de-açúcar é descartado e pode ter finalidades diferentes como: matéria-prima para geração de energia por meio da incineração, material de adubação no próprio campo de produção, matéria-prima para produção de celulose, polpas e outros. Para uma dada quantidade de cana-de-açúcar, 27 a 30 % é gerada como bagaço de cana nos processos de extração do caldo (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, Cuba -1990).

Vem-se buscando alternativas para a utilização racional desses bagaços. Uma dessas alternativas é a sua utilização como suporte em processos de micropropagação de tecidos vegetais (MOHAN *et al.*, 2004).

A composição química da cana-de-açúcar é uma função de diversos fatores, como: variedade, solo, clima, sanidade da cultura, grau de maturidade, florescimento, adubação, etc. Sob o ponto de vista industrial, uma prévia despalha com fogo para a sua colheita, a intensidade do desponte, o tempo decorrido entre a colheita e a industrialização influencia, qualitativa e quantitativamente, a composição do caldo.

A composição dada a seguir na tabela 1 representa, apenas, uma referência, tendo em vista as considerações anteriores.

**TABELA 1 - APRESENTAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

COMPONENTES	VARIAÇÃO %	COMPONENTES	VARIAÇÃO %
Água	65 - 75	Pentosana	1,75 - 2,25
Açúcares	12 - 18	Matérias minerais	0,10 - 0,80
Sacarose	11 - 18	Matérias nitrogenadas	0,20 - 0,60
Glicose	0,20 - 1,00	Gorduras e Ceras	0,15 - 0,25
Frutose	0,00 - 0,60	Ácidos combinados	0,10 - 0,15
Fibra	8 - 16	Ácidos livres	0,10 - 0,15
Celulose	5,00 - 6,50	Pento-hexosanas	0,25 - 0,75
Lignina	1,50 - 2,50	Vitaminas	Não dosadas

Fonte: ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990

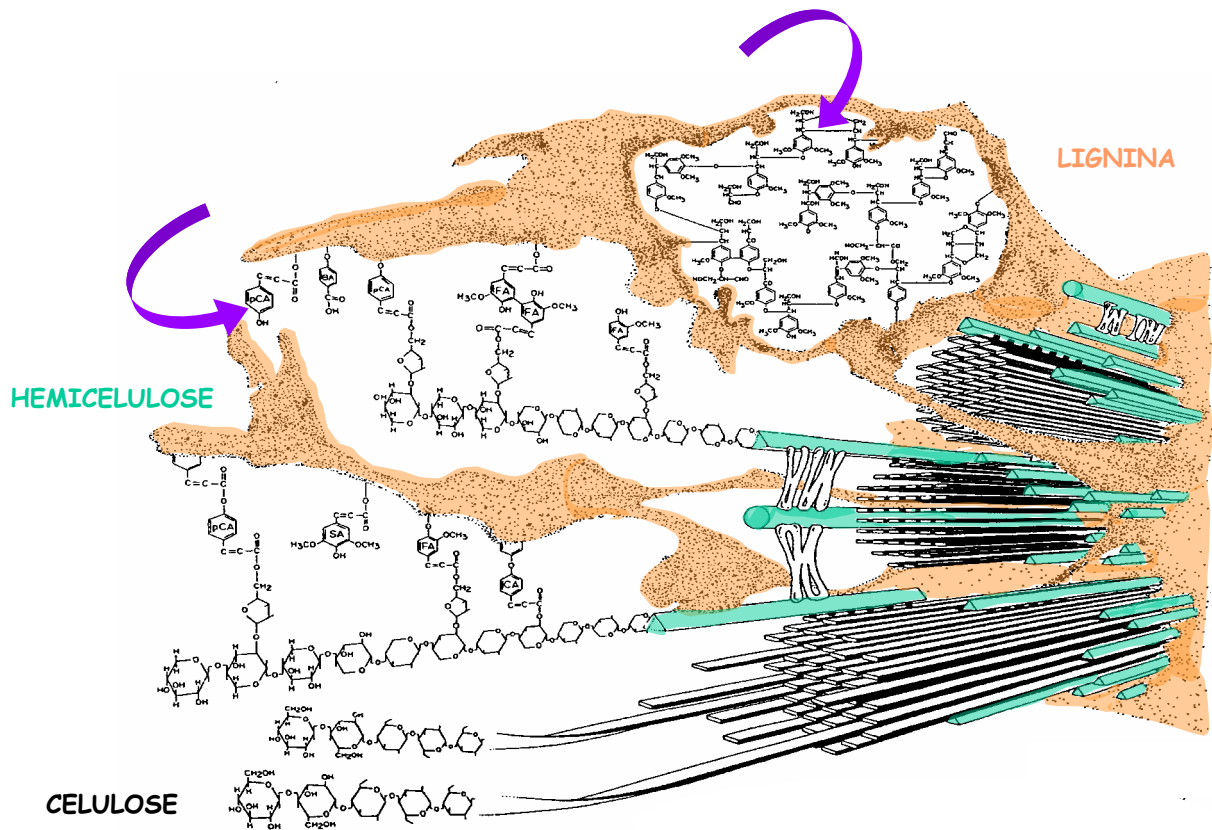
Sob o ponto de vista tecnológico, o colmo é constituído pela fibra e pelo caldo. Para 100 kg de uma cana contendo, por exemplo, 13% de fibra (13 kg) e 87% de caldo (87 kg) a distribuição destes componentes entre as partes duras (nós e casca) e moles (parênquima) pode ser a seguinte: Partes duras (25%): Fibra (28%) = 7,00 kg e Caldo (72%) = 18,00 kg; Partes moles (75%): Fibra (8%) = 6,00 kg e Caldo (92%) = 69,00 kg.

Conclui-se, portanto, que 20,69% e 79,31% do caldo são encontrados, nas partes duras e moles, respectivamente, enquanto que a fibra se distribui, nestas mesmas partes, na proporção de 53,85% e 46,15% (ORPLANA, 2004). Nos últimos anos, houve, nas indústrias açucareiras, uma tendência a aumentar o grau de preparação da cana com o objetivo de extrair maior quantidade de açúcar, o que favorece as indústrias consumidoras de bagaço. Este é composto, do ponto de vista físico, por: fibra (fração sólida orgânica insolúvel em água presente no talo da cana) 45%; sólidos insolúveis 2 a 3%; sólidos solúveis 2 a 3% e água 50%. Quimicamente, é composto por: celulose, hemicelulose e lignina, principais polímeros naturais, e pequenas quantidades de outros compostos classificados como componentes estranhos (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990). Na figura 1, esta apresentada à estrutura



geral do bagaço de cana-de-açúcar com os seus respectivos grupos químicos.

**FIGURA 1** – APRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA GERAL DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. CADA COR REPRESENTA UM DETERMINADO GRUPO QUÍMICO.



FONTE: O AUTOR, 2005

A lignina é o terceiro componente importante presente no bagaço de cana-de-açúcar em quantidade entre 20 a 22% . Isto representa um conjunto de polímeros amorfos, de altos pesos moleculares e de natureza eminentemente fenólica, na maioria dos casos chamados de compostos polifenólicos (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990).

Os compostos fenólicos que podem ser encontrados no bagaço de cana-de-açúcar em grandes quantidades na forma ácida e aldeídos são: acetovanilina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *p*-hidroxibenzaldeído, ácido siríngico, ácido vanílico, siringaldeído, hidroquinona e vanilina. Alguns destes são ligados diretamente a macro molécula da lignina (SUN *et al.*, 2004).

Do ponto de vista fermentativo, os fenóis, ou pelo menos alguns deles, são indesejáveis, pois têm certas atividades inibidoras de crescimento, a partir de concentrações

maiores que  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD,1990).

A presença dos compostos fenólicos pode contribuir para a oxidação dos explantes. Quando eles, uma vez feridos durante o preparo, começam adquirir uma coloração escura, transferindo a pigmentação para o meio, assim inicia o processo de oxidação que causa uma redução de crescimento, e pode até levar a morte do explante (GEORGE, 1993).

A sacarose, frutose e glicose são os açúcares principais que podem estar presentes no bagaço de cana-de-açúcar além de outros, como raminose, arabinose, xilose, manose, e galactose que também foram detectados. Em geral, estes compostos são considerados açúcares neutrais e são solúveis em água (SUN *et al.*, 2004).

Este trabalho teve por objetivo encontrar uma técnica melhor, simples e de baixo custo no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para seu posterior uso como um suporte alternativo de baixo custo nas técnicas de micropropagação vegetal.

## 2.2. Material e Métodos

O material usado para preparação do suporte alternativo foi o bagaço de cana-de-açúcar. Este foi coletado em pontos de venda de caldo de cana-de-açúcar na região de Curitiba. A coleta foi feita em três diferentes pontos simultaneamente.

Do bagaço de cana-de-açúcar foi utilizada a parte interna com maior fração de medula e menor proporção de fibras. O bagaço de cana-de-açúcar foi lavado em água corrente potável a 90 °C por duas vezes para retirar o excesso de açúcares, e uma vez com água destilada.

A seleção manual facilitou a escolha das melhores frações do bagaço de cana-de-açúcar, já que o material deve proporcionar uma certa porosidade e absorção para facilitar a oxigenação e o transporte de massa (GEORGE, 1993; KUKREJA *et al.*, 1986).

A seguir, o material foi seco em estufa de bandejas a 90 °C por 24 horas. Em seguida, o material foi triturado em frações menores com um moinho de faca martelo. Os fragmentos menores foram, então, desmedulados em moinho rotativo com peneira tangencial (desenvolvido e adaptado ao moinho). Os fragmentos lignolíticos (fibras duras e compridas) foram retirados da parte refinada e classificados por um conjunto de peneiras (0,84 mm, 0,84 a 0,18 mm e < 0,18 mm). A figura 2 mostra as partes reais selecionadas, lavadas e secas do bagaço de cana-de-açúcar. A figura 3 mostra o equipamento e os acessórios utilizados para desmedulamento e refino do bagaço.

Acredita-se que uma parte dos compostos fenólicos, como também outros voláteis, pode ser removida pelo aquecimento do material lavado durante a secagem por 24 horas a 90 °C.

**FIGURA 2** – MATERIAL SELECIONADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ANTES DE SER PROCESSADO



**FIGURA 3** – FRAGMENTADOR DO TIPO FACA ROTATIVA USADA PARA TRITURAR O BAGAÇO EM PARTÍCULAS MENORES (A), E AS PENEIRAS DIMENSIONADAS E UTILIZADAS (B).



Aproximadamente 5 g de suporte com a granulometria  $< 0,18$  mm do bagaço de cana-de-açúcar foram colocados em coluna de vidro com diâmetro de 3 cm e altura de 35 cm (veja figura 4). Maiores detalhes sobre o processo de tratamento (extração) sólido-líquido e suas análises serão apresentadas em item separado. Optou-se pelo uso da granulometria  $< 0,18$  mm, devido os seus excelentes resultados obtidos em estudos realizados para enraizamento de porta-enxertos de macieira ‘Marubakaido’ conforme apresentados no item 3.2. no capítulo posterior.

**FIGURA 4 – COLUNA MONTADA PARA A EXTRAÇÃO TIPO SÓLIDO-LÍQUIDO COM VÁRIOS TIPOS DE SOLVENTES (MISTURAS)**



Foram escolhidos dois solventes: metanol e etanol. Assim, o tratamento do bagaço selecionado (< 0,18 mm) foi baseado no uso dos dois solventes orgânicos, conforme mostra a tabela 2:

**TABELA 2 – AS VÁRIAS TENTATIVAS APLICADAS NA EXTRAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SELECIONADO (<0,18 MM)**

Mistura do solvente	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Ácido H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Observação
MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	percolação	25	-----	É uma percolação sucessiva usando mesmo suporte
MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	percolação	25	-----	
MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	percolação	25	-----	
EtOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	percolação	25	-----	
MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	30	50	-----	Variação de tempo à temperatura constante
	60	50	-----	
	120	50	-----	
EtOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	30	50	-----	Variação de tempo à temperatura constante
	60	50	-----	
	120	50	-----	
MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	120	50	2	Variação de acidificação
EtOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	120	50	2	
MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	120	50	4	
EtOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	120	50	4	

Foram analisados a partir dos extratos do suporte: o teor dos fenóis totais pelo método de FOLIN e CIOCALTEU (1927); açúcares redutores pelo método DNS (MILLER, 1959); açúcares totais pelo método de ANTHRONE (DUBOIS *et al.*, 1959); o teor de ácido *p*-cumárico e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) por HPLC-MS. Cada molécula (fenólica ou não) foi identificada no HPLC e comparada com os padrões. Depois, cada pico separado era analisado por espectro de Ultra Violeta (UV-diode array detection). As estruturas químicas definitivas foram finalmente determinadas por LC-MS e por análise total molecular de íons e fragmentos. No caso do 5-HMF, GC-MS foi usado para conformar este composto não-aromático.

Para a identificação dos compostos fenólicos foi usado o método analítico por HPLC-MS de Waters, composto de uma bomba 1525, um detector com disposição de 2996 diodos, um injetor Rheodyne modelo 7725i, coluna simétrica de fase inversa C18 (4,6 x 250 mm, ODS2, 5 µm) de Waters. A corrida foi realizada a uma temperatura de 30 °C com um fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> e usando um gradiente linear de acetonitrila (A) e água acidificada (B) com 1% (v/v) ácido acético em duas etapas: primeiro gradiente de 0 a 20% de A durante 30 min. e o segundo de 20 a 100% de A por mais 20 min. Os compostos fenólicos foram visualizados a um comprimento de onda de 280 nm. Todos os padrões químicos foram adquiridos da empresa SIGMA (St.Louis, EUA) e os solventes com grau HPLC eram da SDS (Peypin, France).

As estruturas químicas foram confirmadas com a análise de espectrofotometria de massa (LC-MS) (Perkin-Elmer ApI150EX) com tensão capilar de 4500 volts, acoplado no HPLC. As condições de análises foram as seguintes: voltagem de orifício 20 volts, voltagem de capilar 4500 volts, pressão de nebulização de N<sub>2</sub> a 45 psi (3,0 bar). As fragmentações das moléculas também foram visualizadas a uma tensão de orifício de 60 volts. Os valores das frações (*m/z*) foram registrados entre 30 e 3000 amu, em uma escala de 0,2 e com um tempo de aquisição de 15 ms.scan<sup>-1</sup>. As condições de LC usadas para as análises foram as seguintes: a mesma coluna e solventes como na análise previamente descrita, exceto a eluição que foi executada a um fluxo de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>, a 30°C, primeiro passo linear de 0 até 30% A, segundo passo de 30% a 100% A, durante 30 min (tempo total 90 min).

A estrutura do 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) foi confirmada usando um GC-MS como segue: o pico de 5-HMF foi purificado por HPLC após duas injeções do extrato do bagaço, evaporado e diluído em 50 µl de metanol. Um µl da amostra foi diretamente injetada no instrumento de GC-MS (Agilent Technology (Palo Alto, USA) sem derivação, e equipados com um GC 6890N e um sistema constituído de 5973 MSD, principalmente por um

analisador quádruplo. A coluna era uma DB-1MS de AGILENT (30 metros x 0,25 polegada), rampa de aquecimento da coluna era de 100 a 250°C, e a comparação dos espectros foi feita usando bancos de dados de WHILEY e de NIST (2004)).

Os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) foram executados no centro regional da Universidade de Saint Jérôme (Marselha, France). Os espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN estado sólido foram obtidos em espectrômetro RMN de BRUKER AVANCE-400 MHz (Alemanha) que opera em frequência de ressonância  $^{13}\text{C}$  de 106 MHz e usa uma ponta de eletrodo comercial de rolamento duplo da BRUKER com os rotores de dióxido de zircônio de 4 mm de diâmetro externo. As técnicas do CP (SCHAEFER e STEJSKAL, 1976) foram aplicadas durante MAS com rotor em 10 KHz. Uma rampa de  $^1\text{H}$ -pulso inicial na potência de 100% que diminui até 50% foi usada durante o tempo do contato a fim de evitar combinações falsas de Hartmann-Hahn (PEERSEN *et al.*, 1983). O tempo do contato era 2ms. 2048 varreduras eram acumuladas, usando um atraso de 2s. Os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  foram referenciados ao tetrametilsilano e foram calibrados com sinal da carbonila da glicina, ajustados em 176,03 ppm.

Todos os espectros de HR-MAS ( $^1\text{H}$  NMR estado sólido) foram gravados em um Bruker Avance 400 operando em 400,13 MHz para o  $^1\text{H}$  e usando uma sonda HR-MAS  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  4 mm. A amostra foi aplicada a 5000 Hz. Todas as análises foram gravadas na temperatura ambiente. Os espectros de  $^1\text{H}$  HR-MAS RMN foram adquiridos com a pré-saturação do pico da água. Um pulso de 6,6  $\mu\text{s}$  90°, com uma largura espectral de 4800 hertz e um tempo do reciclo de 3 s foram usados.

Para uma melhor avaliação dos compostos fenólicos extraídos ou presentes nos suportes a partir do bagaço de cana-de-açúcar, foi decidido realizar a determinação dos compostos fenólicos totais, uma vez que estes compostos têm efeitos significativamente negativos quando presentes em altas concentrações. Para a determinação dos fenóis totais foi utilizado o método de FOLIN-CIOCALTEU (1927). Este informará o grau da extração ou da remoção dos compostos fenólicos dos suportes utilizados como um suporte *in vitro*.

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de MILLER (1959) que usa o ácido 3,5 di-nitrosalicílico (DNS). Em alta temperatura e em meio alcalino, o ácido 3,5 di-nitrosalicílico (DNS) é reduzido ao ácido 3-amino-5-nitrosalicílico na presença de açúcares redutores. Os açúcares totais foram determinados usando o método do Anthrona (DUBOIS *et al.*, 1956), o qual é útil para avaliar a presença dos polissacarídeos (ou não) pela comparação dos açúcares redutores.

Valores de pH das soluções aquosas com baixa agitação de bagaço tratado (BT) e não-

tratado (BNT) em diferentes tempos foram medidas com o uso de um pHmetro universal.

A visualização da morfologia e estrutura de empilhamento foram realizadas com um Microscópio de Varredura Eletrônica (MEV). As amostras foram antes metalizadas com  $\text{AgSO}_4$  em pó. Foram realizadas as visualizações antes e depois da extração dos compostos fenólicos dos suportes sem mistura e com mistura bagaço de mandioca e cana-de-açúcar.



## **2.3. Resultados e Discussão**

### **2.3.1. Processo de extração do bagaço de cana-de-açúcar e a sua otimização**

#### **2.3.1.1. A escolha da melhor mistura de solventes orgânicos para a extração**

A técnica aplicada no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para retirar os compostos inibidores de crescimento (fenóis, polissacarídeos, ligninas e outros) é chamada extração sólido-líquido. Neste processo é sempre utilizado um tipo de solvente que tem como finalidade retirar os compostos não desejados do suporte. Este deve ser escolhido de forma adequada para sempre garantir que o produto tratado mantenha suas propriedades finais, as quais neste caso são: não danificar ou alterar a estrutura física; não gerar um produto secundário no suporte, ou seja, manter o suporte inerte; obter um processo geral simples e rápido e o mais barato possível; solvente de baixo custo, fácil acesso e a sua possível recuperação; poder de extração conforme solicitado a sua aplicação; não agredir o meio ambiente e preferencialmente não ser tóxico. Assim foram escolhidos os solventes, metanol e etanol. Muito embora o metanol apresente a propriedade particular de ser tóxico, isto, não impediu que o mesmo fosse testado, pois o metanol residual sempre é eliminado com facilidade no processo geral.

Estes solventes escolhidos foram diluídos em 50% com água destilada para cada quantidade em razão de sempre minimizar os custos do processo.

Dois tipos de compostos: açúcares e fenólicos foram analisados nos extratos líquidos e obtidos a partir dos vários tratamentos orgânicos. O teor de açúcar foi monitorado por ser o principal constituinte do bagaço de cana-de-açúcar e da celulose. Eles também poderiam degradar durante os tratamentos orgânicos. Atualmente é reconhecido que, além do seu papel como suportes de polifenoloxidasas (PPO) e peroxidases, muitos compostos fenólicos também têm propriedades de reguladores de crescimento em cultura de tecidos (GEORGE, 1993). A questão principal é saber se os compostos fenólicos ou ambos fenólicos e açúcares têm algum efeito na técnica de enraizamento *in vitro* (micropropagação) nas espécies vegetais como macieira ‘Marubakaido’, morangueiro (cv. Camarosa e Dover) e cafeeiro (cv. *Catuai Vermelho*).

Desta maneira, vários tratamentos baseados no uso de solventes orgânicos foram testados com o bagaço selecionado (granulometria < 0,18 mm) e os resultados resumidos são apresentados na tabela 3. Mais adiante, muitos pontos serão discutidos ligados a estes resultados.

TABELA 3 – EFEITOS DOS DIFERENTES TRATAMENTOS NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E AÇÚCARES DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

	Tratamento	Total de Fenóis (mg)	Fenóis extraído (mg/mL solvente)	Açúcares redutores (mg)	Ácido p-cumárico (mg)	5-HMF (µg)
1	MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) Percolação 1	11,12	0,252	15,28	0,532	172,2
	MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) Percolação 2	3,12	0,062	0,16	0	16,49
	MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) Percolação 3	3,31	0,034	0	0	23,88
2	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1) Percolação	15,89	0,369	20,83	0,708	235
3	MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 50°C, 30 min.	25,30	0,337	19,59	0,956	258
	MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 50°C, 1h	18,76	0,394	16,68	0,596	152,5
	MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 50°C, 2h	21,80	0,444	18,19	0,742	189,0
4	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 50°C, 30min	15,10	0,408	14,35	0,523	139,6
	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 50°C, 1h	20,24	0,547	12,50	0,499	132,3
	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 50°C, 2h	<b>59,68</b>	<b>0,736</b>	19,21	0,697	250,3
5	MeOH/H <sub>2</sub> O(1:1) 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50°C, 2h	35,24	0,426	64,84	2,054	524
6	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,50°C, 2h	<b>56,93</b>	<b>0,702</b>	<b>66,69</b>	<b>2,508</b>	<b>741</b>
7	MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 4% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,50°C, 2h	15,83	0,427	28,56	1,003	259
8	EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 4% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,50°C, 2h	24,19	0,549	31,77	1,038	315

Valores expressos em médias de triplicata. <sup>1</sup>Curva padrão usado: Fenólicos,  $X = (A \cdot F) / 0,0882$  (mg/200 ml). Açúcares redutores:  $X = (\text{Absorbância} + 0,00317) / 0,00418$  (mg/L). Ácido *p*-cumárico e 5-HMF foram determinados por HPLC.

A tabela 3 mostra que as liberações de ambos os compostos fenólicos e açúcares são possíveis, usando-se solventes orgânicos como o metanol ou o etanol. Uma lavagem simples do bagaço, com baixo fluxo, é eficiente na remoção destes compostos do bagaço da cana-de-açúcar. Poucas quantidades de fenóis são liberadas após a primeira lavagem com metanol ou etanol (dados não registrados realizando este último, mas foram similares), e em outra parte os açúcares reduzidos são totalmente liberados durante a primeira lavagem. Finalmente, os melhores tratamentos foram encontrados para a mistura etanol/H<sub>2</sub>O, suplementado ou não por ácido sulfúrico, a 50°C durante duas horas, como foi observado pela relação de fenóis/volume do solvente usado (tabela 3). Esta relação alcançou um valor máximo de 0,736 e de 0,702

(valores em **negrito**, tabela 3) sem e com ácido sulfúrico, respectivamente. O tempo de aquecimento, aqui de duas horas, parece ser suficiente para eliminar a maioria dos compostos fenólicos, mesmo que a liberação ainda pareça aumentar mais após este período. Entretanto, mais tempo é indesejável para um processo rápido que está focalizado principalmente na máxima remoção dos compostos fenólicos. Entretanto, seria útil testar uma temperatura mais alta para o seu aquecimento, e assim, determinando também o seu tempo para que se consiga uma liberação ótima para estes compostos. Lembrando que, as condições iniciais na escolha dos solventes e a técnica de tratamento do bagaço foram relacionados diretamente, com o objetivo principal deste trabalho, onde o preço e a técnica dos processos devem ser minimizados.

Por outro lado, a liberação dos açúcares redutores não indica estar relacionada com o tempo de aquecimento, como observados com a mistura metanol e etanol. A melhor liberação foi obtida com a mistura etanólica contendo ácido sulfúrico 2% (66,7 mg de açúcar reduzido/5 g de bagaço seco) e teve a mesma conclusão para a liberação do ácido *p*-cumárico no extrato que chegou a 2,5 mg/5 g do bagaço seco (veja na tabela 3 acima, em **negrito**).

Os resultados mostram que, o uso do ácido sulfúrico na mistura não modificou a remoção total dos compostos fenólicos (relação de 0,706 a 0,736), mas sim que, a concentração do ácido *p*-cumárico extraído aumentou significativamente no extrato (0,69 e 2,50 mg/5 g de bagaço seco, antes e depois da acidificação, respectivamente). Da mesma maneira, a liberação dos açúcares redutores foi melhor na presença do ácido sulfúrico 2% (66,7 contra 19,2 mg/5 g de bagaço seco). Além do mais, de maneira surpreendente, o uso de ácido sulfúrico 4% nas misturas foi menos eficiente na eliminação dos compostos fenólicos e dos açúcares redutores.

## **2.3.2. Identificação dos compostos fenólicos e outras moléculas extraídas**

### **2.3.2.1. Compostos fenólicos**

O processo não usou um tratamento alcalino para a extração dos fenólicos a partir de bagaço de cana-de-açúcar que usualmente é empregado (SUN *et al.*, 2004). Portanto, os compostos fenólicos que são extraídos com a mistura etanol/água, suplementada ou não com ácido sulfúrico, não devem ser moléculas correspondentes ligadas à celulose e hemicelulose por esterificação. Entretanto, o tratamento com etanol e a sua incubação a 50°C poderia

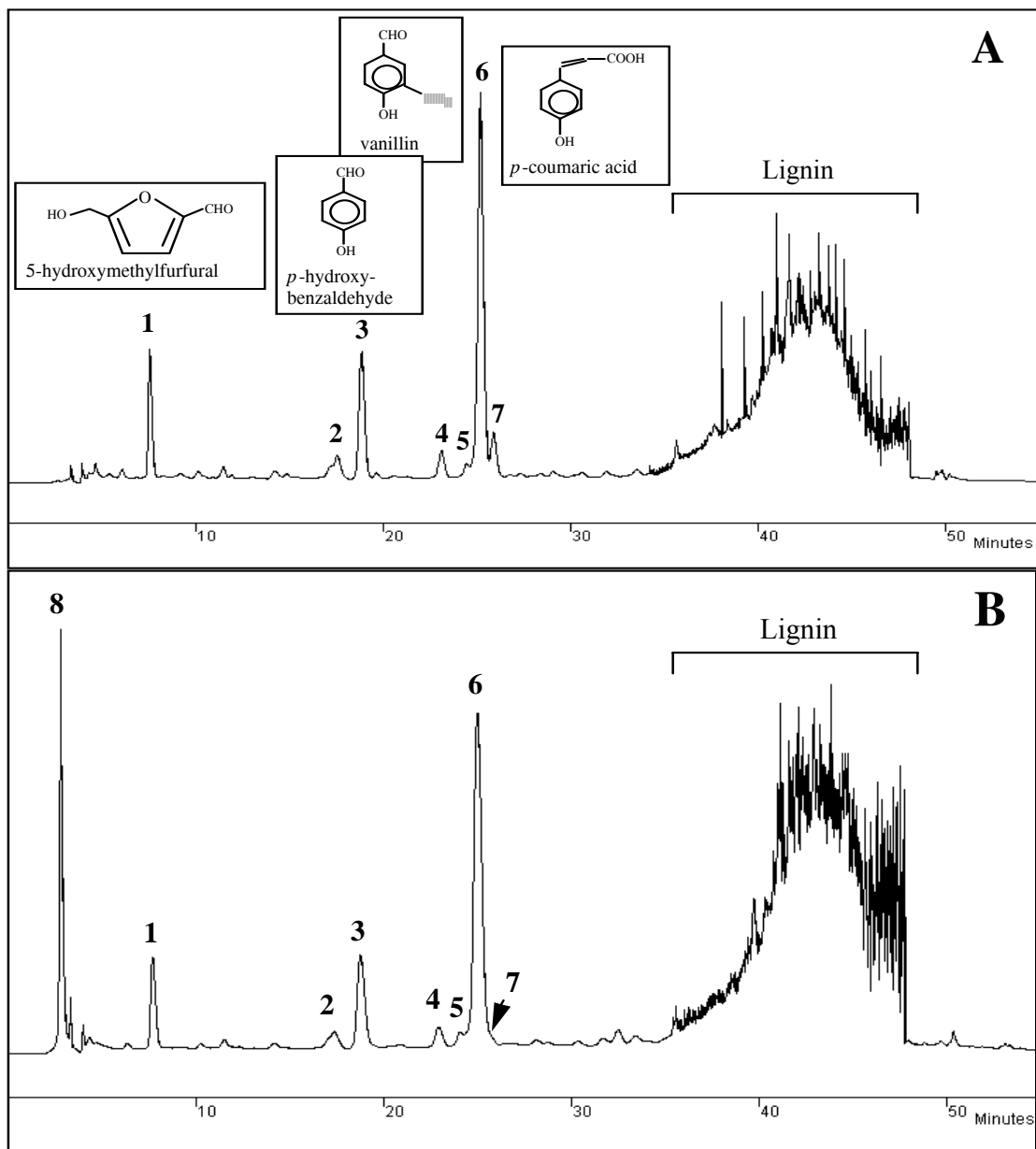
hidrolisar parcialmente o ácido *p*-cumárico que é normalmente preso primeiramente às unidades do siringaldeído (RALPH *et al.*, 1994).

Análises por HPLC em fase-reversa realizadas com os diferentes extratos dos tratamentos mostraram presença de compostos fenólicos. Realmente, a presença dos aromáticos foi confirmada pelo teste de FOLIN-CIOCALTEU com base nos picos purificados e pela absorvância dos mesmos a um comprimento de onda de 280 nm.

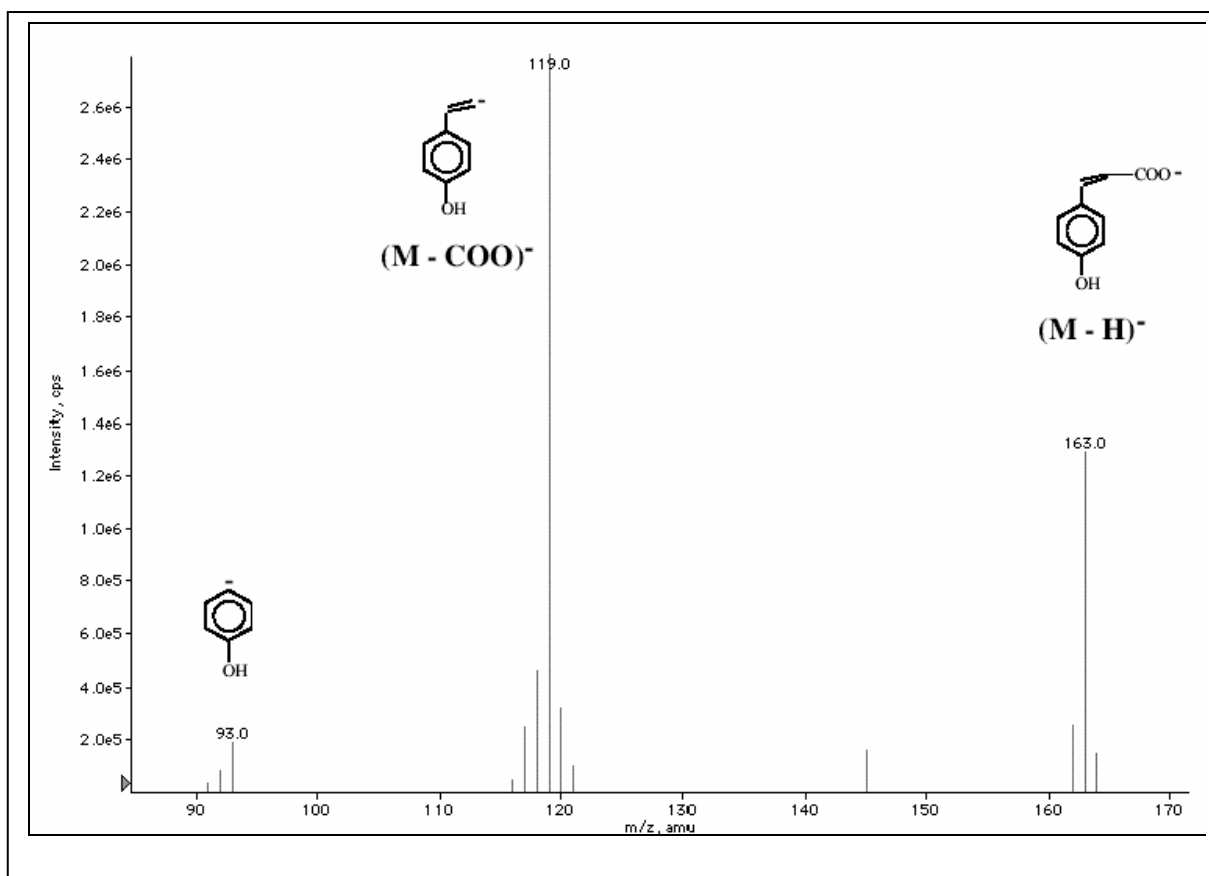
Detecção por um dispositivo de arranjo de diodos (diode array detection) permitiu diferenciar os ácidos benzóicos ou substâncias do benzaldeído das estruturas cinâmicas. O perfil da separação foi obtido após uma extração com uma solução de etanol aquoso, sem ou com ácido sulfúrico, e representado na figura 5 (A e B, respectivamente). A figura mostra três picos maiores (moléculas principais) acompanhados com quatro outras (de menor expressão), numeradas de 1 a 7, e mais uma zona bastante grande no final do gradiente de eluição ao redor de 40 minutos, correspondendo aos compostos menos polares.

O composto 6, eluído com um tempo de retenção ( $R_t$ ) de 25,4 minutos, foi encontrado como principal e atribuído ao ácido *p*-cumárico de acordo com dados de UV espectral ( $\lambda_{max}$  309 nm), tempo da retenção, re-injeção com uma molécula padrão e espectro de massa na modalidade negativa. Este último mostra um  $m/z$  163, que corresponde ao  $(M-H)^-$  íon (íon parente) (figura 6). Na outra parte, compostos 5 ( $\lambda_{max}$  270, 324 nm) e 7 ( $\lambda_{max}$  296 nm) indicaram a mesma massa e fragmentação do ácido *p*-cumárico. São muito próximos e correspondem, sem dúvida, aos isômeros do ácido *p*-cumárico que têm posição diferente do grupo hidroxila no anel aromático (não determinado).

**FIGURA 5** – SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS POR HPLC FASE-REVERSO COM ETOH/H<sub>2</sub>O (1:1) SEM (A) E COM 2% ÁCIDO SULFÚRICO (B). CONDIÇÕES: λ<sub>MAX</sub> 280 NM. GRADIENTE DE ACETONITRILA COM ÁGUA ÁCIDIFICADO (VEJA MÉTODOS). IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS: PICO 1, 5-HIDROXIMETILFURFURAL; PICO 2, NÃO IDENTIFICADO; PICO 3, P-HIDROXIBENZALDEÍDE; PICO 4, VANILINA; PICO 5 E 7, ISÔMEROS DE ÁCIDO P-CUMÁRICO; PICO 6, ÁCIDO P-CUMÁRICO; PICO 8 (VEJA B), NÃO IDENTIFICADO.



**FIGURA 6** – ESPECTRO DE MASSA FRAGMENTADO DE ÁCIDO P-CUMÁRICO ELUÍDO POR LC-MS E MOSTRANDO ION PARENTAL EM M/Z 163 E DE OUTROS FRAGMENTOS CORRESPONDENTES



O composto 3 na figura 5 (Rt 19,1 min) mostrou um espectro de UV simétrico ( $\lambda_{\max}$  284 nm) e a análise da massa indicou um  $m/z$  121 de  $(M-H)^-$  e corresponde ao 4-hidroxybenzaldeído (dados não mostrados). Fragmentação executada na modalidade de 60 volts mostrou um  $m/z$  92 que corresponde ao fragmento de  $(M-CHO)$ , e assim confirmando a presença de um aldeído na molécula (dados não mostrados). Pelo menos, a injeção de um padrão de 4-hidroxibenzaldeído comercial confirmou definitivamente esta estrutura.

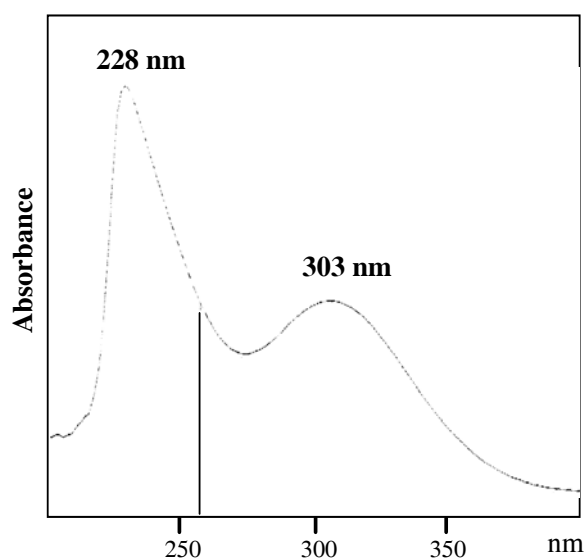
O composto 4 (Rt 17,7 min) correspondente à vanilina ( $\lambda_{\max}$  279 e 310 nm) com um grupo  $(M-H)^-$  ao  $m/z$  151 e seus fragmentos previstos em 60 volts no  $m/z$  136 (perda do grupo do hidroxila,  $(M-OH)^-$ ) e no  $m/z$  109 (perda de OH e CHO) (dados não mostrados). A injeção do padrão de vanilina comercial validou definitivamente esta estrutura.

Para o momento, o composto 2 ( $\lambda_{\max}$  282 nm, espectro UV simétrico) e análises de LC-MS e GC-MS não demonstraram sucesso na elucidação do mesmo. Atenção particular é

necessária para separar e purificar este composto e realizar a identificação por outras técnicas de espectroscopia.

O composto 8 foi encontrado somente no caso da extração com a mistura que continha ácido sulfúrico (figura 5B), além dos outros picos (1 a 7). Esta molécula indicou faixas de UV em 228 e 303 nm (figura 7) e não foi retida na coluna de fase-reversa C<sub>18</sub>, sugerindo que a mesma poderia carregar uma ou diversas cargas aniônicas como grupos do sulfato. Para o momento, a estrutura definitiva desta molécula não foi determinada.

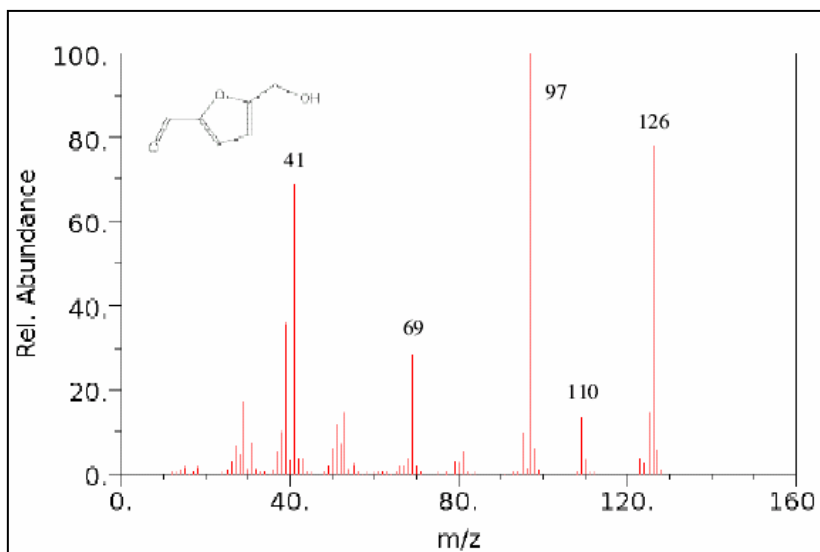
**FIGURA 7** – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO 8 DO SUPORTE ELUÍDO POR RP-HPLC DEPOIS DE EXTRAÇÃO COM MISTURA ETOH/H<sub>2</sub>O (1:1) CONTENDO 2% ÁCIDO SULFÚRICO.



### 2.3.2.2. Identificação de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) nos hidrolizados

O composto 1 necessitou um cuidado particular, pois ele não corresponde a um composto aromático. Este mostrou um espectro de UV simétrico ( $\lambda_{max}$  284 nm) e sua determinação foi sucedida pela injeção direta da molécula purificada em GC-MS (ex. sem derivatização da molécula). Os espectros de massa obtidos permitiram a identificação da molécula como 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) pela comparação com um banco de dados do NIST (figura 8).

**FIGURA 8** – GC-MS ESPECTRUM DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL (5-HMF) PURIFICADO E OBTIDO A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.



Este composto também chamado de 2-furanocarboxaldeído (CAS 67-47-0) é um derivado de furano. É produzido tipicamente em concentrações significativas após aquecimento em altas temperaturas e em alguns casos de hidrólise ácida da hemicelulose (MARTINEZ *et al.*, 2000). São formados pela desidratação de açúcares da hexose. Sabe-se também que o mesmo é tóxico para muitos microorganismos incluindo leveduras (ZALDIVAR *et al.*, 1999). O método cromatográfico empregado aqui foi muito útil para avaliar a presença desta substância tóxica no bagaço, em casos de uma aplicação nutritiva em plantas, por exemplo.

5-HMF foi detectado também nos extratos obtidos após tratamento do bagaço. Os resultados resumidos na tabela 3 mostram também que a concentração mais elevada do composto, o qual foi obtido com a mistura acidificada do etanol aquoso que alcançou um valor de  $740,0 \mu\text{g.g}^{-1}$  do bagaço seco. Observou-se também que uma elevação da temperatura ambiente a  $50^{\circ}\text{C}$ , não aumentou a retirada de 5-HMF nos extratos acidificados (veja abaixo), mas um aumento da concentração do ácido sulfúrico de 2 para 4% no solvente da extração, diminuiu a remoção de 5-HMF.

### 2.3.2.3. Extração com acetato de etila e hidrólise básica

Depois da extração com metanol ou etanol aquoso, suplementado ou não com ácido sulfúrico mostrou-se que, os compostos fenólicos incluindo 5-HMF podem ser extraídos facilmente e de maneira interessante com acetato de etila, e assim permitindo a purificação



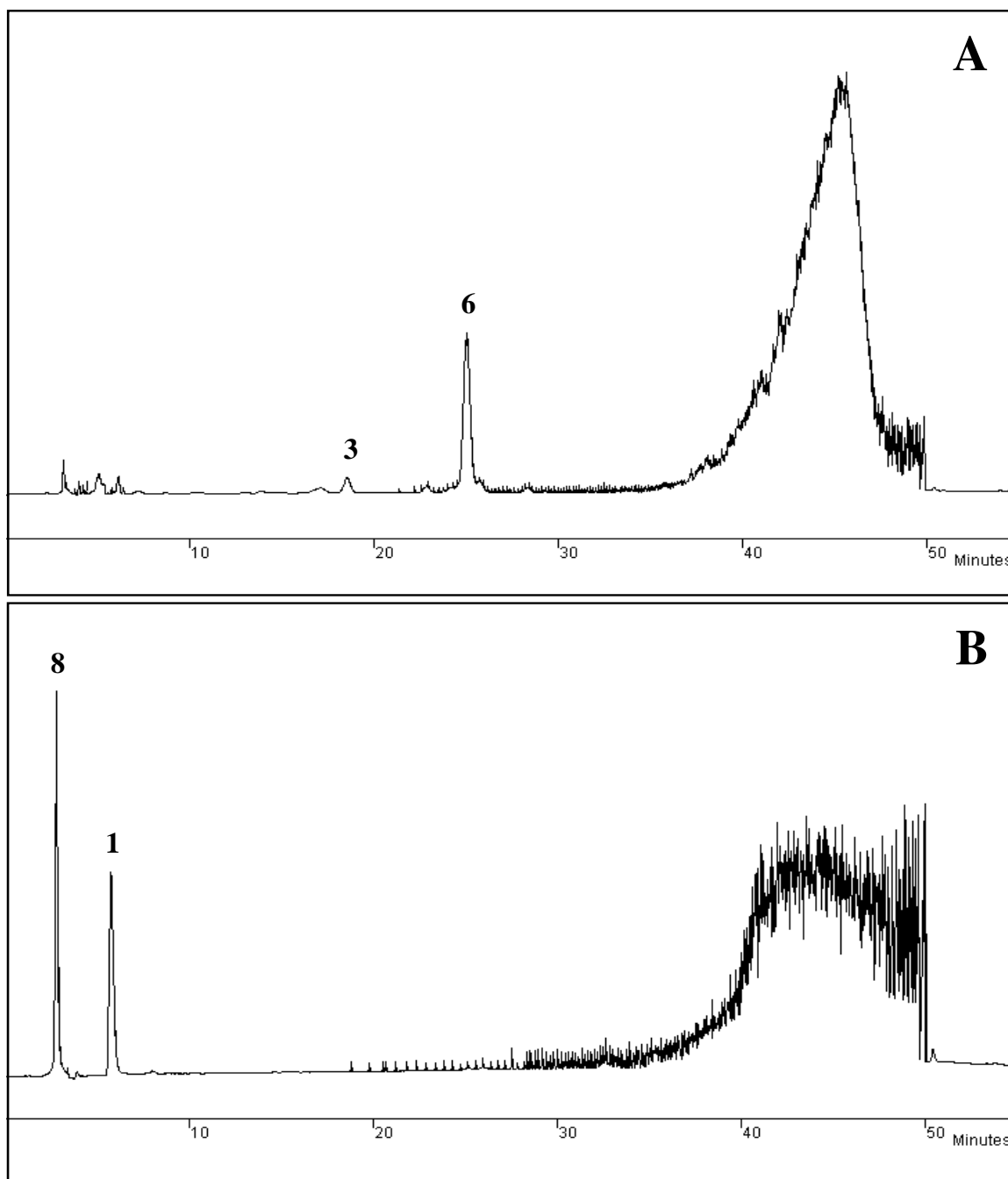
do extrato, removendo principalmente os açúcares e as substâncias hidrossolúveis que permaneceram na fase aquosa.

Além disso, demonstrou-se também que uma hidrólise com NaOH, não modifica o perfil do cromatograma de HPLC, exceto que, foi observado um aumento na altura do pico da lignina ao redor de 40 min (dados não mostrados). Esta observação é consistente com o fato que os extratos não continham ésteres ou moléculas da aglicona, como exemplo associações de fenol-açúcar; assim, os compostos de 1 a 8 não são compostos glicosilados ou esterificados.

#### **2.3.2.4. A perda de oligômeros das ligninas**

Eluição com HPLC de todos os extratos mostram uma zona de grande volume no fim do gradiente de eluição ao redor de 40 min (figura 9, A e B) e correspondem à lignina, estruturas provavelmente oligoméricas que não poderiam ser identificadas precisamente devido às dificuldades deste polímero complexo. A lignina liberada aqui poderia corresponder à lignina ácida solúvel, como descrito por SUN *et al.* (2004). De qualquer forma, após a evaporação completa do etanol (no extrato), e mais uma extração adicional com acetato de etila e em seguida a injeção em HPLC de ambas as fases, permitiram observar que a lignina (ou os oligômeros) atual está na fase aquosa, provavelmente corresponde às ligninas ácidas solúveis como descrito por SUN *et al.* (2004), e a fase com acetato de etila continha lignina diferente que, indubitavelmente seria a parte não solúvel (figura 9, A e B).

**FIGURA 9** – DOIS TIPOS DE LIGNINAS PRESENTES NO EXTRATO. EXTRAÇÃO REALIZADA NO SUPORTE COM EtOH/H<sub>2</sub>O CONTENDO 2% ÁCIDO SULFÚRICO (EM 4 ETAPAS, VEJA MÉTODO), QUAL FOI RE-EXTRAÍDO COM ACETATO DE ETILA. IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS: PICO 1 (B), 5-HIDROXIMETILFURFURAL; PICO 3, p-HIDROXIBENZALDEÍDO; PICO 6, ÁCIDO p-CUMÁRICO; PICO 8 (B), NÃO IDENTIFICADO.



É muito difícil avaliar o conteúdo da lignina num extrato. A avaliação da zona de área obtida com as análises com HPLC permitiram concluir que, a mistura etanol/água contendo ácido sulfúrico é mais eficiente na eliminação de uma pequena parte da lignina constituída provavelmente por oligômeros, do que outros tratamentos (tabela 3).

### **2.3.3. A escolha de um processo e a caracterização parcial do bagaço de cana-de-açúcar (suporte) tratado**

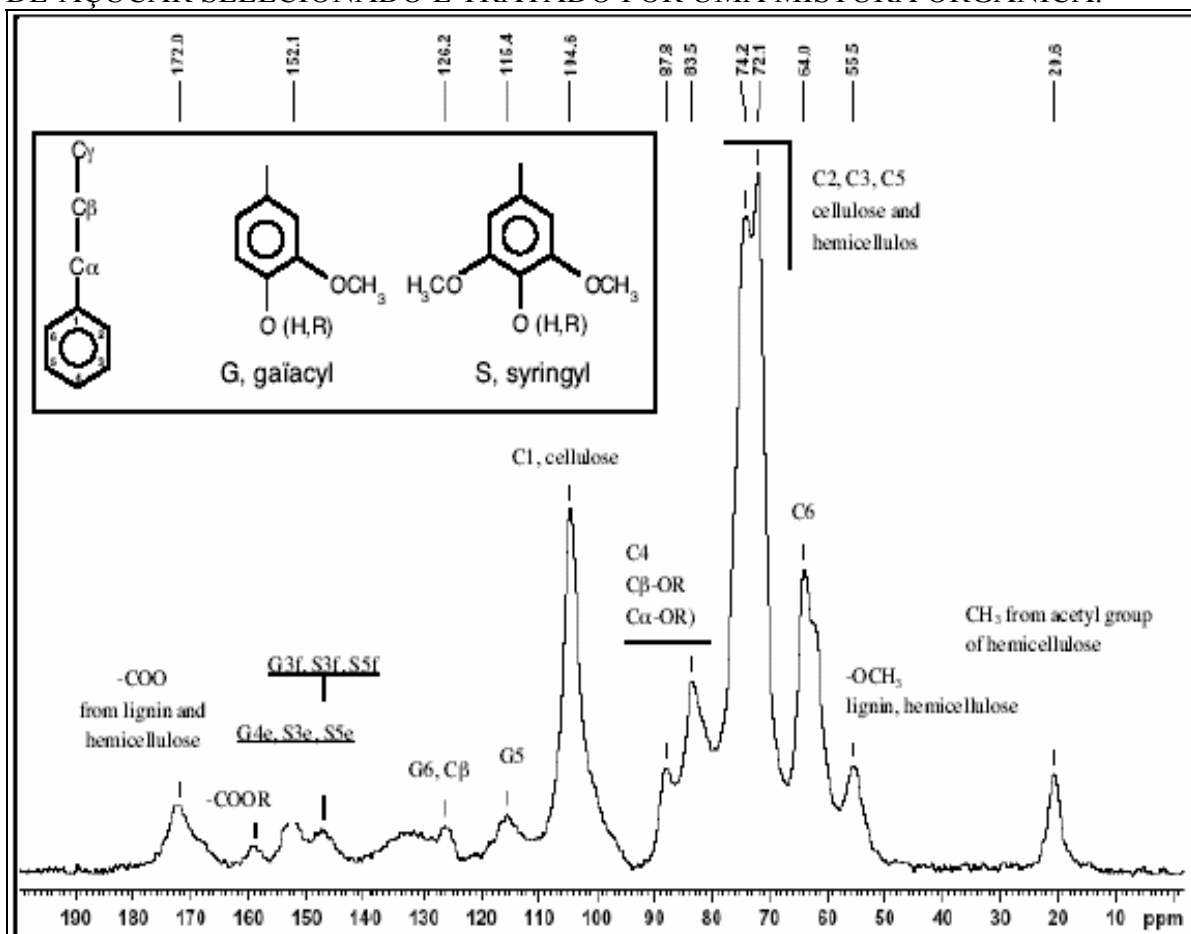
Considerando os estudos anteriores item 2.3.2.1. a respeito da liberação dos compostos fenólicos e de açúcares reduzidos do bagaço, um processo de quatro etapas foi escolhido e é descrito a seguir: primeira etapa, lavagem com etanol/água (1:1) com um fluxo de  $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  a temperatura ambiente; segunda etapa, aquecimento da mesma mistura contendo ácido sulfúrico concentrado 2% a  $50^\circ\text{C}$  por 2 horas; terceira etapa, lavagem com água e secagem a  $85^\circ\text{C}$  por 2 horas; quarta etapa, autoclavagem do sólido a  $120^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Depois, o bagaço tratado (BT) foi caracterizado e comparado com o bagaço não tratado (BNT).

#### **2.3.3.1. Caracterização do suporte tratado por $^{13}\text{C}$ CP-MAS e $^1\text{H}$ HR-MAS**

O espectro  $^{13}\text{C}$ CP-MAS do bagaço tratado é dado na figura 10 e mostra a atribuição das ressonâncias, comparando-o à literatura (PASCOAL NETO *et al.*, 1995). O pico do acetato ( $\text{CH}_3\text{-COO}^-$ ) em 20,6 ppm é bem visualizado e característica do carbono  $\text{CH}_3$  do grupo acetil nas hemiceluloses (SUN *et al.*, 2004). Nenhum pico de suberina ( $-(\text{CH}_2)_n-$ ) normalmente visualizado em 30-33 ppm foi observado (PASCOAL NETO *et al.*, 1995). Depois, a região entre 50 e 110 ppm é dominada por sinais fortes, que são atribuídos na maior parte aos carbonos diferentes da celulose e das hemiceluloses como indicado (figura 10). O pico metoxi em 55,5 ppm é dado pela lignina e pela hemicelulose (metilglucuronoxilanes), e atribuído a ambos os  $\text{Ar-OCH}_3$  (da lignina) e  $-\text{OCH}_3$  (da hemicelulose). Pode-se também observar o sinal característico do  $\text{C}_6$  em 64 e 62 ppm que correspondem à celulose cristalina e amorfa, respectivamente. O  $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$ , e  $\text{C}_5$  em 74,2 e 72,1 ppm são muito intensos e atribuídos à celulose/hemicelulose em suas formas cristalina e amorfa. Foi descrito que a lignina também contribui com alguma intensidade na escala 72-75 ppm. Na outra parte e ao lado dela, os picos na escala 82-90 ppm também têm contribuições da celulose e da lignina (PASCOAL NETO *et al.*, 1995). Assim, o  $\text{C}_4$  da celulose cristalina e da amorfa são bem definidas em

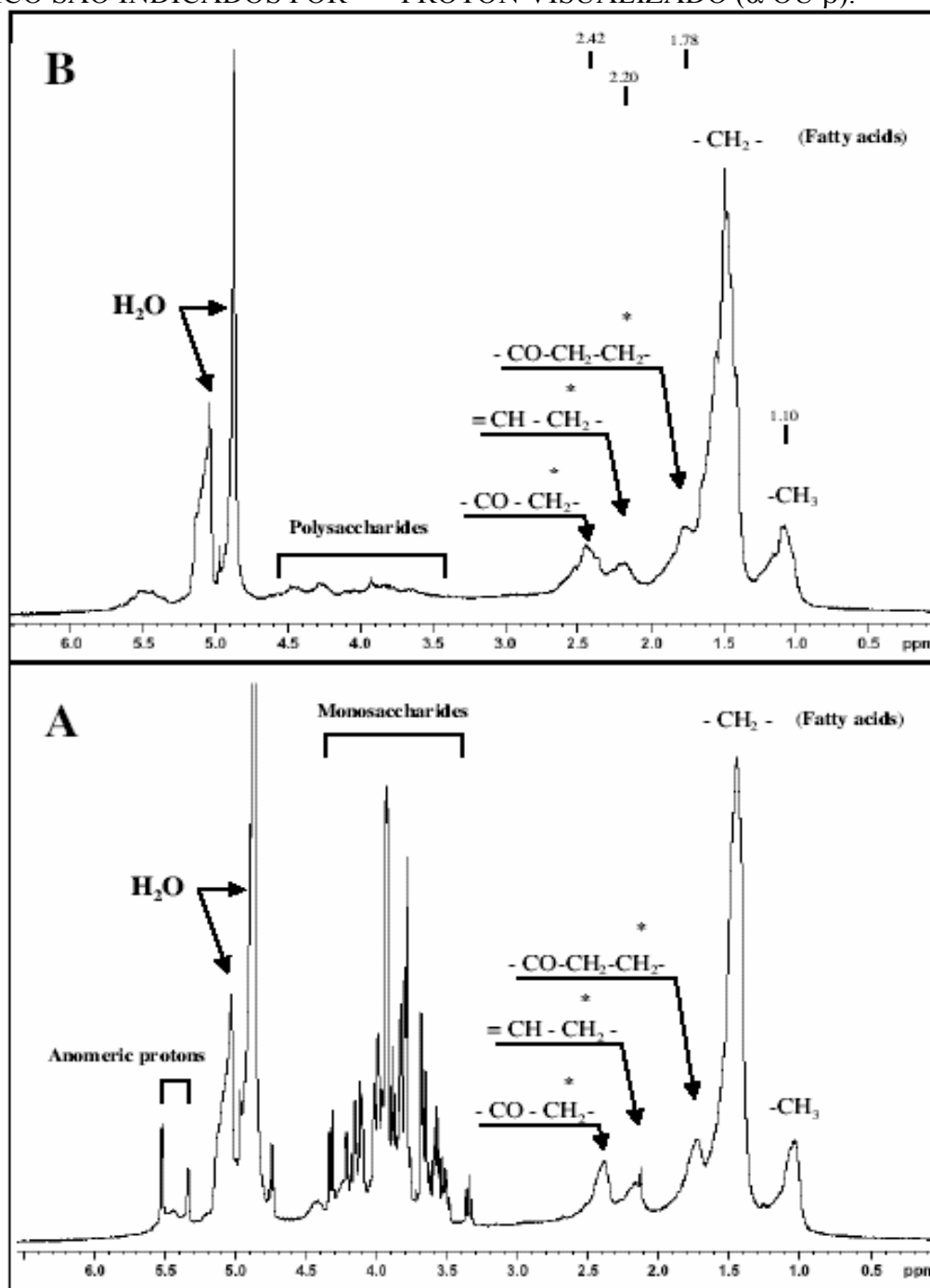
nossas condições experimentais, mas poderiam também ser atribuídas ao C $\beta$ -OR e a C $\alpha$ -OR da lignina (PASCOAL NETO *et al.*, 1995). O C<sub>1</sub> da celulose é intenso em 104,6 ppm, e pode ser atribuído indistinguível a uma parte da lignina (amorfo) ou não (forma cristalina) aqui.

**FIGURA 10** – <sup>13</sup>CP-MAS ESPECTRA EM ESTADO-SÓLIDO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR SELECIONADO E TRATADO POR UMA MISTURA ORGÂNICA.



Ao lado destes aparecimentos, a zona 110 a 160 ppm corresponde aos compostos da lignina e aromáticos. O sinal em 115,4 ppm corresponde ao G<sub>5</sub> da lignina, ex. o carbono 5 do guaicil meio que se obtém a partir do precursor coniferil álcool (HATFIELD *et al.*, 1987). Depois, foi achado o G<sub>6</sub> (o carbono 6, do meio guaicil) e a C $\beta$  ao 126,2 ppm e um carbono quaternário (G, S3, S5) ao 152,1 ppm (PASCOAL NETO *et al.*, 1995), S significa siringal, que provêm do precursor sinapil álcool. Além disso, o sinal em 159 ppm corresponde a um carbono esterificado (-COOR) a partir da lignina de acordo com WIKBERG e MAUNU, (2004). O pico de -COO ao 172,0 ppm vem da lignina e da hemicelulose, como anteriormente descritos por PASCOAL NETO *et al.*, (1995).

**FIGURA 11** –  $^1\text{H}$ -MAS NMR ESPECTRO DE (A) BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ORIGINAL COLETADO (BAGAÇO 2) E (B) BAGAÇO TRATADO COM MISTURA ETANOL (VEJA MÉTODO), TAMBÉM CHAMADO BAGAÇO 1. DESLOCAMENTO QUÍMICO SÃO INDICADOS POR \* = PRÓTON VISUALIZADO ( $\alpha$  OU  $\beta$ ).



Assim, concluindo primeiramente, o espectro de CP-MAS claramente mostrou os componentes básicos do bagaço de cana-de-açúcar, com aparecimento de celulose e hemicelulose, similarmente à literatura (PASCOAL NETO *et al.*, 1995). Em segundo lugar,

bagaço original (bagaço 2, ex. as partes somente reduzidas em frações menores), bagaço selecionado (bagaço 3) e bagaço tratado (bagaço 1) foram analisados e comparados entre si. Todos os espectros eram idênticos (dados não mostrados). Assim, baseado nas análises de CP-MAS que podem caracterizar altas massas moleculares de compostos, não foi encontrada diferença estrutural entre o bagaço tratado (BT) e não tratado (BNT).

### 2.3.3.2. Caracterização do suporte tratado por $^1\text{HR-MAS}$

$^1\text{HR-MAS}$  é uma técnica bastante utilizada para compostos moleculares menores (até 10 kDa). Primeiramente, o espectro HR-MAS do bagaço selecionado (bagaço 3, veja figura 11B) foi comparado com o espectro HR-MAS do bagaço original (sem tratamento, bagaço 2, figura 11A, veja métodos). Foi observado que em ambos os espectros não apareceram picos na zona correspondente a compostos aromáticos (6-12 ppm, dados não apresentados), justificando a observação anteriormente vista na análise com CP-MAS (figura 11A,B), que o peso molecular da lignina elevado.

Comparando os espectros (figura 11A,B) observa-se que açúcares, provavelmente monossacarídeos, foram eliminados durante o primeiro tratamento a partir do bagaço original sucessivamente com água encanada, secagem, e fragmentação (veja métodos item 2.3.2.), justificada pelo desaparecimento dos picos característicos na faixa de 3,4-4,5 ppm e correspondente ao próton equatorial. Portanto, picos a 5,35 e 5,53 ppm (figura 11A) correspondentes ao próton terminal anomérico  $\alpha\text{-D-furanosil}$  de monossacarídeos não estão presentes no bagaço selecionado (bagaço 3, veja figura 11B).

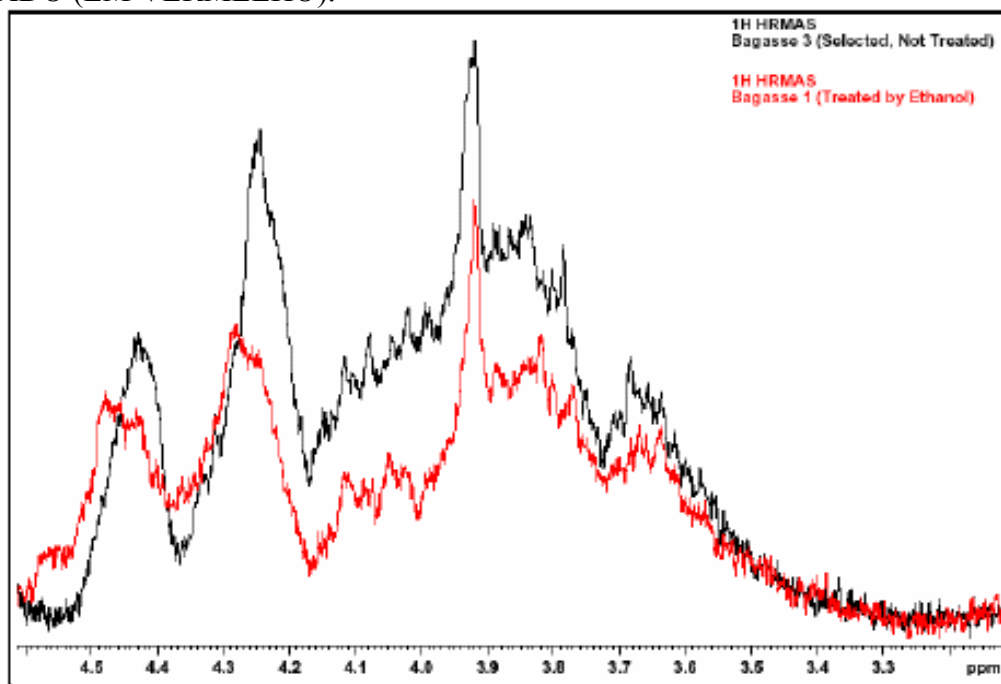
Em segundo lugar, a comparação do espectro HR-MAS do bagaço selecionado (bagaço 3) e do bagaço tratado (bagaço 1) não apresentaram diferenças, deste modo, pareceram similares conforme mostraram os recursos da ressonância (dados não apresentados). Os prótons da metila do ácido 4-O-metil-D-glucurônico resultaram num pico em  $\delta$  1,1 ppm, mas podem também corresponder à metila terminal de ácido graxo.

O bagaço de cana-de-açúcar analisado contém ácidos graxos, que fornecem picos intensos e característicos: prótons  $\beta$  em  $\delta$  1,78 e 2,20 ppm, e os prótons da cadeia  $(\text{CH}_2)_n$  em 1,48 ppm, como já descrito por (MANNINA *et al.*, 2003; VLAHOV, 1999). A comparação dos resultados obtidos a partir de CP-MAS confirma que estes picos não são devido à presença de suberina. De qualquer forma, como pode ser visto com ajuda de um software (lente eletrônica), o deslocamento químico de 3,4-4,5 ppm revelou o mesmo perfil, exceto com sinal menor no caso do bagaço tratado (figura 12). Esta importante observação leva a

concluir que, a mistura de etanol-H<sub>2</sub>O contendo ácido sulfúrico diminuiu o sinal nesta zona. Estas constatações correspondem às estruturas de polissacarídeos, especialmente pelo fato que nesta zona os picos são amplos, onde picos de monossacarídeos se apresentam como finos.

Assim, este polissacarídeo foi parcialmente eliminado por mistura orgânica acidificada, e a integração desta zona em ambos espectros (selecionado e tratado, figura 12) permitiu calcular a razão de desaparecimento de 40%. Este valor mostra ser bastante elevado. É necessário ser bastante cauteloso, porque a integração por RMN é bastante útil para estruturas químicas, mas sempre imprecisa para a quantificação de compostos, mais ainda com polímeros. Até este ponto de observação, surge a pergunta: será que esta razão do desaparecimento do polissacarídeo explica a perda do peso do bagaço depois do tratamento (20%)? A explicação para o desaparecimento de polissacarídeo pode explicar a perda de peso de 20% do suporte depois do tratamento.

**FIGURA 12** – <sup>1</sup>H HR-MAS NMR SPECTRUM EM ZONA DE 3,3-4,5 PPM MOSTRANDO A DIFERENÇA ENTRE O BAGAÇO SELECIONADO (EM PRETO) E O BAGAÇO TRATADO (EM VERMELHO).



#### 2.3.4. Determinação de açúcares

Depois de agitar o bagaço tratado por 30 min. em água a 45°C (veja métodos), analisando-o e filtrando-o, nenhum açúcar reduzido foi detectado na solução aquosa, e no controle (bagaço não-tratado). O bagaço foi lavado provisoriamente três vezes com água

corrente e destilada antes do tratamento (veja métodos item 2.3.3), a fim de eliminar açúcares, microorganismos e sais. E mais adiante, um tratamento com metanol ou etanol liberou os açúcares redutores que são provavelmente formados pela hidrólise de polissacarídeos superficiais (celulose ou hemicelulose). Esta observação é sustentada pelos índices de 5-HMF geralmente formados pela hidrólise da hexose e pela reação de maillard, pois nenhum 5-HMF foi encontrado no bagaço não-tratado (BNT) após a análise com HPLC (dados não mostrados).

### 2.3.5. A conservação de um pH ácido depois de tratar o suporte

Valores de pH de uma solução aquosa com baixa agitação de bagaço tratado (BT) e não-tratado (BNT) em diferentes tempos (veja métodos) foram registrados e listados na tabela 4 a seguir:

**TABELA 4** – VALORES DE pH REGISTRADOS A PARTIR DE UMA SOLUÇÃO AQUOSA DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR (TRATADO E NÃO-TRATADO)

Tempo (min)	pH	
	Não-tratado	Tratado
0	4,56	4,31
30	4,55	4,29
60	4,57	4,25

Isto indica que, o bagaço tratado ou não tratado tem um pH ácido na água. As injeções em HPLC (dados não mostrados) mostraram que a natureza ácida do bagaço está bem correlacionada com a presença dos oligômeros da lignina ou provavelmente da lignina ácido solúvel (ASL) na solução aquosa, uma vez que nenhum composto mono-aromático foi encontrado na solução, indicando que a lignina está em maior quantidade e que, pequenas partes são extraídas adicionando água. Esta observação também conduziu-nos a confirmar que não é possível eliminar totalmente a lignina por tratamentos usando a solução aquosa do etanol. Assim, o pH precisa ser controlado sistematicamente ou ajustando-o após o tratamento do bagaço, para usos adicionais em culturas de tecidos e micropropagação de plantas.



### 2.3.6. A perda do peso do suporte (tratado e não-tratado)

A partir de 5,0 g de bagaço, foi obtido 4,08 g do bagaço tratado no final (peso perdido 0,92 g, média de triplicata), correspondendo a uma perda de 20%. Para justificar esta perda, compostos fenólicos, açúcares redutores e açúcares totais (ANTHRONE) foram analisados no extrato total obtido a partir do processo escolhido acima (item. 2.3.). Os resultados são apresentados na tabela 5.

**TABELA 5** – RESUMO DA PERDA DO PESO NA BASE DE FENÓLICOS E DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES. VALORES SÃO MÉDIAS DE EXPERIMENTOS E ANÁLISES DE TRIPLICADOS.

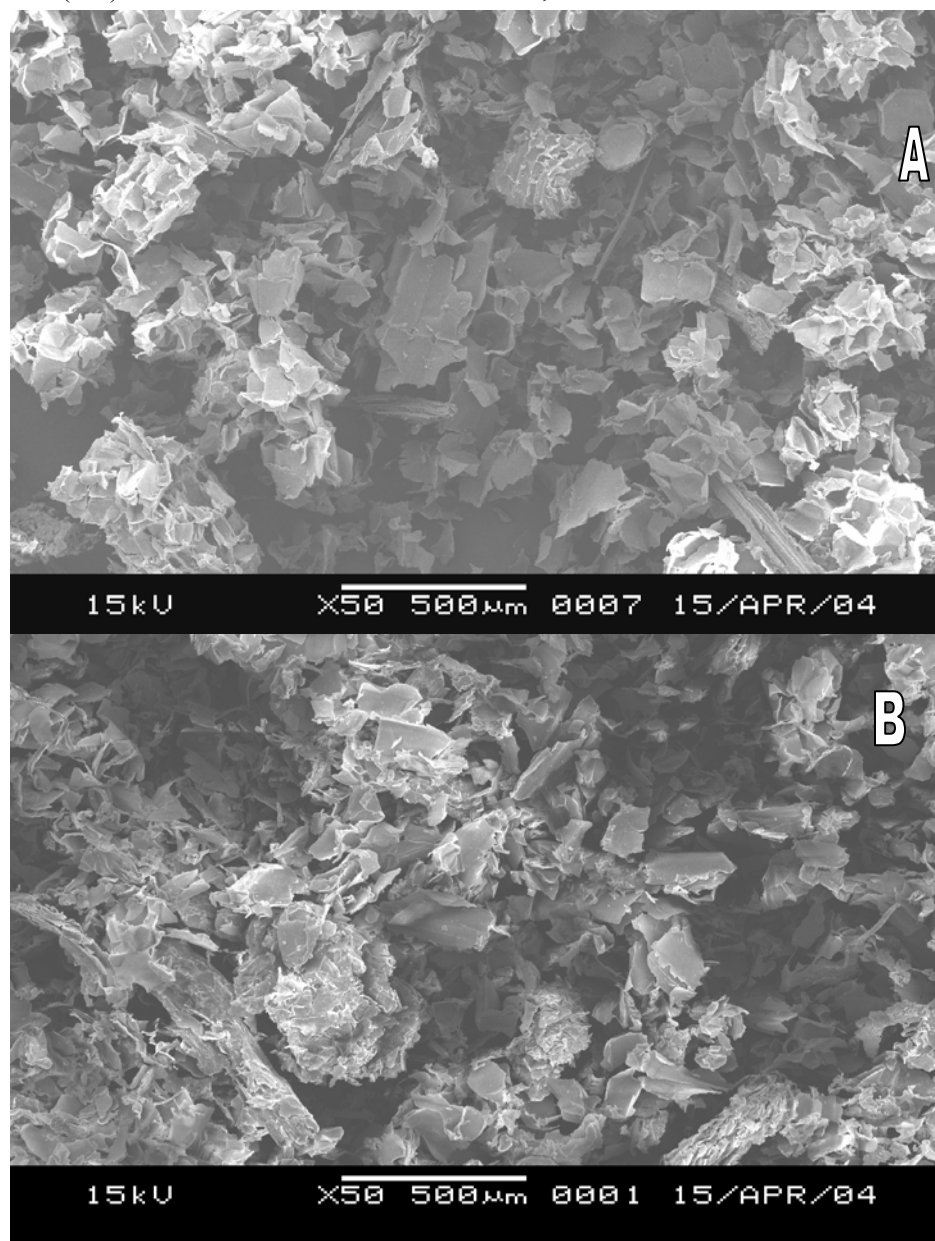
Perda do bagaço (mg)	Fenólicos (mg)	Açúcar redutores (mg)	Açúcar totais (mg)	Total (mg) (Fenólicos + Açúcares)	Açúcares totais – Açúcares redutores (mg)
1020	35,8	27,5	138,3	174,1	110,8

A tabela 5 indica que, a liberação dos compostos analisados, por exemplo, fenólicos e açúcares não puderam explicar a perda do peso do bagaço. A diferença entre açúcares totais e açúcares redutores é importante e poderá ser atribuída às presenças de polissacarídeos que até o momento não foram caracterizados. Portanto, baseado nestas investigações, não foi possível indentificar compostos responsáveis pela perda do peso do bagaço, e novos tipos de análises são necessários para explicar esta observação.

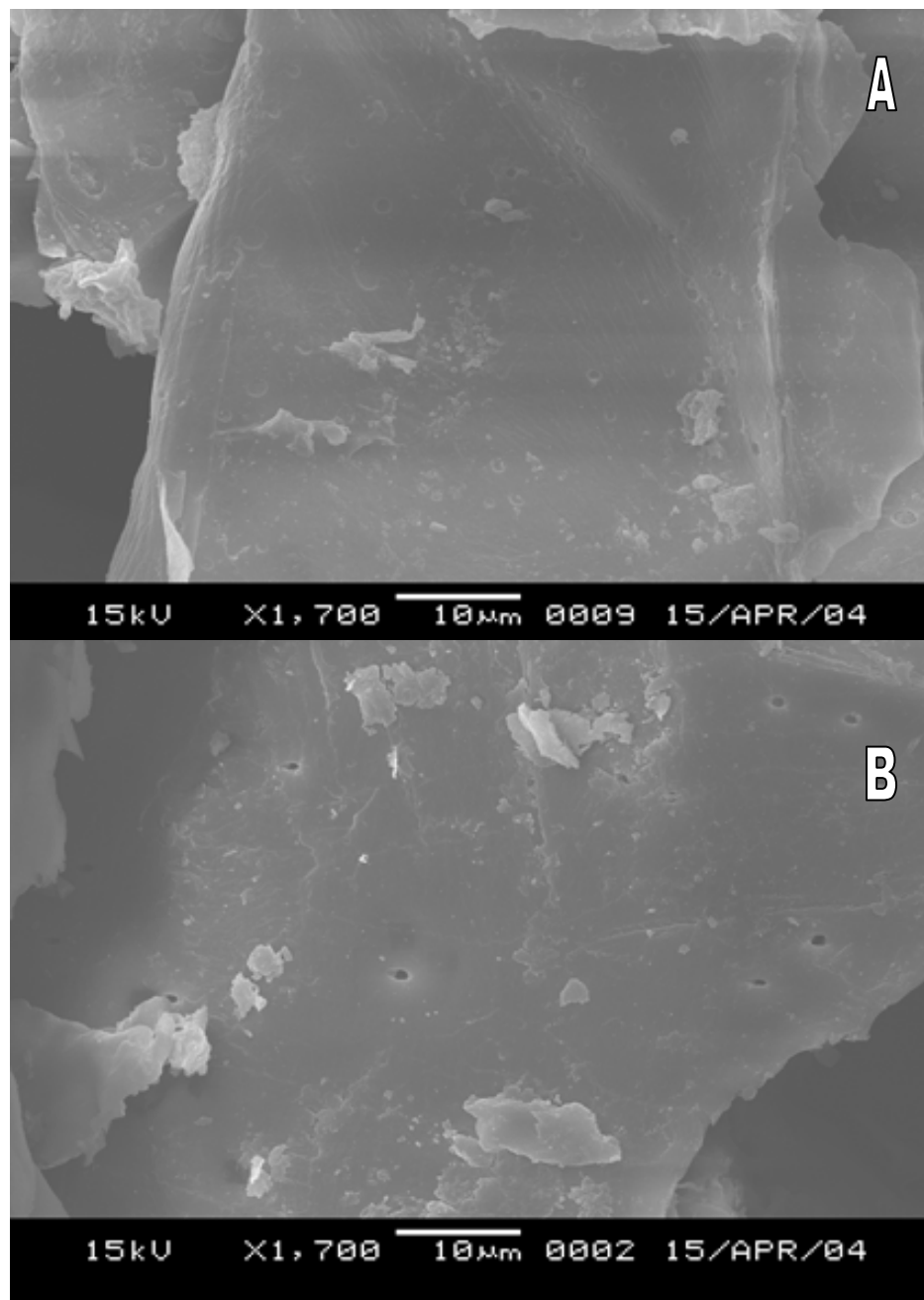
### 2.3.7. Visualização dos Suportes

As figuras 13 e 14 estão ilustrando o suporte de bagaço de cana-de-açúcar com partículas menores que 0,18 mm por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes (A) e depois (B) do tratamento com mistura do solvente orgânico, etanol/H<sub>2</sub>O acidificado com 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com aumentos de 50 X e 1700 X, respectivamente. Em ambas figuras pode ser observada a pequena diferença obtida antes e depois de tratamento do bagaço. Na figura 14 onde a ampliação é de 1700 X, os pequenos orifícios e as micro-fissuras na parte B deixam bem clara a ação do solvente no suporte comparado ao bagaço não tratado (BNT).

**FIGURA 13** – VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO SUPORTE DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM O TAMANHO DA PARTÍCULA < 0,18 mm ANTES (A) E DEPOIS (B) DO TRATAMENTO COM MISTURA ETANOL/H<sub>2</sub>O (1:1) ÁCIDIFICADO COM 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AUMENTO DE 50X.

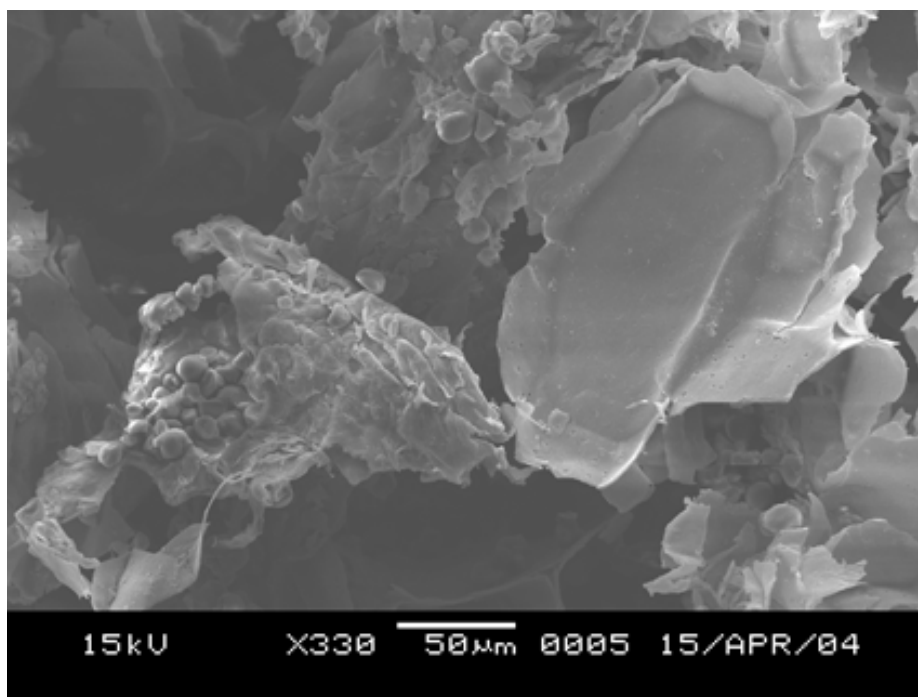


**FIGURA 14** – VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO SUPORTE DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM TAMANHO DA PARTÍCULA < 0,18 mm ANTES (A) E DEPOIS (B) DO TRATAMENTO COM MISTURA ETANOL/H<sub>2</sub>O (1:1) ÁCIDIFICADO COM 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AUMENTO DE 1700 X.



Na figura 15 pode ser visualizada a mistura compacta dos suportes bagaço de mandioca/cana-de-açúcar (40/60%) tratados, ambos com partículas < 0,18 mm a um aumento de 330 X. Com a escala na figura (apresentado embaixo de cada figura) podemos obter uma idéia no arranjo e do tamanho dos poros formados durante o uso do suporte no processo de cultivo, enraizamento e a pré-aclimataçãoin vitro. Esta figura comprova que no meio preparado à base destes suportes existe uma certa micro-porosidade, para qual o tamanho dos poros pode ser estimado.

**FIGURA 15** - VISUALIZAÇÃO MICROSCÓPICO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV) DO MISTURA DOS SUPORTES DE BAGAÇO DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR COM TAMANHO DA PARTÍCULA < 0,18 mm TRATADO COM MISTURA ETANOL/H<sub>2</sub>O (1:1) ÁCIDIFICADO COM 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, AUMENTO DE 330 X



## 2.4. Conclusões

Foi demonstrado que usando uma mistura de baixo custo composto por EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1) e contendo ácido sulfúrico 2% conduziu à máxima extração de compostos fenólicos e açúcares em comparação aos de outras condições de extração.

Observou-se que, o bagaço tratado ou não com a mistura etanólica, tem um pH ácido quando diluído em água. Isto pode ser indubitavelmente explicado pela presença de vários oligômeros ácidos da lignina na solução.

Os principais fenóis liberados eram ácido *p*-cumárico e *p*-hidroxibenzaldeído acompanhados por 5-hidroximetilfurfural.

O uso do ácido sulfúrico na mistura da extração não modificou as quantidades de compostos fenólicos totais removidos (uma relação de 0,706 e de 0,736), mas a concentração do ácido *p*-cumárico foi aumentada significativamente no extrato (0,14 e 0,50 mg/g bagaço seco, antes e depois da adição com ácido sulfúrico 2%, respectivamente).

A liberação dos açúcares redutores foi melhor na presença do ácido sulfúrico a 2% (13,4 contra 3,84 mg/g bagaço seco).

Observou-se que, a liberação total (fenóis mais açúcares) não poderia explicar a perda do peso do bagaço (aproximadamente 20%) devido ao tratamento.

A perda dos polissacarídeos foi confirmada por análises de HR-MAS fazendo a varredura da zona correspondente de deslocamentos químicos.

As figuras obtidas por MEV mostram bem as diferenças entre o bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT) e não tratado (BNT) em duas ampliações, com aparecimento de orifícios e as micro-fissuras, justificando o tratamento do suporte.

## Referências

- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v.28: p.350-356, 1956.
- FOLIN, O. and CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophan determination in protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.73, p.627-650, 1927.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture, Part 1- The Technology. Edington: Exegetics Limited. p.274-382, 1993.
- HATFIELD, G.R.; MACIEL, G.E.; ERBATUR, O; ERBATUR, G. Qualitative and quantitative analysis of solid lignin samples by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Anal. Chem.*, v.59, p.172-179, 1987.
- LEME, J.J.; BORGES, J.M. Açúcar de Cana, Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, p.46-62, 1965.
- KUKREJA, A.K., MATHUR, A.K.; ASHUDA, P.S. Morphogenic potencial of foliar explants in *Duosisia myoporoides* R. Br. (Solanaceae). *Plant Cell Rep.*, v.5, p.27-30, 1986.
- MANNINA, L.; SOBOLEV, A.P.; SEGRE, A. Olive oil as seen by NMR and chemometrics. *NMR Spectroscopy*, v.15, p.6-14, 2003.
- MARTINEZ, A., RODRIGUEZ, M.E.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. *Biotechnol. Prog.*, v.16, p.637-641, 2000.
- ICIDCA-GEPLACEA-PNUD. Manual de los derivados de la cana de azucar. Bagazo. (eds). Cuban Institute of Research on Sugarcane, Mexico, 1990. p.62.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428, 1959.
- MOHAN, R.; OKAMOTO, G.T.; QUOIRIN, M.G.; SOCCOL, C.R. Estudo de um novo suporte para enraizamento de micro-estacas *in vitro*. In: *ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTO*, IX, 2001, CuritAIB. 9º EVINCI. CuritAIB: Universidade Federal do Paraná, 2001. p. 103.
- MOHAN, R.; SOCCOL, C.R.; QUOIRIN, M.G.; PANDEY, A. Use of sugarcane bagasse as an alternative low cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, v. 40, n. 4, p. 408-411, July-August. 2004.
- ORPLANA-Organização dos Plantadores de Cana da Região Centro Sul do Brasil. Disponível em: <[www.orplana.com.br](http://www.orplana.com.br)> Acesso em: 08 março 2004.
- PARANHOS, S.B. Cana de Açúcar - Cultivo e Utilização. v.2. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.761-765.

PASCOAL, NETO, C; ROCHA, J.; GIL, A.; CORDEIRO, N.; ESCULAS, A.P.; ROCHA, S.; DELGADILLO, I.; PEDROSA DE JESUS, J.D.; FERRER CORREIA, A.J.  $^{13}\text{C}$  Solid-state nuclear magnetic resonance and Fourier transformed infrared studies of the thermal decomposition of cork. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, v.4, p.143-151, 1995.

PEERSEN, O.B.; WU, X.L.; KUSTANOVICH, I.; SMITH, S.O. Variable-Amplitude Cross-Polarization MAS NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, v.104, p.334-339, 1993.

RALPH, J.; HATFIELD, R. D.; QUIDEAU, S.; HELM, R. F.; GRABBER, J. H.; JUNG, H. J. G. Pathway of p-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* v.116, p.9448- 9456, 1994.

SCHAEFER, J.; STEJKAL, E.O. Carbon  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance of polymers spinning at the magic angle. *J. Am. Soc.* 98, p. 1031-1032, 1976.

SEAB - Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Acompanhamento da situação agropecuária do Paraná, p. 01-10, 2004.

SUN, J.X; SUN, R.; SUN, X.F.; SU, Q. Fractional and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. *Carbohydrate Research*, v.339, p. 291-300, 2004.

VLAHOV, G. Application of NMR to the study of olive oils. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v.35, p.341-357, 1999.

WIKBERG, H.; MAUNU, S.L. Characterisation of thermally modified hard- and softwoods by  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR. *Carbohydrate Polymers*, v.58, p.461-466, 2004.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L.O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotecnol. Bioeng.*, v. 65, p.24-44, 1999.

### 3. ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE PLANTAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’ EM CULTIVO *IN VITRO* USANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E ACLIMATIZAÇÃO

**Resumo:** Conforme a crescente demanda de novos recursos no conhecimento de micropropagação vegetal, os estudos na busca de tecnologias alternativas fornecem bases para estabelecimento de novos protocolos sustentáveis. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização do resíduo agro-industrial: bagaço de cana-de-açúcar não tratado e tratado com granulometria  $< 0,18$  mm em substituição ao ágar no meio de cultivo para a técnica de micropropagação vegetal na fase de enraizamento, e sua posterior aclimatização. Inicialmente, utilizando bagaço de cana-de-açúcar não tratado, uma importante melhoria na parte de enraizamento com uma redução de 13,35% do custo foi conseguida, quando comparado ao meio de cultivo à base de ágar. Os ensaios foram realizados utilizando o meio de cultura MS com a metade de concentração de sais, sacarose 3%, AIB  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e micro-estacas de porta-enxerto ‘Marubakaido’. Avaliando a aclimatização dos mesmos, uma redução de 37,00% nos custos foi obtida. Quando avaliados os números e o comprimento das raízes, assim como o comprimento caulinar de cada planta depois de 28 dias de cultivo observou-se que, no meio contendo bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) obteve-se um desempenho superior da ordem de 62,23% em relação ao número das raízes formadas, 43,56% para o tamanho das raízes e 18,82% para o tamanho das explantes comparado ao meio com suporte a base de ágar. Quando avaliados os números e o comprimento das raízes, assim como comprimento caulinar de cada explante em diferentes tempos de cultivo observou-se que, no meio contendo bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT) obteve-se desempenho superiores em período de cultivo antecipado (28 dias) da ordem de 105,55% em relação ao número de raízes formadas, 122,77% para o tamanho das raízes e 54,11% para o comprimento caulinar dos explantes comparado ao meio com suporte à base de ágar. A redução do custo na parte de enraizamento ficou em torno de 8,26%, e na parte de aclimatização ficou por 44,00% comparado ao meio com suporte à base de ágar.

Palavras chaves: *custo de clonagem, meio de cultivo, micropropagação, resíduos industriais.*

**Abstract:** The growing demand for agricultural interests associated to the techniques of plant micropropagation requires new alternative technologies which can provide bases for the establishment of new sustainable protocols. The goal of this study was to evaluate the use of agro-industrial residue ‘sugarcane bagasse’ particles  $< 0.18$  mm, adequately treated as substitution to the agar (gelling agent) in the culture medium during plant micropropagation technique on the rooting step and their posterior acclimatization. Initially, when working with the not treated sugarcane bagasse (NTB), a significant cost reduction of 13.35% during the rooting step was obtained, when compared to the culture medium supported with agar. The experiments were realized utilizing MS salts (half force), Sucrose 3%, AIB  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  and micro-cuttings of ‘Marubakaido’. The acclimatization of the explants, showed a cost reduction of 37,00%. When the number and length of roots, together with the explants length after 28 days of cultivation were evaluated utilizing the same support, superior results as 62.23% for the roots number, 43.56% for the roots length and 18.82% for the explants length were obtained. And when the same evaluations were applied with the treated sugarcane support (TB), better superior results were obtained as 105.55% for the roots number, 122.77% for the roots length and 54.11% for the explants length. The reduction of cost related to the rooting step remained around 8.26% and for the acclimatization 44.00% compared to the medium based on agar support.

Keywords: *cloning cost, culture medium, micropropagation, industrial residues.*



### 3.1. Introdução

Órgãos e tecidos de plantas são suportados de maneira mais adequada na superfície dos meios de cultivo, pelo aumento da sua viscosidade por algum tipo de agente geleificante. O material adicionado ao meio escolhido deve ser esterilizado por autoclavagem. Este meio deve ser líquido quando quente, mas viscoso quando resfriado. Diversos produtos estão disponíveis para geleificar meios de cultura, mas os resultados obtidos com cada um deles podem ser diferentes. A seleção do material mais adequado, em termos de taxa e custo de propagação, tem sido uma outra tarefa para a formulação de um protocolo apropriado para a propagação via cultura de tecidos de qualquer planta (GEORGE, 1993).

O ágar tem sido, tradicionalmente, usado como agente geleificante para cultura de tecidos, e é largamente explorado para a preparação de meio de cultura semi-sólida. É usado por suas vantagens como o fato de formar um gel líquido com água a 100°C e de solidificar a uma temperatura cerca de 45°C. Além disso, os géis não são digeridos pelas enzimas das plantas, e o ágar não reage fortemente com os constituintes do meio. O ágar é composto por polissacarídeos complexos, constituído por galactose. Ele é um produto natural, extraído de espécies de algas vermelhas, as quais são selecionadas a partir do mar em diversos países. Dependendo da origem, o ágar pode ter sua composição diferenciada como produto final (GEORGE, 1993).

O crescimento de calos ou órgãos de plantas em meio solidificado é, geralmente, mais lento do que em meio de cultura líquido. O crescimento em géis duros é conseqüentemente, inibido, mas a morfogênese pode ser melhorada quando a cultura de explantes ou de calos é mantida em meio suplementado com ágar (GEORGE, 1993).

Um meio solidificado com ágar ou gel pode ter um potencial de água mais baixo (mais negativo) do que seu equivalente líquido (DEBERGH *et al.*, 1981). Este último pode ser responsável pelas respostas morfogênicas que, às vezes, ocorrem no ágar. A consistência de um meio aumenta linearmente com a concentração de ágar, e o contato entre explante e meio decresce, causando uma redução na absorção de reguladores de crescimento para o explante, íons minerais e substâncias orgânicas (DEBERGH, 1982).

Tecidos ou órgãos vegetais podem ser cultivados, em papel, ou outros materiais inertes e porosos. A aeração de tecidos e raízes pode aumentar em materiais (suportes) porosos sendo, usualmente, melhor em meios sólidos de ágar do que em líquido estático. Isto porque, há uma maior quantidade de oxigênio disponível no sistema poroso. Suportes já avaliados com sucesso para uso *in vitro* são: papel (papelão), areia grossa, vermiculite ou perlite, lã de

rocha, etc., que absorvem o meio líquido, porém permitem a difusão livre de oxigênio (GEORGE, 1993). Microestacas de porta-enxerto 'Marubakaido' foram enraizadas com grande sucesso (100 %) e com qualidades melhores em suporte natural selecionado a partir de bagaço de cana-de-açúcar (MOHAN *et al.*, 2001; MOHAN *et al.*, 2004).

Microestacas de várias espécies crescem e enraízam satisfatoriamente em lã de rocha umedecida com meio líquido (TANAKA *et al.*, 1991). Fibra de 100 % poliéster em placa de Petri foi usado por CHENG e VOQUI, (1977) para suportar culturas, sendo irrigado, pela parte de cima, com meio líquido.

Geralmente quando o suporte for de origem agro-industrial natural, o material pode ser pré-tratado, no melhor tamanho, na melhor forma de desempenho, mostrando uma alta eficiência para o crescimento microbiano, com a finalidade de aumentar o rendimento do processo. Não podemos esquecer que existe um certo tamanho de partícula que tem o melhor desempenho em cada processo (PANDEY *et al.*, 2001). Estudos sobre a melhor granulometria de suporte aplicada como suportes alternativas foram demonstrados com microestacas de macieira usando como base bagaço de cana-de-açúcar por MOHAN *et al.* (2001) e MOHAN *et al.* (2004), confirmando a afirmação anterior.

A água presente em produtos como alimentos, cosméticos e meio de cultura, confere características como textura, consistência, viscosidade e tempo de vida ao produto e à vida microbiana presente. Um líquido puro, ou absorvido em suporte, com uma interface em contato com o ar, perde parte das suas moléculas para esta fase gasosa pela evaporação. Se o líquido for adicionado num recipiente fechado na presença de ar, as moléculas se desprendem do meio líquido por evaporação até um ponto de equilíbrio. A partir deste ponto passará a ocorrer o fenômeno de compensação, onde para cada molécula que se evapora há uma molécula que se condensa. Isto é denominado como pressão de vapor.

Ao adicionar um soluto em um líquido (solução, meio de cultura, etc.) a evaporação das moléculas para a fase gasosa torna-se menor, conseqüentemente, a pressão de vapor é reduzida. Com base nestes conceitos, a atividade de água ( $Q_w$ ) de uma solução ou meio de cultura é definida como relação entre pressão de vapor da solução ( $P$ ) e a pressão de vapor do solvente puro ( $P_o$ ). Usualmente a  $Q_w$  de água pura é igual a um.

$$Q_w = \frac{\text{Pressão de vapor da água no produto}}{\text{Pressão de vapor de água pura}}$$

Normalmente na cultura de células, tecidos e órgãos, é necessário a incorporação de uma fonte de carbono no meio de cultivo, como função de fornecer energia. Geralmente, sacarose é o açúcar mais utilizado na micropropagação, como também, em processos de

cultura de tecidos em geral. Os potenciais da água ou as pressões osmóticas de um meio ( $\psi_s$ ) com os seus componentes dissolvidos podem ser estimados pela soma dos potenciais de água ou as pressões osmóticas dos macro nutrientes e dos açúcares ( $\psi_s \approx \psi_{s \text{ macronutrientes}} + \psi_{s \text{ açúcares}}$ ). Açúcares são os maiores responsáveis pelas potenciais de água ou das pressões osmóticas num meio de cultura vegetal normal. Num meio de cultivo do tipo MS a adição de 3 % (p/v) sacarose e sem a dissociação do mesmo em monossacarídeos, é responsável por 1,5 % pelo potencial da água (GEORGE, 1993).

Desta maneira, um uso excessivo de sacarose ou outros açúcares podem atuar como inibidor de geração de raízes para explantes em função do potencial de água.

Umidade relativa (RH) é a medida da quantidade de vapor de água contida numa atmosfera gasosa. A umidade relativa (RH) da mistura gasosa (ar) acima do meio num frasco ou vidro, depende da temperatura do ar e do próprio meio. Quando a temperatura do ar se iguala ao do meio, estando o vidro ou frasco bem fechado, a umidade relativa teoricamente será da ordem de 98,0 % - 99,5 %. Considera-se que a umidade relativa, na maioria das culturas de tecidos vegetais, deve ficar na faixa de 99,25 a 99,75 %. Em meios de cultivo, a presença de um teor de umidade relativa alta dificulta a respiração dos explantes no próprio recipiente não ocorrendo à absorção dos nutrientes, especialmente o cálcio (GEORGE, 1993). Este efeito provoca um escurecimento dos explantes.

A maioria das espécies de plantas cultivadas *in vitro* tem, geralmente, a cutícula pouco desenvolvida, devido a alta umidade relativa (90 a 100%) que ocorre *in vitro*. As folhas das plantas *in vitro* são geralmente finas, tenras e fotossinteticamente pouco ativas; por isto, mal adaptadas às condições que irão encontrar na aclimação (PIERIK, 1990). Conhecendo as alterações morfológicas de plantas desenvolvidas *in vitro*, pode-se manipular o ambiente durante o enraizamento *in vitro* e a aclimação *ex vitro*.

O oxigênio é necessário para a iniciação e o crescimento das raízes. Estudos realizados por SOFFER e BURGER (1988, 1989), com aparelhos especiais, mostraram que tanto o número quanto o tamanho das raízes produzidas em *Chrysanthemum* eram diretamente relacionados com o oxigênio dissolvido no meio. Não houve crescimento de raízes quando a taxa de oxigênio dissolvido era nula. Estes resultados são de grande importância para a indução de raízes em microestacas, particularmente, para aquelas que precisam ser enraizadas em meios com ágar, onde a difusão restrita pode causar menor pressão parcial de oxigênio do que em um sistema líquido agitado, ou em um material poroso úmido com o meio líquido (GEORGE, 1993).

A maioria dos laboratórios quer evitar o processo de lavagem das plantas retiradas do

meio com ágar, quando estas forem aclimatizadas, pelo fato desse processo ser demorado. Por isso, têm-se buscado alternativas para enraizar microestacas em meios líquidos ou em suportes porosos. Melhor formação de raízes é obtida em sistemas de meio líquido móvel ao invés de meios geleificantes com ágar. Isto pode ser explicado pelo fato de que um sistema móvel tem mais oxigênio e menos CO<sub>2</sub> dissolvido (KUKREJA *et al.*, 1986). Infelizmente, quando microestacas são submersas em meios líquidos de enraizamento, uma alta proporção das plantas transferida para meio *ex vitro* morre, uma vez que se tornam hiperhídricas. Isso aconteceu com microestacas de macieira do cultivar Northern Spy enraizadas em meio líquido (KROMER, 1987; HUTCHINSON, 1984; 1985).

O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização do resíduo agro-industrial bagaço de cana-de-açúcar não tratado e tratado, com granulometria < 0,18 mm, em substituição ao ágar no meio de cultivo para a técnica de micropropagação vegetal na fase de enraizamento e sua posterior aclimatização.

### 3.2. Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Divisão de Biotecnologia Industrial do Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, e no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

O meio de cultura para etapa de multiplicação foi preparado com os sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). As vitaminas utilizadas foram: ácido nicotínico  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ; tiamina  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ; piridoxina HCL  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ; glicina  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  e mio-inositol  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ . O fitohormônio foi o BAP (benzilamino purina)  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , e a fonte de carbono sacarose  $30 \text{ g.L}^{-1}$  e Plant Agar<sup>®</sup>  $6 \text{ g.L}^{-1}$ . O meio foi completado até o volume desejado com água destilada. O pH foi ajustado para 5,8.

O meio líquido da etapa de enraizamento foi preparado com a metade da concentração dos sais MS. As vitaminas foram idem anterior. Como fito-regulador foi utilizado o AIB (ácido indolbútirico)  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  (marca DUCHEFA) e como fonte de carbono sacarose  $30 \text{ g.L}^{-1}$ . O meio foi complementado até o volume desejado com água destilada. O pH foi regulado para 5,8. O meio foi então esterilizado por 20 min a  $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $1,05 \text{ atm}$ .

Preparou-se um meio sólido, conforme descrito acima, com exceção que neste foi acrescentado  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar ("Plant Agar<sup>®</sup>", DUCHEFA<sup>®</sup>), servindo como controle do experimento. Após ser esterilizado em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 20 min a  $1,05 \text{ atm}$ , despejou-se uma quantidade de 40 ml do meio quente (líquido), em cada frasco de 200 mL.

O material cultivado *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' foi fornecido pelo Centro de Pesquisas de Clima Temperado - EMBRAPA; Pelotas - RS. Os brotos foram sub-cultivados em meio de multiplicação por aproximadamente 5 vezes. Dois meses depois da última transferência, brotos com um comprimento de 2,5 cm foram selecionados e deles foi retirado o excesso de folhas, deixando apenas quatro ou cinco. Para que os mesmos não sofressem um estresse hídrico maior, durante todo este procedimento. Foram parcialmente imersos em água esterilizada após o preparo e antes da repicagem para o meio de cultura.

Em cada frasco de cultivo 200 mL contendo 2 g do suporte, bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) com granulometria de 0,84 mm, preparado conforme descrito capítulo 2. Foram acrescentadas quantidades equivalentes a  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado (para a suposta adsorção dos compostos fenólicos restantes existentes no bagaço, uma vez que estes compostos são tidos como inibidores de crescimento) e mais 1 mL de KOH 0,1 N para regular

o pH próximo 5,8. Adicionou-se uma quantidade de 35 ml do meio de cultivo líquido. Cinco microestacas foram repicadas nos frascos, sendo uma no centro e quatro nas laterais. Uma quantidade de 10 frascos foi utilizada. Os frascos foram fechados com tampa plástica translúcida e fita PVC e incubados numa câmara de crescimento a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  sob luz fluorescente branca com densidade de fluxo de fótons de  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  por um período de 45 dias.

O mesmo foi feito com os suportes de granulometria entre 0,84 a 0,18mm; e menor que 0,18 mm. Durante um mês e meio, em períodos de 12, 20, 30, e 40 dias foram avaliados: o número e comprimento das raízes formadas e comprimento caulinar.

Os testes específicos foram idem aos pré-testes. Apenas as avaliações foram feitas aos 12, 18, 28 e 38 dias de cultura, e os parâmetros analisados foram: número e o comprimento de raízes formadas por planta, e comprimento caulinar.

Os testes específicos realizados com bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT) conforme descrito no capítulo 2 sobre o melhor granulometria nos pré-testes foram idem ao anterior.

Como controle foi utilizado o meio de cultura MS solidificado com  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ágar. No total foram utilizadas 50 microestacas. As avaliações foram idem aos testes específicos.

A atividade da água dos dois meios de cultivo foi determinada usando o equipamento Aqua Lab, CX-2. Os dados foram coletados em intervalos de dez dias, simultaneamente com a coleta dos dados da morfologia dos explantes.

A umidade relativa (RH) dos meios de cultura com o suporte a base de ágar e suporte alternativo, bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) foi determinada pelo método termogravimétrico ( $100\text{-}105^\circ\text{C}$ ), normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

Os explantes enraizados *in vitro*, com um tempo de 25 dias, a partir de ambos os suportes foram submetidos à aclimação em uma casa-de-vegetação com irrigação programada (intermitente) e com baixa luminosidade (com 40% de intensidade luz natural). A programação da irrigação foi da seguinte forma: das 8:00 -17:00 h a cada 30 min, 15 seg de irrigação; das 17:00-23:00 ha cada 1 h, 15 seg de irrigação e das 23:00-8:00 h a cada 3 h, 15 seg de irrigação. Os explantes originados a partir do suporte alternativo foram diretamente transferidos (com suporte e meio de cultivo). Os explantes originados do meio de ágar foram primeiramente retirados do ágar, lavados com água corrente e secos com papel toalha. Todos os explantes foram transferidos para bandejas de isopor de 128 células contendo como suportes comerciais Plantmax<sup>®</sup>/Vasomax<sup>®</sup> na proporção de 1:3. Foram observados: o tempo necessário para que os mesmos pudessem ser transferidos para lugar com maior intensidade de luz com irrigação manual, a formação do torrão, e a taxa de sobrevivência.

Nesta etapa foi feita uma comparação entre os custos ligados ao enraizamento *in vitro*, e a aclimação nos dois diferentes meios, o do suporte alternativo (bagaço de cana-de-açúcar, não tratado) e o meio comercial à base de ágar. Foram levados em conta, os seguintes componentes: meio de enraizamento, preparo do suporte do bagaço (coleta, seleção, lavagem, moagem, tratamento e secagem), lavagem e outros dos explantes originados a partir do meio de ágar, tempo de permanência na estufa de aclimatização, tempo de permanência na casa-de-vegetação, e os custos de mão-de-obra parcial. Os outros fatores ou os custos ligados à esterilização, aquecimento, iluminação da câmara de crescimento, preço do suporte para aclimação e demais equipamentos foram desprezados uma vez que os mesmos são iguais em ambos os suportes.

Para um melhor entendimento foram feitas planilhas de cálculo para cada meio de cultura.

### 3.3. Resultados e Discussão

#### 3.3.1. Efeito da Granulometria do Bagaço de Cana-de-Açúcar não tratado (BNT) no Processo de Enraizamento com Microestacas de Macieira ‘Marubakaido’

A tabela 6 mostra que a granulometria do suporte tem uma importância significativa no processo de enraizamento de microestacas de macieira. Quando se utilizou o suporte à base de bagaço de cana-de-açúcar com granulometria média de 0,84 mm, não foi possível obter o enraizamento das microestacas de macieira após 40 dias de cultura, embora se tenha constatado que não houve perda da umidade do suporte durante todo o período do experimento.

**TABELA 6 – EFEITO DA GRANULOMETRIA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE O ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE ‘MARUBAKAIDO’.**

Tempo (dias)	Granulometria de 0,84 mm			Granulometria de 0,84 a 0,18 mm			Granulometria < 0,18 mm		
	No. média de raízes *	Enraizamento (%)	Ressecamento do meio	No. média de raízes *	% de enraiz.	Ressecamento do meio	No. média de raízes*	Enraizamento (%)	Ressecamento do meio
12	0	0	+	0	0	+	5,3±0,12	100	+
20	0	0	+	0	0	+	8,1±0,31	100	+
30	0	0	+	4,2±0,3	40	+	12,2±0,11	100	-
40	0	0	+	7,1±0,2	50	+	30,4±0,09	100	-

+ = aspecto do suporte sem características de ressecamento; - = aspecto do suporte com características de ressecamento; \*média de 8 explantes ± desvio-padrão (microestacas)

Entretanto, quando utilizado uma fração com granulometria intermediária entre 0,84 e 0,18 mm, foi possível obter o enraizamento das microestacas de macieira após 30 dias de cultura, embora a percentagem de enraizamento das microestacas não tenha ultrapassado 50% até o final do experimento. Os melhores resultados de enraizamento das microestacas de macieira foram obtidos quando foi utilizado o suporte à base de bagaço da cana-de-açúcar com granulometria inferior a 0,18 mm. Com esta granulometria, 100% das microestacas começaram a enraizar em apenas 12 dias de cultura, e o número médio de raízes chegou a 5 por explante. Após 20, 30 e 40 dias de cultura chegou a 8, 12 e 30 por explante, respectivamente. Esse resultado é superior ao conseguido com os meios à base de bagaço da cana-de-açúcar, não tratado, com granulometria média de 0,84 mm e com granulometria intermediária entre (0,84 e 0,18 mm). Acredita-se que a presença da medula no suporte (parte interno do bagaço de cana-de-açúcar) tem grande importância na obtenção de melhores resultados. A medula tem como característica ser um material absorvente, portanto, quando o



meio de cultura líquido é adicionado ao suporte, a medula absorve lentamente o líquido até saturar o mesmo. Desta forma cria-se um meio semi-sólido reforçado com a presença de celulose e hemicelulose como parte adicional do suporte. Quanto menor forem as partículas, melhor o contato entre elas. Melhor a consistência e, conseqüentemente, melhor o meio semi-sólido. Isto explica porque o bagaço com granulometria inferior a 0,18 mm obteve o melhor resultado quando comparado com as duas outras granulometrias: a de 0,84 mm e a intermediária de 0,84 mm a 0,18mm. Desta maneira, os nutrientes (íons minerais), reguladores de crescimento e vitaminas são facilmente absorvidos pelas microestacas ou pelo explante, o que tem por conseqüência um melhor crescimento e enraizamento. Com este argumento formulado pode ser resolvido o problema de difusão reduzida suposto por FAYE *et al.* (1986) e outros problemas causados pela dureza do meio de cultivo indicado por DEBERGH (1982).

O meio de cultura não secou completamente durante todo o período de teste, o que indica que as plantas podem estar com uma umidade suficiente para indução e alongamento de raízes como o crescimento do explante durante o cultivo (veja tabela 6). Os sinais '+' e '-' indicam a situação de umidade elevada e baixa, respectivamente, dentro do recipiente e no suporte *in vitro*. A umidade relativa (RH) do meio (interior do frasco) até o período de 30 dias deve ser em torno de 99,0 %, usando o método de estimativa mencionado por GEORGE, (1993). A umidade foi observada apenas visualmente para determinar por quanto tempo o meio teria condições de fornecer uma umidade suficiente para o crescimento do material vegetal.

### **3.3.2. Estudos específicos de enraizamento em Suporte à base de bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) e tratado (BT) em relação ao suporte comercial à base de ágar.**

Os testes comparativos sobre a quantidade de raízes formadas em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar (suporte alternativo) e em meio com suporte normal à base de ágar são apresentados na tabela 7.

O bagaço de cana-de-açúcar tanto não tratado (BNT) como tratado (BT) com granulometria inferior a 0,18 mm propiciaram um bom desempenho quanto à formação de raízes. Mas houve só uma diferença significativa (8,66%) entre o bagaço tratado e não tratado até o período de 38 dias. Após 12 dias de cultivo foi possível observar uma diferença extremamente elevada entre os dois suportes. Essa superioridade foi da ordem de 93,4 % em favor do suporte alternativo à base de bagaço de cana-de-açúcar (BNT), mas a melhor diferença foi com o bagaço tratado (BT) comparado ao meio com ágar. A diferença

extremamente elevada entre os dois suportes pode ser explicada pela fácil difusão do AIB uma auxina sintética capaz de iniciar a divisão celular e a promoção de raízes (CHATURVEDI *et al.*, 1978; SHARMA *et al.*, 1981). A ação das auxinas e as suas conseqüências devem ser melhores no meio com o bagaço tratado (BT), porque no meio com o bagaço não tratado foi demonstrado a existência de compostos fenólicos conforme item 2.3 anterior, onde estes compostos são inibidores de crescimento em certas quantidades limites (GEORGE, 1993; ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990), com isso, limitando a ação da auxina disponível. Uma vez feito um tratamento adequado, conforme item 2.3., são reduzidas as quantidades destes compostos e assim são reduzidos os efeitos de inibição no cultivo dos tecidos vegetais *in vitro*.

**TABELA 7 – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE CANA NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT) (Granulometria < 0,18mm) QUANTO À FORMAÇÃO DE RAÍZES COM MICROESTACAS DE PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’**

Tempo (dias)	No. médio de raízes*	No. médio de raízes*		Diferença em relação à média* (%),		
	Ágar (Plant Agar®)	BNT	BT	Ágar-BNT	Ágar-BT	BNT-BT
12	2,13 ± 0,18	4,13 ± 0,30	4,20 ± 0,11	93,42	97,18	1,69
18	7,00 ± 0,46	10,00 ± 1,22	12,00 ± 0,20	42,81	71,43	25,00
28	9,00 ± 0,70	14,60 ± 0,70	18,50 ± 0,10	62,23	105,55	26,71
38	15,25 ± 1,57	25,40 ± 1,60	27,60 ± 0,90	66,52	66,56	8,66

\*média de 8 plantas ± desvio-padrão.

Segundo HAISSIG (1986) e COLLET (1988), a presença da auxina é especialmente necessária para a indução de raízes, o que ocorre algumas horas após a aplicação da mesma. Durante os primeiros 12 dias, o contato do meio contendo AIB com a parte das microestacas é total. Os primeiros dias correspondem à fase de indução do enraizamento. Conforme foi possível observar em nossos estudos, a natureza do suporte à base de bagaço de cana-de-açúcar propicia à planta uma melhor oxigenação através de um meio com estrutura porosa, o que induz um aumento no número de raízes, já que a presença de oxigênio dissolvido no meio de cultivo é de grande importância na fase de indução, conforme descrito por SOFFER e BURGER (1988; 1989). O mesmo processo não ocorre no meio solidificado à base de ágar, onde a taxa de oxigênio dissolvido é bem inferior.

Foi observado também que a diferença dos números médios de enraizamento entre os dois meios: ágar e bagaço tratado, foi melhor (105,55%) em 28 dias de cultura das microestacas, porém os resultados tornaram-se semelhantes ao meio com bagaço não tratado

(66,58%) após 38 dias de cultivo.

Uma vez determinada a capacidade de formação, indução, organização de raízes, inicia-se a fase de alongamento das mesmas, onde as partes visíveis aparecem (MONCOUSIN, 1986). Nesta fase de alongamento das raízes, a presença de oxigênio dissolvido no meio de cultivo é igualmente de grande importância, conforme estudos relatados por SOFFER e BURGER (1988, 1989).

A tabela 8 apresenta a comparação entre o meio de enraizamento alternativo à base de bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT), tratado (BT) e o meio convencional à base de ágar em relação ao comprimento das raízes durante o cultivo das microestacas de macieira. Observa-se que, no caso do comprimento das raízes nos meios de enraizamento alternativos à base de bagaço de cana-de-açúcar não tratada e tratada mostrou ser mais promissor e eficiente que o meio convencional à base de ágar. O comprimento das raízes foi ligeiramente superior no bagaço de cana-de-açúcar não tratado nos primeiros 12 dias de cultivo (4,62%), porém essa diferença entre os dois meios foi significativa após 28 dias de cultura, passando a ser 43,56% superior no meio alternativo em comparação com o meio à base de ágar. Porém, melhores resultados foram obtidos a partir do bagaço tratado (BT), nos primeiros 12 dias de cultivo (50,00%) em relação à média e permaneceu melhor ainda durante o período de 28 dias (122,77%) de cultivo. Ao final do experimento de 38 dias, a diferença no comprimento das raízes foi superior no meio alternativo à base de bagaço de cana-de-açúcar, onde o bagaço não tratado foi de 29,64% e do bagaço tratado foi de 51,07%.

**TABELA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE CANA NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT) (Granulometria < 0,18mm) QUANTO AO COMPRIMENTO DAS RAÍZES DE MICROESTACAS DA PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’**

Tempo (dias)	Comprimento: média de raízes* (cm)			Diferença em relação à média* (%)		
	Ágar (Plant Agar®)	BNT	BT	Ágar-BNT	Ágar-BT	BNT-BT
12	0,21± 0,03	0,31± 0,06	0,42± 0,02	4,62	50,00	35,48
18	0,59± 0,15	0,78± 0,17	0,85± 0,10	32,20	44,07	8,97
28	1,01± 0,08	1,45± 0,12	2,25± 0,20	43,56	122,77	55,17
38	2,80± 0,45	3,63± 0,36	4,23± 0,06	29,64	51,07	16,57

\*média de 8 plantas ± desvio-padrão.

Quando foram comparados os resultados entre os dois meios de suporte alternativo, bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) e tratado (BT), também foram observadas diferenças significativas, conforme mostra a tabela 8. No primeiro período de 12 dias a

diferença foi de 35,4% e chegando ao um valor mais alto de 55,17% no período de 28 dias de cultivo, depois mostrou um decréscimo no período de 38 dias.

Os estudos sobre a evolução do comprimento caulinar nos dois meios de enraizamento estão apresentados na tabela 9. Novamente nesse estudo, o meio alternativo de enraizamento mostrou ser mais eficiente quando comparado com o meio tradicional à base de ágar. Os resultados são relativamente semelhantes aos da evolução do comprimento das raízes (tabela 8). Nos primeiros dias de cultura, a diferença entre os dois meios: ágar e bagaço não tratado (BNT), não foi muito expressiva, porém, se acentua bastante após 18 dias de cultura, atingindo um comprimento caulinar médio superior de 19,93% quando comparado ao meio convencional à base de ágar. Mas nas mesmas condições a diferença entre os dois meios, ágar e bagaço tratado (BT), foram melhores, 8,24% para o período de 12 dias e chegando a um valor máximo de 54,11% no período de 28 dias de cultivo. Essa superioridade dos meios alternativos à base de bagaço de cana-de-açúcar, não tratado (BNT) e tratado (BT), se deve provavelmente ao número superior de raízes obtido neste meio, portanto, a absorção de nutrientes pela planta demonstra ser mais eficiente, induzindo, assim, uma atividade metabólica superior, tendo como resposta um melhor crescimento caulinar quando comparado com as plantas cultivadas em suporte à base de ágar.

No meio de suporte à base de ágar deve ocorrer problemas relacionados com os fenômenos de difusão dos nutrientes (ROMBERGER e TABOR, 1971), imobilização de invertase (FAYE *et al.*, 1986) e dureza do gel (DEBERGH, 1982). Acredita-se que estes fenômenos não são tão problemáticos no meio alternativo à base de bagaço de cana-de-açúcar.

**TABELA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE CANA NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT) (Granulometria < 0,18mm) QUANTO AO COMPRIMENTO CAULINAR DAS MICROESTACAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’**

Tempo (dias)	Comp. médio, Ágar	Comp. médio*, Sup. alternativo		Diferença em relação à média* (%)		
	Ágar (Plant Agar®)	BNT	BT	Ágar-BNT	Ágar-BT	BNT-BT
12	2,69± 0,04	2,79± 0,04	2,92± 0,01	3,71	8,24	3,94
18	3,11± 0,12	3,73± 0,19	4,62± 0,09	19,93	48,55	23,86
28	3,40± 0,10	4,04± 0,10	5,24± 0,11	18,82	54,11	28,70
38	3,90± 0,08	4,58± 0,10	5,68± 0,02	17,44	31,33	38,86

\*média de 8 plantas ± desvio-padrão.

Comparando os resultados obtidos (tabela 9), quanto ao comprimento caulinar, entre os dois meios: bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) e tratado (BT), o meio com

bagaço tratado sempre mostrou ser superior e de ordem crescente de 3,94% para 38,86% respectivamente aos períodos de cultivo de 12 a 38 dias. Essa superioridade se deve provavelmente à presença de baixo nível dos compostos fenólicos no bagaço tratado (BT), conforme citado anteriormente. Com uma boa oxigenação e baixo nível de compostos inibidores de crescimento, o explante sempre terá máximo rendimento de crescimento e assim superando os resultados obtidos a partir do bagaço não tratado.

Outro fator importante a ser considerado no meio alternativo à base de bagaço de cana-de-açúcar tratado foi que: as mudas também não apresentaram sinais de hiperhidricidade, já que este fenômeno ocorre geralmente nos meios de cultivo líquido, conforme descrito por KROMER, (1987) e HUTCHINSON, (1984, 1985).

As percentagens de enraizamento nos três diferentes meios são apresentadas na tabela 10. Observou-se que no primeiro período de cultivo (12 dias) a percentagem de enraizamento no meio a base do bagaço tratado (BT) foi muito superior que os meios à base de ágar (50%) e do bagaço não tratado (BNT) (50%) e manteve a sua superioridade (100%) até o período de 38 dias. No meio à base de ágar, os explantes não chegaram a enraizar totalmente (75%), ocorrendo o contrário que nos dois outros meios (100%) com suporte alternativo à base de bagaço de cana-de-açúcar, não tratado (BNT) e tratado (BT) até o tempo de cultivo de 38 dias.

**TABELA 10** – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO À BASE DE ÁGAR E O MEIO SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT) COM GRANULOMETRIA < 0,18 MM, QUANTO A PERCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO COM MICROESTACAS DA PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’.

Tempo (dias)	Plant Agar	Suporte: bagaço de cana-de-açúcar	
	% de enraizamento, Ágar	% de enraizamento, BNT	% de enraizamento, BT
12	50,00	50,00	75,00
18	62,50	62,50	100,00
28	75,00	100,00	100,00
38	75,00	100,00	100,00

\*média de 8 plantas.

Primeiramente, um retardo no enraizamento pode ser causado pela própria característica geral dos tecidos (explantes ou meristemas) das variedades de macieira, como por exemplo: a liberação de compostos fenólicos a partir dos tecidos no momento de corte e estes últimos fornecerem uma estrutura bastante rígida. Mas a obtenção de uma percentagem de enraizamento maior no meio à base de bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) deve

ser proporcionado pela propriedade porosa do suporte, circulando muito mais oxigênio pelo meio, o qual é essencial na formação e alongamento das raízes conforme relatado por SOFFER e BURGER (1988, 1989). Quando utilizado o bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT), a percentagem de enraizamento foi superior, não só devido à presença de menos compostos inibidores (fenólicos) de crescimento celular no meio à base do bagaço tratado (GEORGE, 1993; ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990). Este foi também o motivo de uma alta percentagem de enraizamento (100%) em menor tempo de cultivo (18 dias), antecipando em 20 dias o enraizamento alcançado por suporte de cultivo de ágar.

### 3.3.3. Umidade Relativa (RH) e Atividade de Água (Qw)

A tabela 11 apresenta os dados sobre a umidade relativa (RH) e a atividade de água (Qw) determinada a partir dos meios, semi-sólido (ágar) e suporte (alternativo) não tratado (BNT) e tratado (BT), durante o enraizamento de explantes de macieira ‘Marubakaido’. Foi observado que com o aumento do tempo de cultivo, a umidade relativa nos meios de suporte à base de bagaço de cana-de-açúcar, não tratado (BNT) e tratado (BT), diminuíram de 99,4 e 99,6% para 49,9 e 49,6 %, respectivamente em 38 dias quando comparado ao meio com ágar, onde a queda da umidade é desprezivelmente menor. Isso ocorre devido à fácil circulação do ar pelo meio poroso e a evaporação do meio à temperatura de cultivo, a qual oscilava em torno de  $24 \pm 2$  °C foi acelerado. Este fenômeno também demonstra que há uma boa oxigenação dentro do sistema, a qual pode beneficiar em muito o processo de enraizamento das explantes. Porém, em análise feita por cada período de 10 dias, a queda foi bem menor. Este fenômeno pode ser considerado ótimo, uma vez que na fase inicial de indução e alongamento das raízes uma umidade elevada é necessária. A queda da umidade relativa gradativamente está eliminando um fenômeno muito importante conforme relatado por PIERIK (1990), que revela que as folhas das plantas *in vitro* são geralmente finas, tenras e fotossinteticamente pouco ativas; por isto, mal adaptadas às condições que irão encontrar na aclimatização, ou em outras palavras: o enraizamento *in vitro* em meio à base do suporte de cana-de-açúcar, não tratado e tratado, está pré-aclimatizando os explantes. O meio com ágar não apresentou muita perda de umidade porque um dos principais características do ágar é de proteger o meio da desidratação. Este fenômeno demonstra que há uma boa oxigenação dentro do sistema, a qual pode beneficiar em muito o processo de enraizamento dos explantes.

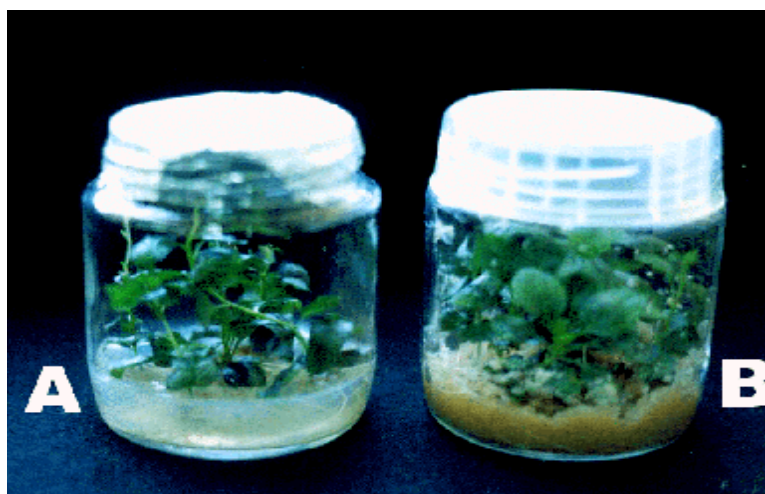
**TABELA 11** – APRESENTAÇÃO DE UMIDADE RELATIVA (RH) E ATIVIDADE DE ÁGUA (Qw) NOS TRÊS DIFERENTES MEIOS: A BASE DE ÁGAR, SUPORTE ALTERNATIVO (BNT) E (BT) DETERMINADOS DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* E ACLMATIZAÇÃO DE MACIEIRA.

Tempo (dias)	Umidade Relativa (%)			Atividade de Água-Qw			Temperatura (°C)
	Ágar	BNT	BT	Ágar	BNT	BT	
12	98,9	99,4	99,6	0,977	0,974	0,976	27,3
18	98,1	90,6	90,4	0,973	0,971	0,969	23,4
28	94,4	65,8	65,6	0,953	0,963	0,962	24,4
38	93,2	49,4	49,6	0,979	0,954	0,956	25,1

\*média de 8 medidas.

A partir dos dados da tabela 11 da atividade de água (Qw) observou-se novamente que não houve mudança significativa entre os três tipos de suporte durante o tempo de cultivo. A atividade só mudou em relação à temperatura de determinação. Pode-se afirmar que, a atividade da água não influenciou significativamente os resultados de enraizamento e de aclimação em todos os meios para a enraizamento *in vitro* das explantes. A figura 16, mostra a comparação das plantas enraizadas em dois meios com diferentes suportes, à base de ágar e à base de bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT).

**FIGURA 16** – COMPARAÇÃO DAS PLANTAS DE MACIEIRA ENRAIZADAS NO MEIO COM ÁGAR (A) E NO MEIO ALTERNATIVO: BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO, GRANULOMETRIA < 0,18 MM (B) APÓS 38 DIAS *IN VITRO*.



**FIGURA 17** – VISUALIZAÇÃO DAS RAÍZES DE MACIEIRA OBTIDAS NO MEIO COM ÁGAR (A) E NO MEIO ALTERNATIVO À BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, GRANULOMETRIA < 0,18 MM (B), APÓS 38 DIAS *IN VITRO*.



A figura 17 mostra as raízes formadas nos dois diferentes meios pelo fundo dos frascos. Observamos que no meio à base de bagaço de cana-de-açúcar não tratado (figura 17B) forma um número de raízes bem mais expressivo e denso que o meio à base de ágar (figura 17A).

### 3.3.4. Estudo Econômico Comparativo entre os Três meios de Enraizamento Utilizados

Na tabela 12 são apresentados os preços e os custos calculados (estimados) à base de 1000 plantas enraizadas e aclimatizadas nos meios com suporte à base de ágar (comercial) e suporte à base de BNT e BT.

**TABELA 12** - APRESENTAÇÃO DOS CUSTOS ESTIMADOS PARA ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE MACIEIRA À BASE DE 1000 EXPLANTES NOS MEIOS COM DIFERENTES SUPORTES (ÁGAR, BNT, BT) EM REAIS (R\$).(CÁLCULO CONFORME PLANILHA 1 E 2 EM ANEXO I)

Base de cálculo: 1000 plantas	Custo a base de Ágar	Custo a base de BNT	Custo a base de BT	Redução em relação a Ágar	
				% BNT	% BT
Enraizamento	259,20	200,36	220,36	29,36	17,63
Aclimatização	----	----	-----	37,00	44,00
<b>Redução Total Real %</b>				<b>16,20</b>	<b>14,09</b>



Pelos resultados apresentados na tabela 12 e os cálculos obtidos conforme as planilhas 1 e 2 do anexo I sobre os suportes de bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) e tratado (BT) com granulometria  $< 0,18$  mm, obteve-se uma redução nos custos de 29,36 e 17,63%, respectivamente para cada 1000 explantes enraizadas comparando ao meio de enraizamento comercial à base de ágar. O custo do processo de enraizamento em meio com bagaço tratado é mais elevado (R\$ 220,36) que o bagaço não tratado (R\$ 200,36), porque os custos na parte do tratamento encarecem no cálculo parcial do processo. Quando levados em conta na fase de aclimação (taxa de sobrevivência, o tempo de permanência em casa-de-vegetação, a eletricidade (aquecimento e resfriamento), a irrigação (automático e manual), a mão de obra, o tempo de transferência de *in vitro* para *ex vitro*, o tempo de formação de torrão, a qualidade, entre outros) foi obtido uma redução de 37,00 e 44,00% utilizando suportes de bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) e tratado (BT) com granulometria  $< 0,18$  mm, respectivamente. O ganho na redução dos custos com o bagaço tratado foi um pouco superior, porque na fase de aclimação as partes que compõem a planilha de cálculo de custo tiveram melhores desempenhos do que os suportes em ágar e bagaço não tratado (BNT), por exemplo, consumo de energia e consumo de água para manutenção de temperatura e irrigação (veja planilha 1 e 2 no Anexo I).

### **3.4. Conclusões**

Dentre os suportes alternativos avaliados em relação ao tamanho das partículas, foi escolhido como melhor material o bagaço de cana-de-açúcar moído não tratado (BNT) com granulometria inferior a 0,18 mm.

Os custos foram reduzidos em 29,36 e 17,63% relacionados ao de enraizamento das microestacas obtidas utilizando suportes alternativos à base de bagaço de cana-de-açúcar não tratado e tratado, respectivamente. E, a parcela referente a aclimatização foi reduzida em 37,00 e 44,00%, respectivamente.

Quanto às respostas fisiológicas das plantas, em meio de enraizamento os suportes à base de bagaço de cana-de-açúcar sempre apresentaram o melhor desempenho quando comparados ao meio à base de ágar, inclusive superando este último por não apresentar efeitos de vitrificação após 48 dias de cultivo.

## Referências

- CHATURVEDI, H.C., SHARMA, A.K.; PRASAD, R.N.. Shoot apex culture of *Bougainvillea glabra* 'Magnifica'. Hortscience, v.13, n.1, p.36, 1978.
- CHENG, T.Y.; VOQUI, T.H. Regeneration of Douglas fir plantlets through tissue culture. Science, v.198, p.306-307, 1977.
- COLLET, G.F. Improvement to induce rooting of fruit trees *in vitro*. Acta Hort., n.227, p.318-323, 1988.
- DEBERGH P. Physical properties of culture media. In: International congress plant tissue culture, 5<sup>th</sup>, 1982, Tokyo-Japan. Anals...Tokyo-Japan: Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, 1981. p.135-136.
- DEBERGH, P.C. AND MAENE, L.J. Stimulation of axillary shoot development of *Cordyline terminalis* 'Celestine Queen' by foliar sprays of 6-benzylamino purine. Hort Science, v.17, n.3, p.344-345, 1982.
- FAYE, M.; DAVID, A. & ALAMANT, A. Nitrate reduce activity and nitrate accumulation in *in vitro* produced auxiliary shoots, plantlets and seedlings of *Pinus pinaster*. Plant Cell Rep., v.5, p.368-371, 1986.
- GEORGE, E.F. In: Plant propagation by tissue culture, Part 1- The Technology. Edington: Exegetics Limited. p.274-382, 1993.
- HAISSIG, B.E. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In: Jackson M.B. (ed.). New root formation in plants and cuttings. The Netherlands: Dordrecht. 1986, p.141-189.
- HUTCHINSON, J.F. Micropropagation of Northern Spy apple rootstock. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc., v.34, p.38-48, 1985.
- HUTCHINSON J.F. *In vitro* propagation of *Dionaea muscipula* Ellis (Venus Fly trap). Scientia Hort., v.22, p.189-194, 1984.
- Instituto Adolfo Lutz (IAL). Métodos químicos e físicos para análise de alimentos normais. Normas analíticas de Instituto Adolfo Lutz, p.189-192; p.195-196, São Paulo, 1985.
- KROMER, K. Hardening and rooting of M.7 apple rootstock cultures. p. 119-122 in Ducaté *et al.* (eds.) 1987 (q.v.).
- KUKREJA A.K., MATHUR A.K. & ASHUDA P.S. Morphogenic potencial of foliar explants in *Duosisia myoporoides* R. Br. (Solanaceae). Plant Cell Rep., 5, 27-30, 1986.
- ICIDCA-GEPLACEA-PNUD. In: Manual de los derivados de la cana de azucar. Bagazo. (eds). Cuban Institute of Research on Sugarcane, Mexico, 1990. p.62.
- MOHAN, R.; OKAMOTO, G.T.; QUOIRIN, M.G.; SOCCOL, C.R. Estudo de um novo suporte para enraizamento de micro-estacas *in vitro*. In: *ENCONTRO REGIONAL SUL DE*

CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTO, IX, 2001, CuritAIB. 9º EVINCI. CuritAIB: Universidade Federal do Paraná, 2001. p.103.

MOHAN, R.; SOCCOL, C.R.; QUOIRIN, M.G.; PANDEY, A. Use of sugarcane bagasse as an alternative low cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, Oxon, v. 40, n. 4, p. 408-411, July-August. 2004.

MONCOUSIN, Ch. Biochemical events in mono-nodal stem cuttings of *Vitis* hybrid during *in vitro* adventitious rooting. In: International congress plant tissue culture, 6<sup>th</sup>, 1986, Minneapolis. Anal... Minneapolis: Internat. Assoc. Plant Tiss. Cult., 1986. p.148.

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

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., LEON, J.A.R.; NIGAM, P. Solid-state Fermentation in Biotechnology. Asistech Publishers. p.29-31, 2001.

PIERIK, R.L.M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madri: Mundi-Prensa, 1990. 326p.

ROMBERGER, J.A. & TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. *Am. J. Bot.* 58, p.131-140, 1971.

SHARMA, A.K.; PRASAD, R.N.; CHATERVEDI, H.C. Clonal propagation of *Bougainvillea glabra* Magnifica through shoot apex culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 1, p.33-38, 1981.

SOFFER, H.; BURGER, D.W. Studies on plant propagation using the aero-hydroponic method. *Acta Hort.*, v.230, p.261-269, 1988.

SOFFER, H.; BURGER, D.W. Plant propagation using the aero-hydroponic systems. *Hort. Science*, v.24, p.154, 1989.

TANAKA, M.; HIRANO, T.; GOI, M.; HIGASHIURA, T.; SASAHARA, H.; MURASALI, K. Practical application of a novel disposable film culture vessel in micropropagation. *Acta Hort.*, v.300, p.77-84, 1991.

#### **4. ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE MORANGUEIRO ‘CAMAROSA E ‘DOVER’ EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO (BT) MISTURADO COM BAGAÇO DE MANDIOCA E ACLIMATAÇÃO DAS PLÂNTULAS.**

**Resumo:** A elevada demanda de mudas com boas qualidades e de baixo custo, associada ao conhecimento de micropropagação vegetal, exige estudos na busca de tecnologias alternativas para a produção de mudas em escala comercial. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização do resíduo agro-industrial bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT) misturado com bagaço de mandioca com granulometria  $< 0,18$  mm em substituição ao ágar no meio de cultivo para o enraizamento de brotações e posterior aclimação de plântulas de morangueiro cultivares Camarosa e Dover. Os ensaios foram realizados utilizando sais do meio MS com metade da concentração, sacarose 3%, AIB  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . Quando avaliados os números e o comprimento das raízes, assim como as alturas de cada planta após 28 dias de cultivo, obtiveram-se desempenhos superiores da ordem de 85,71; 54,04% em relação ao número de raízes formadas, 15,09; 11,02% para o tamanho das raízes e 11,65; 12,00% para a altura das plântulas, respectivamente para ‘Camarosa’ e ‘Dover’, comparado ao meio com suporte à base de ágar. A redução do custo de enraizamento ficou em torno de 43,36% e na parte de aclimação ficou em 43,00% comparado ao meio com suporte à base de ágar.

Palavras-chave: *micropropagação, custo de clonagem, suporte alternativos, resíduos industriais.*

#### **Rooting of Strawberry buds cultivars ‘Camarosa’ and ‘Dover’ and acclimatization of the explants in treated sugarcane bagasse (BT) mixed with cassava bagasse**

**Abstract:** Due to the high demand of resistant plant materials in short time with good qualities and low costs, new resources on the agronomical interests associated to plant micropropagation techniques should be established studies searching for alternative technologies. Any attempt to achieve those objectives should be appreciated as alternative or parallel techniques. The objective of this study was to evaluate the utilization of treated agro-industrial residue ‘sugarcane bagasse’ mixed with ‘cassava bagasse’ with particles of  $< 0.18$  mm as substitution to the agar gelling component in the plant micropropagation techniques on the rooting step and their posterior acclimatization with strawberry buds, cultivars ‘Camarosa’ and ‘Dover’. The experiments were realized utilizing MS salts (half force), sucrose 3%, AIB  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ . When the number and length of the roots, as well the length of each explant after 28 days of cultivation were evaluated, superior performance in the order of 85.71; 54.04% related to the number of roots formed, 15.09; 11.02% related to the length of the roots and 11.65; 12.00% related to the explants length were achieved, respectively for cv. ‘Camarosa’ and ‘Dover’, compared to the medium supported with agar. The costs reduction related to the rooting step was around the 43.36% and on the acclimatization step 43.00% compared to the medium gelled with agar.

Keywords: *micropropagation, cloning cost, alternative support, industrial residues.*

#### 4.1 Introdução

O morangueiro ‘Dover’ possui uma alta produtividade, frutos firmes de boa conservação pós-colheita, sendo adequado para mercados distantes das áreas de produção, também apresenta tolerância a fungos de solo e tornou-se, nos últimos anos, o cultivar mais plantado no Brasil. Já o ‘Camarosa’ possui frutos grandes, firmes e de bom sabor, coloração interna vermelho intensa e precoce. Resistente ao transporte e sensível a fungos de solo (Multiplanta Empresa de Biotecnologia Vegetal, 2004).

No Brasil, o estado de São Paulo lidera a produção de morangos (31.266 toneladas em 816 há em 1991). Cerca de 70% da produção é comercializada in natura e o restante para industrialização. O custo de produção chega a R\$ 30.000,00/ha e cerca de 40% refere-se à colheita e embalagem (Ministério de Agricultura, 2004).

O morango é uma cultura bastante suscetível às doenças que atacam o sistema radicial e rizoma, ocasionadas por patógenos de solo. Nas mudas frescas de raízes nuas, oriundas de cultivo convencional é um grande agente disseminador dos organismos patogênicos (fungos e bactérias), que podem sobreviver no solo por longos períodos e infectar novos plantios (Ministério de Agricultura, 2004).

O cultivo *in vitro*, em especial a cultura de meristemas, pode resultar na multiplicação mais eficiente, com obtenção de materiais de melhor qualidade (MINAMI, 1991). Uma das fases mais críticas na micropropagação de morangueiro, e na maioria das espécies vegetais, é a transição do meio heterotrófico para o autotrófico (DESJARDINS *et al.*, 1987). A obtenção de alta taxa de sobrevivência em plantas aclimatizadas, depende do correto tratamento providenciado durante o processo da transição *in vitro* para *in vivo*.

O crescimento de plantas em meio solidificado é, geralmente, mais lento do que em meio de cultura líquido. O crescimento em géis duros é, conseqüentemente, inibido, mas a morfogênese pode ser melhorada quando as explantes são mantidas em meio suplementado com ágar (GEORGE, 1993). Outra opção de suporte, o bagaço de cana-de-açúcar, apresentou excelente resultado quando empregado como um suporte alternativo na fase de enraizamento do porta-enxertos de macieira ‘Marubakaido’ (MOHAN *et al.*, 2001; MOHAN *et al.*, 2004).

Outros resíduos agro-industriais, como por exemplo, o bagaço de mandioca, também sejam testados como alternativos ao ágar nas técnicas de micropropagação vegetal.

Os resíduos obtidos na industrialização da mandioca podem converter-se em subprodutos de valor agregado e destinar-se às rações para a pecuária em geral, ricas em amido e fibras. O bagaço de mandioca é resíduo sólido composto pelo material fibroso da

raiz, contendo parte da fécula que não foi possível extrair no processamento (MOTTA, 1985). A sua composição físico-química bastante variável é mostrada na tabela 13.

**TABELA 13 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DE MANDIOCA**

Composição	SOCCOL	CEREDA	KOLICHESKI	STERTZ	VANDENBERGHE
Umidade	5,02	9,52	8,96	10,70	9,51
Proteína	1,57	0,32	1,61	1,6	0,24
Lípidos	1,06	0,83	0,93	0,53	0,53
Fibras	50,55	14,88	13,95	22,20	22,20
Cinzas	1,10	0,66	1,44	1,50	0,65
Carboidratos	40,50	63,85	48,60	63,40	67,54

FONTE: MACHADO, 2002.

O bagaço da mandioca não contém ácido cianídrico, apesar disso seu baixo teor protéico o torna inadequado para utilização em ração animal. Por outro lado, devido a sua baixa concentração de cinzas e alto teor de carboidratos, este resíduo torna-se um material interessante como suporte para processos biotecnológicos, especialmente para a conversão do amido presente em açúcares fermentáveis por meio de microorganismos. Também poderá ser usado como suporte alternativo natural e de nutrição em técnicas de micropropagação.

O ágar tem sido, tradicionalmente, usado como agente geleificante para cultura de tecidos, e é largamente explorado para a preparação de meio de cultura semi-sólido. É usado por suas vantagens para formar um gel líquido com água a 100°C e de solidificar a uma temperatura cerca de 45°C (GEORGE, 1993).

O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização do resíduo agro-industrial: bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT) misturado com bagaço de mandioca com granulometria < 0,18 mm em substituição ao ágar no meio de cultivo para o enraizamento de brotações de Morangueiro cultivares 'Camarosa' e 'Dover' e sua posterior aclimatização.

## 4.2. Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Divisão de Biotecnologia Industrial (DBI) do Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, e no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Para a multiplicação, os explantes foram obtidos pelo isolamento de ápices caulinares, previamente submetidos a desinfestação microbiana, nos frascos contendo meio de multiplicação. Para o enraizamento, os brotos com comprimento inicial de  $\pm 2,5$  cm (ápos cerca 2 meses de cultivo) foram repicados nos frascos usando os meristemas que passaram pela micropropagação (cinco explantes por frasco).

O meio à base de ágar foi formulado com a seguinte composição: metade de concentração de sais do MS, ácido nicotínico  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ; tiamina  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ; piridoxina  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ; glicina  $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ; inositol  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ; sacarose  $30 \text{ g.L}^{-1}$  e Plant Agar<sup>®</sup>  $6 \text{ g.L}^{-1}$  para a solidificação do meio e BAP  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (FRIES, 1960; NEMETH, 1981; BOXUS e TERZI, 1988). A preparação do meio de enraizamento líquido para os testes frente ao suporte alternativo diferenciou do meio de multiplicação para a produção de explantes em três aspectos fundamentais: ausência de ágar, substituição do BAP  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  por AIB  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  e sacarose de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  para  $15 \text{ g.L}^{-1}$ .

Todos os meios de cultivo com ágar ou sem, tiveram o seu pH ajustados para 5,80, com o detalhe que no meio com ágar esse ajuste ocorreu antes da adição sua de ágar. Os frascos de cultivo *in vitro* e os meios de cultivo foram submetidos à esterilização em autoclave (pressão de  $1,05 \text{ kgf/cm}^2$  e temperatura de  $121^\circ\text{C}$ ) durante 20 min. Os frascos contendo a mistura dos suportes tratados também foram esterilizados. Em cada frasco foram adicionados aproximadamente 35,70 mL de meio de cultura. As condições de cultivo para todos os experimentos foram iguais: temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e sob fotoperíodo de dezesseis horas na presença de luz tipo branca (fluorescente), densidade fluxo de fótons de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

Para testar a melhor proporção entre os dois suportes (bagaço de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar), foi realizado experimento com diferentes proporções e feita a comparação entre os resultados obtidos. As proporções entre bagaço de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar foram testadas 20:80, 30:70, 40:60 e 50:50 (v/v). Em cada frasco de cultura foram adicionadas 2 gramas da mistura. Foi também realizado experimento igual com bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) com partículas  $< 0,18 \text{ mm}$ .



Para o bagaço de mandioca não foi utilizado nenhum tratamento prévio. Apenas os grãos maiores foram refinados e classificados. A granulometria utilizada foi a mesma do bagaço de cana-de-açúcar (< 0,18 mm). Este suporte foi utilizado como um material de suplementação (enchimento) ao volume final no frasco de cultivo e de auxiliar na formação de um suporte-gel poroso nos experimentos de enraizamento com os cultivares de morangueiro.

Em cada frasco de cultivo de 200 mL foram adicionados 2 g da mistura de bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de mandioca, seguidos pela adição de 0,05 mg ( $1,67 \text{ g.L}^{-1}$ ) de carvão ativado (para a eventual adsorção dos compostos fenólicos ainda existentes no suporte alternativo, uma vez que estes compostos são tidos como inibidores de crescimento) e mais 1 mL de KOH 0,1 N (solução alcalina para regular o pH próximo 5,8). Após a autoclavagem, cada frasco recebeu 30 ml do meio de enraizamento MS (metade da concentração) que foi adicionado aos 2 g de suporte alternativo (bagaço de cana-de-açúcar e mandioca) usado em substituição ao ágar. Os cultivares de morangueiro utilizados foram: Dover e Camarosa. Para cada tratamento foram utilizados 10 frascos com 5 explantes. Os experimentos foram repetidos 2 vezes. Após 40 dias o experimento foi avaliado pelo crescimento das plantas e formação de raízes.

O experimento de enraizamento com o suporte misturado (40:60) com melhor desempenho foi realizado da seguinte forma: 30 mL de meio de enraizamento líquido MS (metade de concentração dos sais), foram utilizados para impregnar 2 g de suporte alternativo à base de bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de mandioca na proporção 40:60 adicionados em cada frasco de cultivo em substituição ao ágar e juntamente com  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado. No tratamento com ágar, o mesmo meio de cultura foi solidificado com  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de Plant Agar<sup>®</sup>. A cada 10 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: número de brotações enraizadas, comprimento das raízes e da altura de cada planta até completar 40 dias de cultivo e a percentagem de enraizamento.

Os explantes enraizados *in vitro* em ambos os suportes e com um tempo de enraizamento de 25 dias foram submetidos à aclimação em casa-de-vegetação com sistema de irrigação intermitente e com baixa luminosidade (com 40% de intensidade luz natural). A programação da irrigação foi da seguinte forma: das 8:00 -17:00 h a cada 30 min, 15 seg de irrigação; das 17:00-23:00 h a cada 1 h, 15 seg de irrigação e das 23:00-8:00 h a cada 3 h, 15 seg de irrigação. Os explantes enraizados no suporte alternativo foram diretamente transferidos (com suporte e meio de cultivo). Os explantes enraizados no meio com ágar foram primeiramente selecionados dos tufos, lavados com água corrente e secos com papel

toalha. Todos os explantes foram transferidos para bandejas de isopor com 128 células contendo como suportes comerciais Plantmax<sup>®</sup>/Vasomax<sup>®</sup> na proporção de 1:3. Foi avaliado o tempo necessário para que os mesmos pudessem ser transferidos para um lugar com maior intensidade de luz e com irrigação manual, a taxa de sobrevivência e formação de torrões.

Para realizar os cálculos dos custos, foram avaliados os seguintes fatores: meio de enraizamento, preparo da mistura do bagaço (coleta, seleção, lavagem, moagem, tratamento e secagem), lavagem e seleção dos explantes originados a partir do meio de ágar, tempo de permanência na estufa de aclimatização, tempo de permanência na casa-de-vegetação e os custos de mão-de-obra geral. Custos econômicos relacionados à esterilização, aquecimento, iluminação da câmara de crescimento, preço do suporte para aclimatização. Demais equipamentos foram desprezados tendo em vista que os mesmos são iguais em ambos os suportes. Para um melhor entendimento foram feitas planilhas de custo para cada meio de cultura na obtenção de mudas para o cultivar Camarosa anexo II.

A atividade de água dos dois meios de cultivo foi determinada usando o equipamento Aqua Lab, CX-2. Os dados foram coletados em intervalos de dez dias, simultaneamente com a coleta dos dados da morfologia dos explantes.

A umidade relativa (RH) dos meios de cultura com o suporte à base de ágar e suporte alternativo (mistura bagaço de mandioca/cana-de-açúcar) foi determinada pelo método termogravimétrico (100-105°C), normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

### 4.3. Resultados e Discussão

#### 4.3.1. Estudos Preliminares

A adição de bagaço de mandioca ao suporte se faz necessária para fornecer ao último uma consistência mais sólida quando comparada à consistência do bagaço de cana-de-açúcar puro. Além disso, o bagaço de mandioca serve como fonte adicional ao suprimento de carbono devido à presença de amido no mesmo.

Os estudos foram realizados durante 40 dias com cv. *Camarosa* e comparado com os explantes dos frascos controle (com ágar). Os resultados obtidos em relação a diferentes níveis de combinação dos suportes estão apresentados na tabela 14 (para ambas as cultivares).

**TABELA 14** – RESULTADOS DOS ESTUDOS PRELIMINARES OBTIDOS EM RELAÇÃO A DIFERENTES NÍVEIS DE COMBINAÇÃO DOS SUPORTES BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO E BAGAÇO DE MANDICA COM MORANGUEIRO cv. CAMAROSA.

Composição Bagaço: Mandioca/Cana (%)	Crescimento*	Formação de raízes*
20:80	Apresentou crescimento insuficiente	Sem formação de raízes
30:70	Apresentou crescimento insuficiente	Sem formação de raízes
40:60	Apresentou excelente crescimento	Alta quantidade de raízes formadas
50:50	Apresentou crescimento médio	Média quantidade de raízes formadas

\*Observação em 8 explantes por composição.

Com os resultados obtidos, pode-se observar que tanto a combinação de 20:80 (mandioca: cana-de-açúcar) quanto a de 30:70 não foram adequadas para o morangueiro.

Já na combinação de 40:60, as plantas se adaptaram mais rapidamente e com qualidade superior em comparação aos outros tratamentos. Esta melhor adaptação provavelmente foi obtida pela formação de uma estrutura de suporte gel-poroso durante a autoclavagem devido à presença de bagaço de mandioca entre o bagaço de cana-de-açúcar. Embora as outras combinações também contivessem bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de mandioca, as proporções entre as mesmas se mostraram insatisfatórias na estrutura gel-poroso formada.

Na formulação 50:50, a adaptação das plantas ao sistema empregado foi satisfatória, mas não suficiente para competir com o meio à base de ágar. Uma proporção acima de 40:60 provavelmente provocou uma estrutura muito dura, rígida e bastante elástica. Enquanto, as proporções menores provavelmente geraram algum produto de polimerização durante o processo de esterilização, o qual deve ter impedido a indução das raízes. Desta forma, experimentos específicos subseqüentes com os cultivares de morangueiro (Dover, Camarosa)

foram realizados com a mistura de dois suportes (Bagaço de Mandioca e Cana-de-açúcar) na proporção 40:60 conforme indica os resultados apresentados na tabela 14.

Quando, realizados os experimentos iguais com bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT) com partículas < 0,18 mm, não houve respostas positivas que pudessem ser apresentadas e discutidas neste trabalho.

Uma quantidade da solução alcalina foi adicionada para ajustar ou tamponar o pH do meio de cultivo, pois testes mostraram que o bagaço tem uma natureza ácida (pH 4,6). Esta acidez está provavelmente correlacionada com a presença dos oligômeros da lignina ou devido à lignina ácido solúvel (ASL) na solução aquosa, conforme descrito no item 2.3.

#### 4.3.2. Testes específicos de enraizamento em meio à base de melhor mistura de bagaço de mandioca e cana-de-açúcar (suporte alternativo) e o meio comercial (Ágar)

Os resultados dos testes comparativos em relação ao número de raízes formadas no meio à base de mistura de bagaço de mandioca e cana-de-açúcar (suporte alternativo) e o meio comercial, à base de ágar, são apresentados na tabela 15.

**TABELA 15** – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO À BASE DE ÁGAR (PLANT AGAR<sup>®</sup>) E O MEIO SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE MANDIOCA + CANA-DE-AÇÚCAR, 40:60 (GRANULOMETRIA < 0,18 MM) QUANTO AO NÚMERO DE RAÍZES EM MORANGUEIRO *cv.* CAMAROSA E *cv.* DOVER

Tempo (dias)	<i>cv. Camarosa</i>			<i>cv. Dover</i>		
	No. médio de raízes*, Ágar	No. médio de raízes*, alternativo	Diferença em relação à média* (%)	No. médio de raízes*, Ágar	No. médio de raízes*, Sup. alternativo	Diferença em relação à média* (%)
10	7,42± 0,18	-	-	7,21±0,18	7,65±0,30	6,12
20	8,34± 0,32	7,31± 1,21	-12,35	9,34±0,46	9,95±1,22	6,52
30	12,20± 0,61	15,21± 0,20	24,67	10,51±0,69	12,33±0,70	17,31
40	14,12± 1,57	24,12± 1,32	85,71	12,90±1,57	19,87±1,60	54,04

\* média de 8 explantes ± desvio-padrão.

Os dados da tabela 15 mostram que o suporte alternativo (mistura de bagaço de mandioca e de bagaço de cana-de-açúcar) não propiciou um melhor desempenho até 20 dias de cultivo para a *cv.* Camarosa, apesar da boa aeração no meio poroso. Isto se deve provavelmente à presença dos compostos tóxicos ainda existentes em pequenas quantidades os quais durante o tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (compostos fenólicos acumulados no meio composto da mistura de bagaço de mandioca e cana-de-açúcar, conforme relatado por GEORGE (1996)) não foram totalmente eliminados ou estas pequenas quantidades são

liberadas pela lignina ácida solúvel (ASL), na solução aquosa provavelmente liberada pelo pH final do meio (SUN *et al.*, 2004).

A presença dos compostos foram comprovadas pelas conclusões apresentadas no item 2.3. anterior. Compostos fenólicos ainda podem ser encontrados no bagaço de cana-de-açúcar em quantidades menores depois de tratamento (extração), por exemplo, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico e outros, conforme os resultados das análises apresentados no item 2.3.

Porém a cv. Dover teve um pequeno desempenho positivo inicial, chegando à 6,12 % em 10 dias e 6,51% em 20 dias, em comparação ao meio à base de ágar. Provavelmente o cv. Dover não se apresenta muito sensível às pequenas quantidades de compostos fenólicos presentes no bagaço de cana-de-açúcar conforme apresentados no item 2.3., como um inibidor de crescimento da material vegetal (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990).

Observou-se nos dois períodos iniciais do cultivo, um leve escurecimento dos explantes (começando pelo caule, dados não apresentados) em ambos os cultivares, o que provavelmente não se deve apenas aos compostos fenólicos presentes, mas também pela presença de um teor de umidade relativamente alta no próprio meio de cultivo (GEORGE, 1993) que pode dificultar a respiração dos explantes no próprio recipiente, com isso não permitindo a absorção dos nutrientes. A presença de uma umidade relativa alta foi observada pela grande quantidade de água acumulada nas paredes e no topo dos frascos de cultura nos primeiros 20 dias e pelas análises de umidade relativa feitas nos meios de cultivo (tabela 19). O meio com ágar não apresentou esse aspecto, pois não foi observado acúmulo de água condensada nas paredes dos recipientes, devido ao ágar ser um ótimo regulador de umidade do meio semi-sólido para o ambiente gasoso.

Os dados da tabela 16 também mostram que, após 30 dias de cultivo, o meio alternativo (bagaço de mandioca e cana-de-açúcar) propiciou um melhor desempenho quanto à formação das raízes, chegando a uma diferença relativa média de 24,67% para o cv. Camarosa e 17,31% para cv. Dover, quando comparados com o meio comercial à base de ágar. Acredita-se que a boa aeração e fácil difusão através do suporte, o contato do ácido indolbutírico ocorra mais facilmente no meio à base de bagaço em comparação ao meio comercial, superando o problema de escurecimento dos primeiros 20 dias e acelerando o enraizamento induzido. Por sua vez, no meio de suporte comercial à base de ágar contendo seu respectivo regulador de enraizamento (AIB) (ROMBERGER e TABOR, 1971), este contato não é tão próximo quanto ao suporte à base do bagaço, pois o último não tem uma consistência firme igual ao do suporte à base do ágar facilitando assim a adsorção dos compostos (DEBERGH, 1982). A melhor

aeração no meio também é benéfica, pois o oxigênio é necessário para a iniciação e o crescimento das raízes, conforme comprovados por SOFFER e BURGER (1988, 1989) com técnicas especiais.

Segundo HAISSIG (1986) e COLLET (1988), a presença da auxina é especialmente necessária para a indução de raízes, o que ocorre algumas horas após a aplicação da mesma. Porém, conforme mostrado nos resultados da tabela 15, tal efeito não aconteceu no suporte alternativo, provavelmente também devido à inibição dos compostos fenólicos que se sobressaíram sobre o efeito indutor das auxinas. Observou-se que o desempenho do suporte alternativo sobre o suporte comercial foi 85,71 % superior para o cultivar de morango Camarosa e 54,04 % para o cultivar Dover em relação ao número médio das raízes após 40 dias de cultivo.

**TABELA 16** – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR (COMERCIAL) E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE MANDIOCA + CANA-DE-AÇÚCAR, 40:60% (GRANULOMETRIA < 0,18 MM) QUANTO AO COMPRIMENTO DAS RAÍZES EM MORANGUEIRO cv.CAMAROSA E cv.DOVER

Tempo (dias)	cv. <i>Camarosa</i>			cv. <i>Dover</i>		
	Compr. média * das raízes, Ágar (cm)	Compr. média* Sup.alternativo (cm)	Diferença em relação à média* (%)	Compr. média * das raízes, Ágar (cm)	Compr. média* Sup.alternativo (cm)	Diferença em relação à média* (%)
10	0,12± 0,03	–	–	0,11±0,03	0,11±0,06	-
20	1,91± 0,15	0,81± 0,12	- 57,59	2,11±0,15	2,18±0,17	3,11
30	3,12± 0,08	3,56± 0,11	14,10	3,06±0,08	3,46±0,12	11,02
40	4,24± 0,45	4,88± 0,36	15,09	4,18±0,11	4,92±0,36	15,03

\*média de oito plantas ± desvio-padrão

A tabela 16 mostra que no período de cultivo entre 10 e 20 dias houve um lento no alongamento das raízes ou simplesmente não houve desenvolvimento das mesmas. Isto se deve provavelmente pelos mesmos motivos citados anteriormente (presença de compostos fenólicos e outros).

Na tabela 16 observa-se que no trigésimo dia de cultura, o meio alternativo apresentou para ambos os cultivares um desempenho 14,10 e 11,02% superior em relação ao meio comercial e de 15,09 e 15,03% após 40 dias de cultura, respectivamente para o cv. Camarosa e cv. Dover. Acreditamos que este bom desempenho é explicado pelos mesmos fatores citados anteriormente, ou seja, pela melhor ação do agente regulador de enraizamento devido as melhores condições de transporte no meio misto alternativo à base de bagaço de mandioca e

cana-de-açúcar.

Um outro fator mais importante é que a aeração no meio do suporte alternativo poroso foi melhor e com uma alta circulação de oxigênio. A estrutura porosa do meio em cultivo *in vitro* pode ser bem visualizada nas figuras 19 e 20 nos frascos B.

Os dados da tabela 17 mostram que até o vigésimo dia de cultura o meio alternativo apresentou um retardo no crescimento altura das plântulas em relação ao meio à base de ágar para a cv. Camarosa, e isso só foi superado no trigésimo dia de cultivo no qual observamos uma boa melhora na altura das plântulas (11,65%). Isto pode ser explicado pelo simples comportamento natural das raízes no suporte; conforme as raízes complementam seu ciclo de desenvolvimento, ao mesmo tempo melhoram a absorção de nutrientes e água, resultando num melhor crescimento em relação ao meio à base de ágar. Esta explicação é confirmada pelos dados da tabela 16, onde fica evidente que a partir do vigésimo dia de cultura foi constatado uma melhora significativa no alongamento das raízes no meio alternativo. Obviamente, não se deve ignorar o importantíssimo fator de aeração no suporte alternativo poroso.

**TABELA 17** – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR (COMERCIAL) E SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO DE MANDIOCA + CANA-DE-AÇÚCAR, 40:60 % (GRANULOMETRIA < 0,18 MM) QUANTO À ALTURA DAS PLÂNTULAS DE MORANGUEIRO cv. CAMAROSA E cv. DOVER

Tempo (dias)	cv. Camarosa			cv. Dover		
	Altura média*, Ágar (cm)	Altura média* Sup.alternativo (cm)	Diferença em relação à média* (%)	Altura média*, Ágar (cm)	Altura média* Sup.alternativo (cm)	Diferença em relação à média (%)
10	2,50± 0,03	2,31± 0,10	-7,74	2,71±0,04	2,78±0,04	2,41
20	2,91± 0,15	2,68± 0,09	-10,07	2,98±0,12	3,04±0,19	2,62
30	3,12± 0,08	3,63± 0,10	6,28	3,64±0,10	3,94±0,09	8,32
40	4,24± 0,45	4,60± 0,10	11,65	4,02±0,08	4,50±0,04	12,00

\*média de oito plantas ± desvio-padrão.

Porém um atraso no crescimento não ocorreu com a cv. Dover, podendo ser justificado mais uma vez pelo fato que o cv. Dover não deve ter sensibilidade em pequenas quantidades dos compostos fenólicos presentes no bagaço de cana-de-açúcar, os quais atuam como inibidores e retardantes de crescimentos de espécies vegetais.

A tabela 18 mostra a percentagem de enraizamento em cada tipo de cultivo comparando cada tipo de meio: à base de ágar e à base de mistura bagaço de mandioca/cana-de-açúcar, no final dos experimentos (40 dias). Relativamente em ambos os cultivares como

também em ambos os meios, observou-se um alto valor de enraizamento, mas o meio com o suporte alternativo foi sempre superior. Pode-se observar que para o enraizamento dos explantes no meio de ágar não foi utilizada auxina para a indução das raízes, mas o uma quantidade baixa de citocinina BAP 0,05 mg.L<sup>-1</sup> e uma quantidade de sacarose 30 g.L<sup>-1</sup>.

Conforme RIQUELME (1991) uma alta concentração de sacarose também influencia bastante na formação de raízes em morangueiro. Para a formação das raízes é necessário energia. Esta pode ser oriunda da fotossíntese ou de outra fonte de açúcar.

**TABELA 18** – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO COM ÁGAR (COMERCIAL) E SUPORTE ALTERNATIVO (GRANULOMETRIA < 0,18 MM) QUANTO À PERCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DOS EXPLANTES DE MORANGUEIRO cv. *CAMAROSA* E cv. *DOVER* DEPOIS DE 40 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*

Tempo (dias)	cv. <i>Camarosa</i>		cv. <i>Dover</i>	
	% de enraizamento, Ágar*	% de enraizamento, Suporte Alternativo*	% de enraizamento, Ágar	% de enraizamento, Suporte Alternativo
40	94,6	100,0	96,5	100,0

\*média de 12 repetições.

O enraizamento de 100 % no meio do suporte alternativo poroso é um reflexo do melhor desempenho já citado anteriormente, apesar das dificuldades provocadas pela presença dos compostos fenólicos, polissacarídeos e outros. Como o oxigênio é necessário para a iniciação e o crescimento das raízes (SOFFER e BURGER (1988, 1989)), no meio com suporte alternativo poroso não deve ter faltado circulação de uma alta taxa de oxigênio, o que não deve ter ocorrido no meio à base de ágar.

Os experimentos comprovam que, (embora com recuperação ou crescimento lento), houve boa adaptação média das plantas ao meio alternativo, ou seja, houve formação de raízes em número considerável conforme pode ser observado pelas tabelas e comprovado nas figuras 18 e 19. A figura 18 ilustra as diferenças na qualidade das raízes formadas e na altura das plântulas cv. *Camarosa* após 40 dias. Os mesmos podem ser observados dentro dos frascos na figura 19. A figura 20 mostra uma quantidade de raízes formadas no fundo dos frascos de cultivo após 40 dias de incubação nos dois diferentes meios, ágar comercial e alternativo à base de bagaço misto (bagaço de mandioca e cana-de-açúcar).



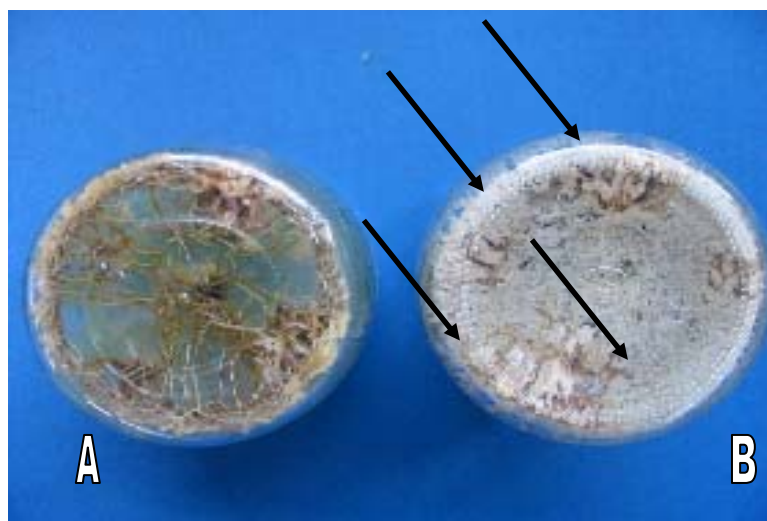
**FIGURA 18** – FORMAÇÃO DE RAÍZES DE MORANGUEIRO *cv.* CAMAROSA, APÓS 40 DIAS: A – MEIO COMERCIAL; B – MEIO ALTERNATIVO MISTO.



**FIGURA 19** – ALTURA DOS PLÂNTULAS DO MORANGUEIRO *cv.* CAMAROSA APÓS 40 DIAS EM CULTIVO: A - MEIO COMERCIAL B – MEIO ALTERNATIVO MISTO



**FIGURA 20** – ASPECTO DAS RAÍZES DO MARANGUEIRO CV. CAMAROSA PELO FUNDO DO FRASCO, APÓS 40 DIAS EM: A – MEIO COMERCIAL B – MEIO ALTERNATIVO MISTO (SETAS PRETAS INDICANDO AS RAÍZES).



#### **4.3.3. Umidade Relativa (RH) e Atividade de Água (Qw)**

A tabela 19 apresenta os dados sobre a umidade relativa (RH) e a atividade de água (Qw) determinada a partir dos meios semi-sólidos (ágar) e o meio alternativo (suporte poroso). Observa-se que conforme aumenta o tempo de cultivo a umidade relativa no meio de suporte abaixo drasticamente de 99,8% para 54,3% em 40 dias, comparado ao meio com ágar, onde a queda é bem menor. Isso ocorre devido à fácil circulação e evaporação do ar no meio à temperatura de cultivo, a qual oscilava em torno de  $24 \pm 2$  °C. Este fenômeno demonstra que há uma boa oxigenação dentro do sistema, a qual pode beneficiar em muito o processo de enraizamento das explantes. Porém, se a análise for feita por período de 10 dias, inicialmente observa-se que a queda é menor. Este fenômeno pode ser considerado ótimo, uma vez que na fase inicial de indução e alongamento das raízes uma umidade pouco elevada é necessária. O meio com ágar não apresentou muita perda de umidade porque um dos próprios objetivos do ágar é de proteger o meio da desidratação.

A partir dos dados da tabela 19 a atividade de água (Qw) não mostrou nem uma mudança significativa entre os dois tipos de suporte durante o tempo de cultivo. A atividade só mudou em relação à temperatura de determinação. Pode-se dizer mais uma vez que a atividade de água não teve participação ativa em influenciar os resultados de enraizamento e de aclimação em ambos os meios.

**TABELA 19** – APRESENTAÇÃO DE UMIDADE RELATIVA (RH) E ATIVIDADE DE ÁGUA (Qw) NOS DOIS DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO, À BASE DE AGAR E SUPORTE ALTERNATIVO DETERMINADOS DURANTE O CULTIVO DE MORANGUEIRO.

Tempo (dias)	Umidade Relativa (%)		Atividade de Água (Qw)		
	Agar	Suporte alternativo	Agar	Suporte alternativo	Temperatura (°C)
10	99,2	99,8	0,985	0,976	24,5
20	98,4	92,4	0,968	0,969	23,9
30	94,5	75,2	0,962	0,962	25,0
40	92,1	54,3	0,959	0,956	26,0

#### 4.3.4. Testes de Aclimatização

Os resultados dos explantes originados a partir dos dois diferentes meios de enraizamento e os resultados das diferentes variedades de morango são apresentados na tabela 20. Nos períodos após 7 dias já se observou uma boa adaptação das plântulas em todos os casos. Porém, a sobrevivência dos explantes do suporte alternativo mostrou-se sempre superior (100%). A baixa percentagem de sobrevivência (86,2) das plântulas do cv. Camarosa a partir do meio de ágar deve ter sido ocasionada pelo fato de que em alguns deles, a qualidade das raízes formadas era inferior ou/e sofreram alguns danos físicos durante a seleção, separação e lavagem com água corrente para retirada total do ágar grudado junto às raízes. O mesmo motivo deve explicar a menor percentagem de sobrevivência do cv. *Dover* no meio com ágar.

**TABELA 20** – PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE PLÂNTULAS DE MORANGUEIRO cv. CAMAROSA E cv. DOVER ACLIMATIZADOS EM DOIS SUPORTES DE CULTIVO *IN VITRO* DIFERENTES, À BASE DE AGAR E À BASE DE MISTURA BAGAÇO DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR (40/60%, SUPORTE ALTERNATIVO)

Tempo (dias)	cv. <i>Camarosa</i>		cv. <i>Dover</i>	
	Agar	Suporte Alt.	Agar	Suporte Alt.
7	86,2	100	84,4	100
14	74,0	100	76,2	100
21	71,0	100	76,0	100
28	71,0	100	76,0	100

A sobrevivência total a partir dos dois suportes alternativos pode ser relacionada a vários fatores, tais como: boa qualidade e quantidade das raízes; transporte direto para o suporte de aclimação sem danos físicos às raízes e com nutrientes residuais; baixa umidade

relativa final do ambiente *in vitro* para realizar a aclimatização, conforme mostra os dados da tabela 20 os quais apresentam os valores da umidade relativa (RH) e da atividade de água (Qw) do meio semi-sólido e poroso em função do tempo (ágar e suporte alternativo). O benefício da baixa umidade dentro do meio de cultivo está relacionado com a baixa umidade relativa do próprio ambiente (fase gasoso) do frasco. Sendo assim, a baixa umidade relativa no ambiente *in vitro* realiza uma espécie de pré-aclimação dos explantes enraizados.

A maioria das espécies de plantas cultivada *in vitro* tem, geralmente, a cutícula pouco desenvolvida, devido à alta umidade relativa (90 a 100%) que ocorre dentro do ambiente fechado do frasco. As folhas das plantas *in vitro* são geralmente finas, tenras e fotossinteticamente pouco ativas, se tornando pouco adaptadas às condições que irão encontrar na aclimação (PIERIK, 1990), refletindo em um baixo desempenho na aclimatização.

A figura 21 ilustra a adaptação (aclimatização) dos explantes originados a partir dos dois meios com suportes diferentes, um a base de ágar (A) e outro a base de mistura bagaço de mandioca/cana-de-açúcar (B, suporte alternativo) após 10 dias em casa-de-vegetação com irrigação intermitente. Pode-se observar que as plantas a partir do meio do ágar são bem menores e de qualidade inferior quando comparadas às plantas oriundas do suporte alternativo, as quais mostram ter uma melhor aparência física, tamanho superior e de alta qualidade em um período de apenas 10 dias.

**FIGURA 21** – ILUSTRAÇÃO DAS PLANTAS DE MORANGUEIRO EM FASE DE ACLIMATAÇÃO ORIGINADA A PARTIR DOS DOIS DIFERENTES SUPORTES: À BASE DE AGAR (A) E À BASE DE MISTURA BAGAÇO DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR (B) PARA O cv. CAMAROSA EM 10 DIAS



Esta grande diferença deve ser provocada pelos seguintes motivos: os explantes durante a fase de enraizamento tiveram melhores condições, como enraizamento em um meio poroso que permitia uma difusão do oxigênio livre (GEORGE, 1993), uma umidade relativa baixa em relação ao tempo de enraizamento garantindo assim um processo de pré-aclimação *in vitro*, e a transferência dos explantes enraizados sem danos físicos pela lavagem das raízes para o suporte de aclimatização. Este último fator, além de contribuir com uma melhora na técnica, também tem influência significativa relacionada à mão de obra e ao custo do processo parcial, uma vez que os processos de seleção, separação, lavagem e secagem das plantas não precisam ser realizados (DEBERGH e MAENE, 1981).

A figura 22 mostra as plantas em aclimação originadas a partir dos dois diferentes meios de enraizamento após 25 dias de permanência na casa-de-vegetação com irrigação manual. O tempo de permanência na casa-de-vegetação dos explantes originados a partir do meio com suporte alternativo e aclimatizados com irrigação intermitente pode ser inferior a dez dias (figura 23). A completa formação dos torrões nestes explantes também foi observada antes de 20 dias a partir do início do processo de aclimação (dados não fornecidos), o que possibilitaria a transferência dos explantes antecipadamente para campo.

**FIGURA 22** – ILUSTRAÇÃO DAS PLANTAS EM FASE DE ACLIMATAÇÃO A PARTIR DOS DOIS DIFERENTES SUPORTES: À BASE DE AGAR (A) E À BASE DE MISTURA BAGAÇO DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR (B) PARA O MORANGUEIRO cv. CAMAROSA EM 25 DIAS



**FIGURA 23** – ILUSTRAÇÃO DAS PLANTAS EM FASE DE ACLIMATAÇÃO ORIGINADA A PARTIR DOS DOIS DIFERENTES SUPORTES: À BASE DE ÁGAR (A) DEPOIS DE 60 DIAS, E À BASE DE MISTURA BAGAÇO DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR (B) DEPOIS DE 30 DIAS PARA O MORANGUEIRO cv. CAMAROSA



#### 4.3.5. Estudo Econômico

Na tabela 21 são apresentados os preços e os custos calculados (estimados) na base de 1000 plantas enraizadas e aclimatizadas com sucesso nos meios com suporte à base de ágar (comercial) e suporte à base de bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT) mais mandioca.

Mais uma vez, para visualizar as grandes vantagens obtidas com a aplicação desta nova tecnologia pelo uso de um suporte alternativo nas fases de enraizamento e aclimação de explantes em técnicas de micropropagação para a geração de clones, todos os custos parciais foram transformados em números representativos (% , R\$).

**TABELA 21** - APRESENTAÇÃO DOS CUSTOS ESTIMADOS PARA ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO PARA 1000 PLANTAS A PARTIR DE MEIOS DE CULTIVO COM DIFERENTES SUPORTES (ÁGAR E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR + MANDIOCA) COM cv. CAMAROSA.

Base de cálculo: 1000 plantas	Custo à base de Ágar (R\$)	Custo à base de BT (R\$)	Redução em relação ao Ágar
			BT (%)
Enraizamento	50,71	30,32	43,36
Aclimatização	----	----	43,00
<b>Redução Real Total %</b>			<b>21,60</b>

Pelos dados apresentados na tabela 21, obteve-se um ganho de 11,38% para enraizamento de 1000 explantes com sucesso entre os dois suportes diferentes (Plant Ágar, BT). Isto significa que para enraizar 1000 explantes com sucesso em um meio contendo um suporte alternativo na base de mistura de bagaço de mandioca/cana de açúcar (40/60) resulta ao final uma economia de 43,36% em relação ao enraizamento de 1000 explantes com sucesso em meio à base de ágar para o cv. Camarosa.

Os dados da tabela 21 também mostram que, para a obtenção de 1000 plantas aclimatadas a partir do suporte alternativo à base de mistura bagaço de mandioca/cana (40/60) custa 21,60% menos que 1000 plantas aclimatadas a partir de um meio à base de ágar para cv. Camarosa. Os valores para a cv. Dover não seriam muito diferentes dos para a cv. Camarosa, porque os cálculos finais levam muito em consideração a percentagem de enraizamento e de aclimatização. Como as diferenças das percentagens entre cv. Camarosa e cv. Dover são pequenas, estas não influenciaram muito o resultado final. Destaca-se, porém, que estes valores são números estimados, e não apresentam valores exatos. As planilhas para o cálculo dos preços e reduções são apresentadas nas planilhas em anexo II, planilhas 1 e 2.

#### 4.4. Conclusões

Os resultados obtidos com a mistura bagaço de mandioca/cana-de-açúcar tratado (BT) (40/60) foi a melhor combinação entre as testadas tanto para o enraizamento e como na adaptação dos explantes de morango com os cultivares de Camarosa.

As respostas fisiológicas das plantas enraizadas e aclimatizadas a partir do suporte na base de mistura de bagaço de mandioca/cana-de-açúcar (40:60%) apresentaram-se sempre com melhor desempenho quando comparadas ao meio à base de ágar, inclusive efeitos de vitrificação e morfogênese anormal não foram registrados após 40 dias de cultivo *in vitro*.

Obteve-se um ganho de 43,36% para o enraizamento de 1000 explantes entre os dois suportes diferentes (Ágar,BT).

A técnica utilizada também reduziu os custos em 21,60% para cada 1000 plantas aclimatizadas em relação aos dois meios de enraizamento diferentes com os 2 cultivos diferentes de morango (cv. Camarosa e cv. Dover).



## Referências

- BOXUS, PH.; TERZI, J.M. Control of accidental contaminations during mass propagation. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.212, p.91-93, 1988.
- COLLET G.F. Improvement to induce rooting of fruit trees *in vitro*. *Acta Hort.*, v.227, p.318-323, 1988.
- DEBERGH P. Physical properties of culture media. In: International congress plant tissue culture, 5<sup>th</sup>, 1982, Tokyo-Japan. *Anal...* Tokyo-Japan: Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, 1982. p.135-136.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, n.14, p.335-345, 1981.
- DESJARDINS, Y.; GROSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of ex-vitro strawberry plantlets in CO<sub>2</sub> - enriched environments and supplementary lighting. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 112, n. 5, p. 846- 851, 1987.
- FRIES, N. The effect of adenine and kinetin on growth and differentiation of *Lupinus*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.13, n.3, p. 468-481, 1960.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture, Part 1-The Technology. Edington: Exegetics Limited. p.274-382, 1993.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture, Part 2- In Practice. Edington: Exegetics Limited. p.671-732, 1996.
- HAISSIG, B.E. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In: Jackson M.B. (ed.). *New root formation in plants and cuttings*. The Netherlands: Dordrecht. 1986, p.141-189.
- Instituto Adolfo Lutz (IAL). Métodos químicos e físicos para análise de alimentos normais. Normas analíticas de Instituto Adolfo Lutz, p.189-192; p.195-196, São Paulo, 1985.
- ICIDCA-GEPLACEA-PNUD. Manual de los derivados de la cana de azucar. Bagazo. (eds). Cuban Institute of Research on Sugar cane, Mexico, 1990. p.62.
- MACHADO, C.M.M. CuritAIB, 2000. Desenvolvimento de bioprocessos para produção de hormônio vegetal por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de GA<sub>3</sub> em bioreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*). Tese de doutorado apresentado ao curso de 'Doutorado em Processos Biotecnológicos', Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- MINAMI, K. Biotecnologia e Otimização da Produtividade dos Produtos Hortícolas. In: CROCOMO (Ed.) e colaboradores. *Biotecnologia para produção vegetal*. Piracicaba: ESALQ/USP: CEBTEC/FEALQ, p. 173-187, 1991.
- MOHAN, R.; OKAMOTO, G.T.; QUOIRIN, M.G.; SOCCOL, C.R. Estudo de um novo suporte para enraizamento de micro-estacas *in vitro*. In: *ENCONTRO REGIONAL SUL DE*

CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTO, IX, 2001, CuritAIB. 9º EVINCI. CuritAIB: Universidade Federal do Paraná, 2001. p.103.

MOHAN, R.; SOCCOL, C.R.; QUOIRIN, M.G.; PANDEY, A. Use of sugarcane bagasse as an alternative low cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, Oxon, v. 40, n. 4, p. 408-411, July-August. 2004

Ministério de Agricultura, Pecuário e Abastecimento. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 12 jan. 2004.

MOTTA, L. C. Botucatu, 1985. Utilização de resíduos de industrialização de farinha de mandioca em digestão anaeróbica. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP.

MULTIPLANTA: Empresa de Biotecnologia Vegetal. Disponível em: <[www.multipianta.com.br](http://www.multipianta.com.br)>. Acesso em: 10 jan. 2004.

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

NEMETH, G. Adventitious root induction by substituted 2-chloro-3 phenyl-propionitriles in apple rootstocks cultured “*in vitro*”. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, n.14, p.253-259, 1981.

PIERIK, R.L.M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madri: Mundi-Prensa, 1990. 326p.

RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M.E.; TIZIO, R. Pre-acondicionamento y aclimatacion en condiciones de invernáculo de plantas micropropagadas de frutilla, menta, papay vid. *Phyton*, v. 52, n. 1, p.73-82, 1991.

ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The Picea abies shoot apical meristem in culture. I. Ágar and autoclaving effects. *Am. J. Bot.* v.58, p.131-140, 1971.

SOFFER, H.; BURGER, D.W. Studies on plant propagation using the aero-hydroponic method. *Acta Hort.* v.230, p.261-269, 1988.

SOFFER, H.; BURGER, D.W. Plant propagation using the aero-hydroponic systems. *Hort. Science*, v.24, p.154, 1989.

SUN, J.X; SUN, R.; SUN, X.F.; SU, Q. Fractional and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. *Carbohydrate Research*, v.339, p.291-300, 2004.

## 5. ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE CAFEIEIRO ‘CATUAÍ VERMELHO’ EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO (BT) E ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS

**Resumo:** Para a obtenção de mudas sadias de cafeeiro em maior quantidade e em tempo reduzido, utiliza-se a técnica de micropropagação vegetal. Essa técnica é realizada em etapas, desde o isolamento até a transferência para o ambiente *ex vitro*. Para melhorar o processo total é essencial que cada etapa colabore com o máximo de rendimento com o menor custo possível. Este trabalho teve como focos as etapas de enraizamento e de aclimação com as seguintes mudanças previstas: o enraizamento das brotações propagadas em meio de cultura modificado (substituição do agente geleificante por bagaço de cana-de-açúcar tratado) e a sua fácil aclimação (permanência de curto tempo nas condições de aclimação e a rápida formação de torrões para facilitar a transferência das mudas). Comparando os resultados obtidos utilizando-se meio alternativo em relação ao meio comercial (contendo Gelrite<sup>®</sup>), observou-se que o tamanho das raízes foi em média 34,21% superior, o número de folhas novas *in vitro* foi 29,91% superior e o número de raízes formadas foi 82,00% superior. O estudo do custo ligado na fase de enraizamento não mostrou redução com a técnica alternativa aplicada, mas um aumento (1,54%) devido ao processo de tratamento do suporte à base de bagaço de cana-de-açúcar, enquanto na fase de aclimação obteve-se uma redução de 38,00% comparada ao meio geleificado à base de Gelrite<sup>®</sup>.

Palavras chaves: *suporte alternativo, agente geleificante, micropropagação, custo de clonagem, cultivares.*

### **Rooting of coffee micro-cuttings variety ‘Catuaí red’ in medium supported by treated sugarcane bagasse and their acclimatization**

**Abstract:** For the attainment of healthy plant material of coffee species in high amounts and in reduced time, normally the technique of plant micropropagation is used. This technique is carried through different stages, since the isolation until the transport for ‘extra vitro’. To improve the total process it is essential that each stage collaborates with his maximum results in short time and with the possible low cost. This work had focused on the rooting and acclimatization stages with the following programmed changes: the rooting of propagated micro-cuttings in a modified culture medium (substitution of the gelrite with treated sugarcane bagasse) and its easy acclimatization (permanence time during the acclimatization conditions and the fast formation of clods that’s facilitate the transference of the plants). Comparing the results obtained using the medium with the alternative support in relation with the commercial support (Gelrite<sup>®</sup>), it was observed that the size of the roots was 34.21% superior, the number of new 'in vitro' leaves was 29.91% superior and the number of formed roots was 82.00% superior. The study of the cost during the rooting phase had not shown reduction with the applied alternative technique, but an increase (1.54%) due the treating process of the sugarcane bagasse, while in the acclimatization phase an reduction of 38.00% was obtained compared to the medium supported with Gelrite<sup>®</sup>.

Keywords: *alternative support, gelling component, micropropagation, cloning cost, cultivares.*

## 5.1 Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador de café. Possui uma produção anual de cerca 30,5 milhões de sacas, das quais 26 milhões são de café arábica e 4,5 milhões são de café robusta, segundo os dados da Associação Brasileira dos Exportadores de Café (ABECAFE, 2004).

O Brasil é o segundo maior consumidor mundial de café (atrás dos Estados Unidos), com 115 bilhões de xícaras/ano. Em 2002, as indústrias processaram 13,5 milhões de sacas de café que, acrescidas de 3 milhões de sacas industrializadas pelas empresas de solúvel, totalizam a quantidade de 16,5 milhões de sacas. Esse volume corresponde a 15% do consumo mundial por ano e a 20% do total das exportações mundiais (ABIC, 2005).

A cultura do café chegou ao Paraná no início do século XX. Seu crescimento foi lento até 1945, em consequência das duas guerras mundiais e também da quebra da bolsa de Nova York. Entretanto, após a crise, o café se tornou o principal gerador de riquezas para o Estado por um longo período de tempo, propiciando a fixação do trabalhador no meio rural, além de contribuir com êxito para o modelo de colonização, tornando as pequenas e médias propriedades economicamente viáveis, numa época de poucas alternativas agrícolas (IAPAR, 2004).

Atualmente, o setor de produção de café no Paraná encontra-se deficitário e com uma série de problemas que necessitam de solução, para a retomada da produção em níveis compatíveis com as demandas dos demais segmentos do agro-negócio café, e com a necessidade de gerar emprego e renda nos pequenos municípios. Entre os vários problemas encontra-se a falta de mudas (IAPAR, 2004).

O melhoramento da cultura do café, pelos métodos tradicionais é um longo processo que envolve várias técnicas. Leva mais de 30 anos para a obtenção de uma nova cultivar. É dispendioso e resulta em criação e distribuição de material propagativo insuficiente de novos cultivares que atendem as necessidades dos agricultores (SERRA e ALVES, 1999; JESUS *et al.*, 2002).

A multiplicação *in vitro* é considerada de grande importância para a propagação de genótipos com características desejáveis em larga escala. As técnicas de culturas de tecidos têm possibilitado a obtenção de grande número de plantas e a garantia da uniformidade genética do material do café (BARROS *et al.*, 1989; DUBLIN, 1984).

A embriogênese somática do café foi estabelecida pela primeira vez por STARITSKY (1970), a partir de explantes de caules ortotrópicos de *Coffea canephora*. No caso de *C.*

*arabica*, embriões foram obtidos a partir de explantes de folhas por HERMANN e HAAS (1975) e mais tarde por SONDAHL e SHARP (1977). Em seguida, pesquisas foram desenvolvidas por vários autores: LANAUD (1981) obteve a embriogênese a partir de óvulos, PIERSON *et al.* (1983), assim como YASUDA *et al.* (1985), a partir de explantes foliares, ASCANIO e ARCIA (1987) a partir de tecido somático de anteras. Os trabalhos de DUBLIN e colegas (DUBLIN *et al.*, 1984; MICHAUX-FERRIERE *et al.*, 1987) permitiram implementar as técnicas de embriogênese a partir de vários tipos de explantes para *Arabidopsis* e *C. arabica*. O processo descrito por DUBLIN (1984) compreende duas etapas: uma fase de indução de calo, obtida na presença de cinetina (1 a 2 mg.L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (0,1 a 0,5 mg.L<sup>-1</sup>); a segunda fase, de diferenciação, se realiza na presença de BA (benziladenina) (1 a 3 mg.L<sup>-1</sup>).

Os embriões obtidos por embriogênese direta são mais limitados em número que os embriões derivados de embriogênese indireta. Neste último caso, as células sofrem uma proliferação intensa que leva à formação de um tecido embriogênico friável que logo se diferencia em embriões normais (SONDAHL *et al.*, 1979, 1985). Este processo pode induzir uma certa variação somaclonal entre as plantas derivadas da embriogênese direta ou indireta (SONDAHL e BRAGIN, 1991).

NEUENSCHWANDER e BAUMANN (1992) obtiveram um novo tipo de embriogênese somática em *C. arabica*, caracterizada por uma formação de embriões altamente sincronizada. Para tal efeito, cultivaram calos em meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962) líquido suplementado com cinetina (4 mg.L<sup>-1</sup>) e 2,4-D (1 mg.L<sup>-1</sup>). A indução de embriões foi otimizada usando um meio semilíquido com 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D para a proliferação de tecidos embriogênicos e 2,6 mg.L<sup>-1</sup> de ácido abscísico para a maturação dos embriões.

Outro protocolo de obtenção de embriões somáticos foi descrito por BERTHOULY e MICHAUX-FERRIERE (1996) para *C. canephora*. Neste caso, explantes foliares produziram um calo friável quando cultivados num meio de cultura adicionado de 2,2 µM de 2,4-D, 2,4 µM de AIB (ácido indolbutírico) e 9,8 µM de 2iP durante 4 semanas. Em seguida, foram transferidos a um meio de indução contendo 4,4 µM de 2,4-D e 17,8 µM de BA (benziladenina) por 10 semanas. O calo foi mantido durante várias subculturas, e deu origem a embriões somáticos, gerando plantas.

Da mesma forma que ocorre no enraizamento convencional, muitas espécies enraízam facilmente *in vitro* e freqüentemente produzem raízes sem nenhum tratamento específico (DEBERGH e MAENE, 1981). Em muitos casos, o tratamento usado para a produção de

brotos *in vitro* inibe a formação de raízes. Quando isso ocorre, os brotos devem ser transferidos para um meio de cultura adequado para o enraizamento ou tratados isoladamente, por imersão rápida em solução contendo regulador de crescimento.

Apesar do interesse no enraizamento *in vitro* para a etapa de aclimatização, tem-se observado que raízes formadas *in vitro* não se desenvolvem adequadamente para permitir o crescimento de plantas lenhosas em condições de campo, especialmente para cafeeiros (GEORGE, 1996). DEBERGH e MAENE (1981) observaram que, quando as plantas são examinadas aproximadamente duas semanas após o transplante, as raízes produzidas em meio de cultura tinham, na maioria dos casos, morrido, e outras tinham começado a se desenvolver, indicando que, para algumas espécies, as raízes *in vitro* não são funcionais após transferência para a condição *ex vitro*.

Ainda com relação à qualidade, tem-se observado que raízes que se desenvolvem *in vitro* são danificadas quando as plantas são removidas da cultura e transplantadas para suporte, o que aumenta as chances de infecção por fungos e bactérias.

Em alguns casos, o gasto extra com o enraizamento *in vitro* pode ser justificado se este resultar em mudas de melhor qualidade, ou se as perdas durante a aclimatização puderem ser reduzidas. Em geral, o tratamento de segmentos caulinares com reguladores de crescimento acelera consideravelmente o processo de enraizamento e contribui para a produção de um sistema radicular mais adequado ao transplante (GEORGE, 1996).

Na maioria dos casos de enraizamento *in vitro* de explantes de café, geralmente uma raiz principal é formada e em um período mais prolongado. Estes fatores sempre têm um impacto grande sobre a taxa de sobrevivência, pois para obter uma boa taxa de sobrevivência não só a qualidade das raízes é importante, mas também o número de raízes em um tempo mínimo. SONDAHL *et al.*, (1991) registraram que no enraizamento de explantes (meristemas) de café, espécie *Catuai* em meio MS (metade das concentrações dos sais), AIB e ANA (ácido naftaleno acético) obtiveram apenas raízes longas e primordiais. Para obter mais raízes (secundárias e finas) os explantes foram subcultivados em mistura de substrato área/vermiculita (2:3) esterilizado.

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da utilização do bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT) como suporte para as brotações de cafeeiro nas fases de enraizamento e aclimatização.

## 5.2 Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Divisão de Biotecnologia Industrial (DBI) do Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, e no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

O cultivar de cafeeiro utilizado foi do germoplasma *Catuai vermelho*. O fluxograma na figura 24 mostra a técnica aplicada para obtenção das plantas *in vitro* via embriogênese somática.

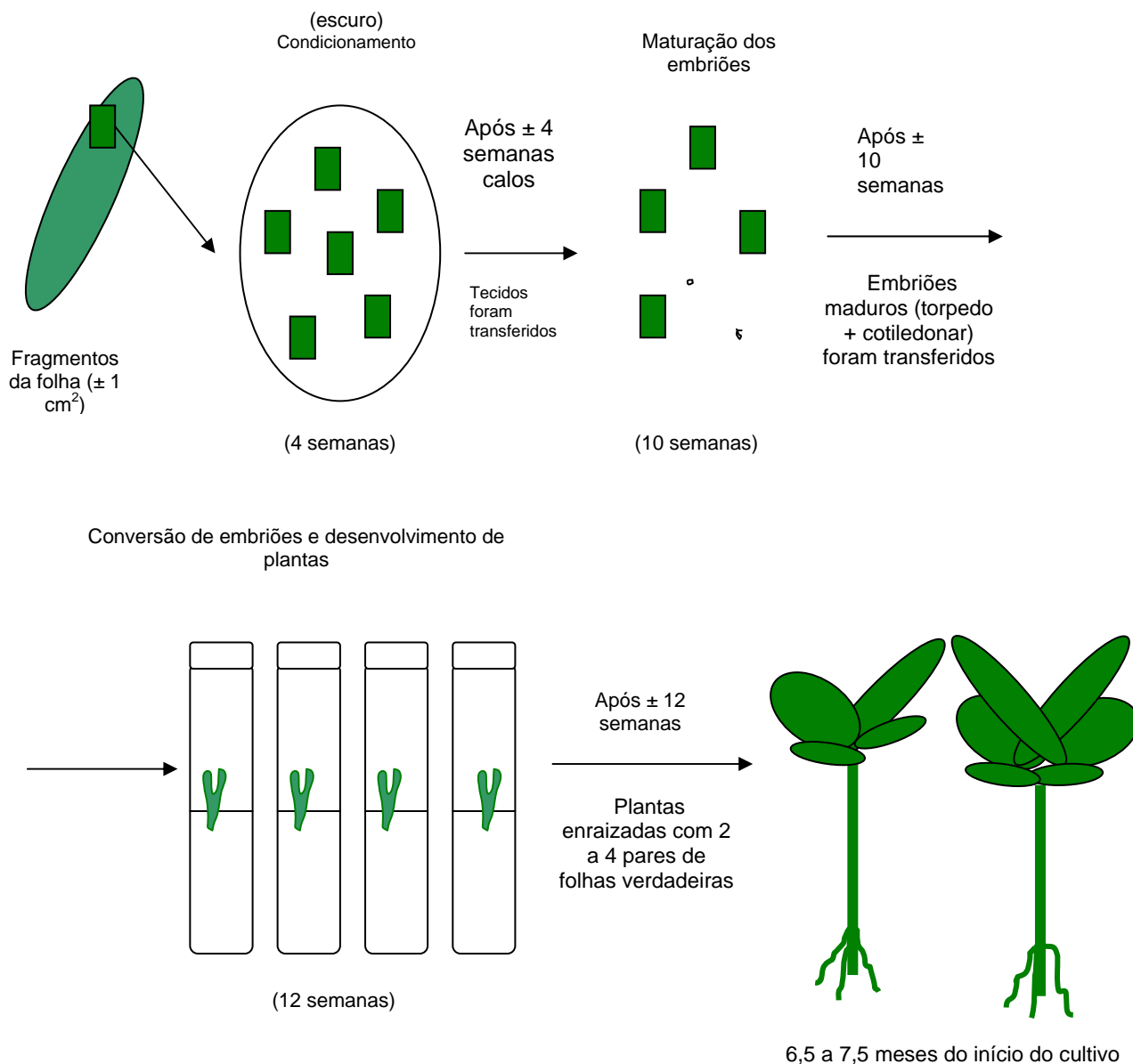
Como fontes de explantes foram utilizadas plantas matrizes de cafeeiro de 8 meses de idade, obtidas pela germinação de sementes. Essas plantas foram mantidas na casa-de-vegetação com controle de temperatura ( $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ). Os explantes consistiram de segmentos foliares de  $1\text{ cm}^2$ , que foram colocados em meio de cultura para indução de calos (C), a composição se encontra na tabela 22. Após 4 semanas, os calos foram transferidos para outro meio de cultura (E) (tabela 22) para indução dos embriões somáticos. Após 10 semanas os embriões em estádios mais avançados de desenvolvimento, como torpedos e cotiledonares foram transferidos para outro meio EG (tabela 22) para a conversão em plantas, o que ocorreu em aproximadamente em 12 semanas. Uma vez geradas as plantas, a parte apical, foi usada para a multiplicação do material vegetal em meio de cultura DEV (tabela 22) até atingir a quantidade suficiente para realizar os experimentos programados. As induções de calos e de embriões foram realizadas em placas de petri, contendo 40 mL de meio. Esta parte do protocolo foi adaptada de BERTHOULY *et al.*, 1995.

A repicagem das plantas, consistiu em retirar o excesso das folhas do ápice e colocar os explantes em frascos para cultura *in vitro* de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura DEV (5 explantes por frasco).

A parte superior das plantas com cerca de 2 meses e meio, com uma altura de  $\pm 2,5\text{ cm}$  (apical) foi utilizada para o enraizamento. A base desses explantes foi imersa em uma solução de AIB  $0,5\text{ mg.L}^{-1}$  por 36 horas com ausência de luz (escuro) a temperatura  $24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O meio de enraizamento foi igual ao meio de multiplicação DEV<sup>3</sup> (veja tabela 22) diferindo apenas pela substituição de BAP por ácido indolbutírico (AIB)  $0,5\text{ mg.L}^{-1}$  e o Gelrite<sup>®</sup> pelo bagaço moído e tratado (cana-de-açúcar partículas  $< 0,18\text{ mm}$ ).

**FIGURA 24** – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA EM EXPLANTES FOLIARES DE CAFEIEIRO DO GERMOPLASMA CATUAÍ VERMELHO.



O bagaço de cana-de-açúcar foi tratado conforme a melhor técnica de extração formulada conforme discutido no item anterior 2.3. Uma quantidade de  $\pm 10 \text{ mL}$  do meio de enraizamento ( $\text{DEV}^4$ ) foi utilizado para impregnar  $0,7 \text{ g}$  do bagaço de cana-de-açúcar tratado por frasco.

Foi acrescentada uma quantidade equivalente a  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado (para a suposta adsorção dos compostos fenólicos restantes existentes no bagaço, uma vez que estes



compostos são tidos como inibidores de crescimento) e mais 1 mL de KOH 0,1 N (solução alcalina para regular o pH próximo 5,6). Estes testes foram realizados em frascos para cultura *in vitro* de 50 mL. Simultaneamente foram preparados frascos com meio de cultura solidificado com Gelrite<sup>®</sup> como controle.

As condições de cultura foram  $24 \pm 2$  °C de temperatura, foto período de dezesseis horas, densidade fluxo de fótons de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , lâmpadas fluorescentes do tipo luz branca, exceto para fase de indução de calos e de embriões, esta fase permaneceu totalmente em ambiente escuro por 4 semanas cada um deles.

Em todos os meios o pH foi ajustado em 5,6 antes da adição de Gelrite<sup>®</sup> e foram esterilizados em uma autoclave (a uma pressão de  $1,05 \text{ kgf.cm}^{-2}$  e temperatura de 121°C) durante 20 minutos. Os suportes alternativos nos frascos de cultura também passaram pelo mesmo procedimento de esterilização.

Igualmente foram realizados testes com o bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT), mas como não houve respostas positivas, os mesmos não foram discutidos neste trabalho.

**TABELA 22 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA USADOS NOS EXPERIMENTOS (mg.L<sup>-1</sup>).**

	C	E	EG	DEV <sup>1</sup>	DEV <sup>2</sup>	DEV <sup>3</sup>
<b>Macrominerais</b>	MS <sup>4</sup> /2	MS/2	MS/2	MS	MS/2	MS/2
<b>Microminerais</b>	MS/2	MS/2	MS/2	MS	MS/2	MS/2
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	13,9	13,9	13,9	27,8	27,8	27,8
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	18,65	18,65	18,65	37,3	37,3	37,3
<b>Tiamina HCl</b>	10	20	8	1	1	1
<b>Piridoxina HCl</b>	1	1	3,2	1	1	1
<b>Ácido nicotínico</b>	1	1	-	1	1	1
<b>Pantotenato de cálcio</b>	-	-	-	1	1	1
<b>Biotina</b>	-	-	-	0,01	0,01	0,01
<b>Glicina</b>	1	2	-	-	-	-
<b>L-cisteína</b>	-	40	-	-	-	-
<b>Mio-inositol</b>	100	200	100	100	100	100
<b>Adenina sulfato</b>	-	60	-	-	-	-
<b>2,4-D</b>	0,5	-	-	-	-	-
<b>AIB</b>	-	-	-	-	0,5	0,5
<b>IAA</b>	-	-	0,45	-	-	-
<b>2-iP</b>	2	-	-	-	-	-
<b>Cinetina</b>	4	-	-	-	-	-
<b>BA</b>	-	4	0,25	0,3	-	-
<b>Sacarose</b>	30.000	30.000	20.000	30.000	30.000	30.000
<b>Gelrite</b>	1.600	1.600	1.600	-	1.600	-
<b>Phytigel</b>	-	-	-	2.500	-	-
<b>% Bagaço de cana, &lt; 0,18mm</b>	-	-	-	-	-	14.000
<b>pH</b>	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6

C – Meio para indução de calos

E – Meio para indução de embriões e regeneração

EG – Meio para germinação de embriões

DEV<sup>1</sup> – Meio para desenvolvimento dos embriões em explantes e multiplicação conforme Berthouly *et al.*, 1995.

DEV<sup>2</sup> – Meio para enraizamento a base de Gelrite<sup>®</sup> como controle

DEV<sup>3</sup> – Meio para enraizamento modificado com suporte natural, bagaço de cana-de-açúcar

Na fase de enraizamento foram avaliados: o número e comprimento das raízes, percentagem de enraizamento e altura das plântulas, em períodos de 20, 40, 60 e 80 dias. O experimento foi executado com 40 explantes e foi repetido 2 vezes.

Os explantes enraizados *in vitro*, com um tempo de 45 dias, a partir de ambos os suportes foram submetidos à aclimação em uma casa-de-vegetação com irrigação programada (intermitente) e com 40% de intensidade luz natural. A programação da irrigação foi da seguinte forma: a cada 10 min durante 24 h, 5 seg de dispersão. Os explantes originados a partir do suporte alternativo foram diretamente transferidos (com suporte e meio de cultivo). Os explantes originados do meio de Gelrite<sup>®</sup> foram primeiramente retirados do gel, lavados com água corrente, seco com papel toalha. Todos estes explantes foram transferidos para

bandejas de isopor com 128 células contendo como suportes comerciais Plantmax<sup>®</sup>/Vasomax<sup>®</sup> na proporção de 1:3. Avaliaram-se: o tempo gasto para transferir em viveiro com irrigação manual, a formação dos torrões e a taxa de sobrevivência.

Para realizar os cálculos dos custos foram levados em conta, os seguintes componentes: meio de enraizamento, preparo do bagaço (coleta, seleção, lavagem, moagem, tratamento e secagem), lavagem dos explantes originados do meio de Gelrite<sup>®</sup>, tempo de permanência na estufa de aclimatização, tempo de permanência na casa-de-vegetação e os custos de mão-de-obra em geral. Os outros fatores ou os custos ligados à esterilização, aquecimento, iluminação da câmara de crescimento, preço do suporte para aclimatação e demais equipamentos foram desprezados uma vez que os mesmos são iguais em ambos os suportes.

Para um melhor entendimento foram feitas planilhas de cálculo para cada meio de cultura para a obtenção de mudas de café da germoplasma *Catuai Vermelho*.

A atividade de água dos dois meios de cultivo foi determinada usando o equipamento Aqua Lab, CX-2. Os dados foram coletados em intervalos de dez dias, simultaneamente com a coleta dos dados da morfologia dos explantes.

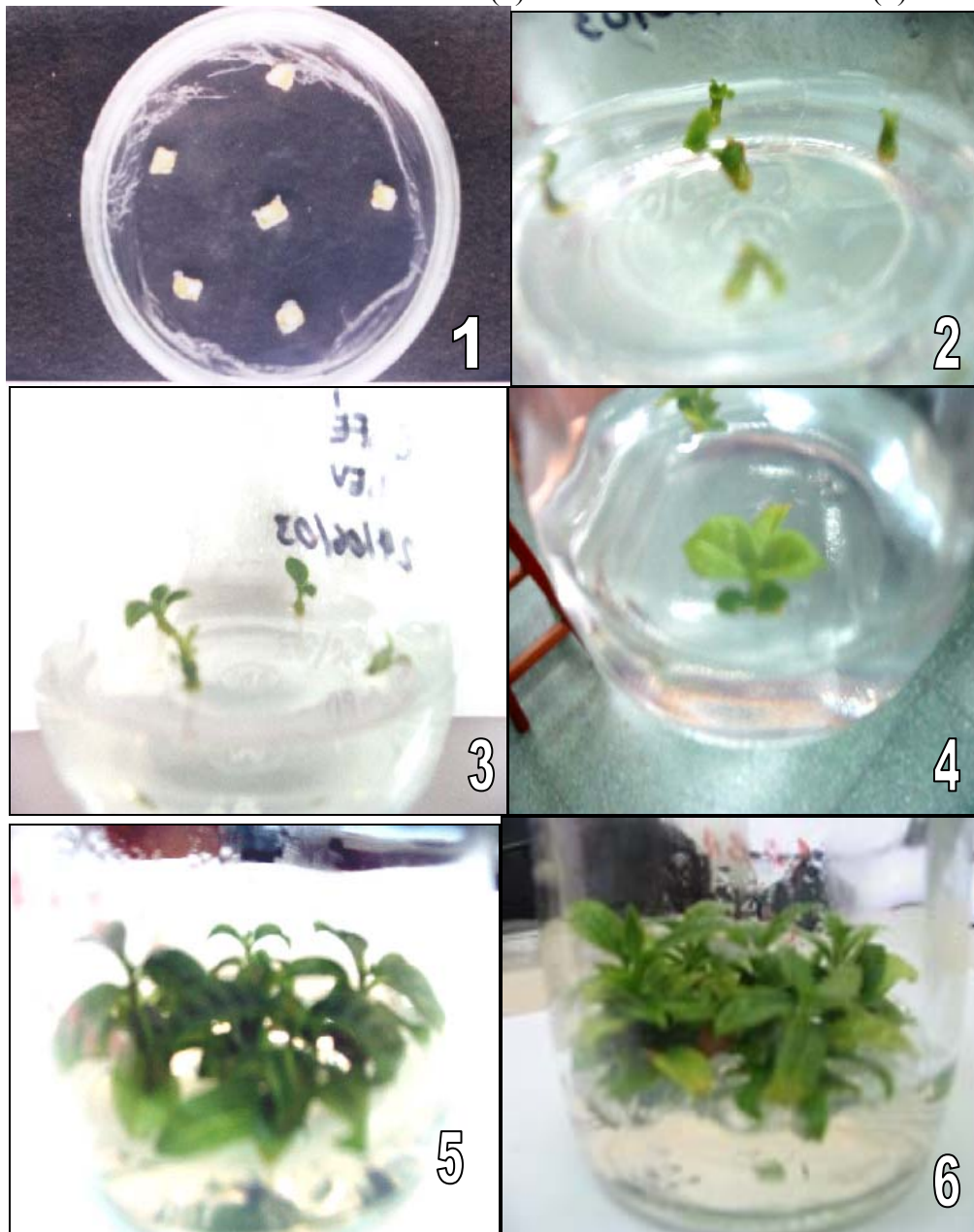
A umidade relativa (RH) dos meios de cultura com o suporte à base de Gelrite<sup>®</sup> e suporte alternativo (bagaço de cana-de-açúcar) foi determinado pelo método termogravimétrico (100-105°C), normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

### **5.3. Resultados e Discussão**

#### **5.3.1. Obtenção de Material Vegetal**

As massas embriogênicas foram obtidas a partir da diferenciação de células dos segmentos foliares. Com este material, foi possível realizar os estudos de enraizamento em suporte de baixo custo, porque possibilitou a obtenção de segmentos caulinares para multiplicação das brotações. A figura 25 demonstra as etapas do processo de embriogênese somática e a obtenção dos brotos *in vitro* em função de tempo (dias).

**FIGURA 25** – INDUÇÃO DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS A PARTIR DE FOLHA DE CAFEIRO DO GERMOPLASMA *CATUAÍ VERMELHO* (1); DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DE CAFÉ, OBTIDOS A PARTIR DOS CALOS DE 1ª SEMANA (2); DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DEPOIS DE 1 MÊS (3) E DEPOIS DE 2 MESES (4); MULTIPLICAÇÃO DAS GEMAS APICAIS A PARTIR DO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES DEPOIS DE 8 SEMANAS (5) E 10 SEMANAS DEPOIS (6).



### 5.3.2. Enraizamento *in vitro* em meio com Gelrite® e meio alternativo com bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT)

Quando foram realizados os testes com café do germoplasma *Catuaí Vermelho* em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar não tratado (BNT), não foram obtidas respostas sobre as quais pudessem ser feitas comparações e discussões, e assim, não foram apresentados os resultados.

A partir dos resultados apresentados na tabela 23, foi observado que no primeiro período de 20 dias não houve nenhuma formação de raízes. Em seguida, no segundo período de 40 dias, o suporte alternativo à base de bagaço induziu mais raízes do que o meio com Gelrite® e obteve uma percentagem maior de enraizamento. Geralmente, tecidos de cafeeiro na fase de enraizamento têm a tendência de gerar uma única raiz (principal) como relatado por SONDAHL *et al.*, (1991) em suporte a base de Gelrite®, raramente esses números são duplicados ou triplicados. Em geral, o tratamento de segmentos caulinares com reguladores de crescimento acelera consideravelmente o processo de enraizamento, e contribui para a produção de um sistema radicular mais adequado ao transplante (GEORGE, 1996). A diferença no número de raízes chegou a 82,00%, apresentando um valor altamente significativo. Esta diferença foi obtida provavelmente devido às melhores condições nutritivas e ambientais (alta porosidade, boa aeração, umidade relativa inicial alta e boa adsorção) fornecido pelo suporte alternativo à base do bagaço de cana-de-açúcar tratado. Durante os experimentos, foram obtidos alguns explantes com duas ou três raízes induzidas influenciando a média final.

**TABELA 23** – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO À BASE DE GEL (GELRITE®) E O MEIO SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COM GRANULOMETRIA < 0,18 MM, QUANTO AO NÚMERO DE RAÍZES FORMADAS E PERCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO COM EXPLANTES DE CAFÉ DO GERMOPLASMA *CATUAÍ VERMELHO*

Tempo (dias)	No. médio de raízes*, Gelrite®	No. médio de raízes*, Sup. alternativo	Diferença em relação à média, (%)	Enraizamento, Gelrite®	Enraizamento, Sup. alternativo
20	-	-	-	-	-
40	1,0± 0,11	1,82± 0,20	82,00	33,34	66,68
60	1,52± 0,18	2,50± 0,08	64,44	66,68	83,35
80	2,01± 0,20	3,40± 0,08	69,15	66,68	83,35

\* média de 6 explantes ± desvio-padrão.

Nos períodos de 60 e 80 dias a diferença se manteve ainda relativamente alta, respectivamente 64,44 e 69,15%. A partir do período de 40 dias começaram a aparecer raízes secundárias, mas mesmo assim no meio a base de Gelrite® o número de raízes foi inferior comparado ao meio a base de bagaço de cana-de-açúcar, explicando assim as altas diferenças das médias. Nestes períodos observarem-se também que a porcentagem do enraizamento aumentou nos dois meios, alcançando 66,68 e 83,35% respectivamente. Mais uma vez, o retardo no enraizamento pode ser causado pela própria característica dos tecidos do cafeeiro, por exemplo, a oxidação fenólica dos explantes e também ao fornecer uma estrutura bastante rígida (SONDHAL *et al.*, 1985). Mas a obtenção de uma porcentagem de enraizamento maior no meio à base de bagaço de cana-de-açúcar deve ser proporcionado pela propriedade porosa do suporte, circulando muito mais oxigênio pelo meio, o qual é essencial na formação e alongamento das raízes conforme relatado por SOFFER e BURGER (1988, 1989).

**TABELA 24** – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO À BASE DE GEL (GELRITE®) E O MEIO SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COM GRANULOMETRIA < 0,18 MM, QUANTO AO COMPRIMENTO DAS RAÍZES FORMADAS COM EXPLANTES DE CAFÉ DO GERMOPLASMA *CATUAÍ VERMELHO*

Tempo (dias)	Comp. médio de raízes*, Gelrite® (cm)	Comp. médio de raízes*, Sup. Alternativo (cm)	Diferença em relação à média, (%)
20	-	-	-
40	1,52± 0,02	1,64± 0,10	34,21
60	2,79± 0,12	3,36± 0,22	20,40
80	4,53± 0,06	4,41± 0,21	- 2,60

\* média de 6 explantes ± desvio-padrão.

Os comprimentos das raízes são apresentados na tabela 24 mostrando que, depois do segundo período, a diferença relativa entre os dois meios foi a mais alta (34,21%), com um ganho significativo para o comprimento das raízes no meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. Conforme o passar do tempo (80 dias) a diferença caiu para -2,60%, mostrando que o crescimento das raízes no meio à base de Gelrite® foi um pouco superior ao meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. Esta inversão deve ser possibilitada devida ao fato que, no meio de enraizamento à base de Gelrite® as raízes formadas e alongadas são geralmente raízes primordiais ou raízes únicas, e assim, elas têm mais chances de se prolongar rapidamente sem dividir as energias absorvidas com as raízes secundárias, que aparecem em um período posterior, conforme pode ser observado na tabela 24. Este efeito pode ainda ser observado na figura 26, mostrando que em A o comprimento da raiz relativa ao meio à base de Gelrite®

chega a ser bem maior que as raízes no meio à base de bagaço de cana-de-açúcar B, mas com maior números de raízes após 45 dias.

**FIGURA 26** – INDUÇÃO DE RAÍZES E CRESCIMENTO DO EXPLANTE DE CAFÉ *IN VITRO* APÓS 45 DIAS DE CULTIVO. A–MEIO COM GELRITE®; A–MEIO ALTERNATIVO (BT).



Uma vez promovido o bom desenvolvimento das raízes – tanto em qualidade quanto em quantidade – segue uma boa absorção e transferência dos nutrientes presentes no meio, que por ser poroso facilita ainda a difusão desses nutrientes. Isso justifica as diferenças de 29,91; 26,00 e 22,44% obtidas no número de novas folhas geradas, respectivamente nos períodos de 40; 60 e 80 dias no meio à base de bagaço de cana-de-açúcar tratado, comparado ao meio à base de Gelrite®, conforme mostra a tabela 25.

**TABELA 25** – COMPARAÇÃO ENTRE MEIO SOLIDIFICADO À BASE DE GELRITE® E O MEIO SUPORTE ALTERNATIVO DE BAGAÇO CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COM GRANULOMETRIA < 0,18 MM, QUANTO AO NÚMERO DAS NOVAS FOLHAS GERADAS (COMPLETAS) NOS EXPLANTES DE CAFÉ DO GERMOPLASMA CATUAÍ VERMELHO

Tempo (dias)	No. médio de folhas*, Gelrite (cm)	No. médio das folhas*, Sup. Alternativo (cm)	Diferença em relação à média, (%)
20	4,00± 0,00	4,00± 0,00	-
40	5,52± 0,12	6,84± 0,11	29,91
60	7,31± 1,21	8,34 ± 0,32	26,00
80	8,51± 0,16	10,42± 0,01	22,44

\* média de 6 explantes ± desvio-padrão.



### 5.3.3. Umidade Relativa (RH) e Atividade de Água (Qw)

A tabela 26 apresenta os dados sobre a umidade relativa (RH) e a atividade de água (Qw) determinada a partir do meio semi-sólido (Gelrite®) e o meio poroso (suporte alternativo) durante o cultivo de explantes de cafeeiro do germoplasma *Catuai Vermelho*. Observa-se que conforme aumenta o tempo de cultivo, a umidade relativa no meio de suporte diminui de 99,4% para 49,9% em 80 dias comparados ao meio com Gelrite®, onde a queda é desprezivelmente menor. Isso ocorre devido a fácil circulação e evaporação do ar no meio à temperatura de cultivo, a qual oscilava em torno de  $24 \pm 2$  °C. Este fenômeno demonstra que há uma boa oxigenação dentro do sistema, a qual pode beneficiar em muito o processo de enraizamento das explantes. Porém, se a análise for feita por cada período de 20 dias, inicialmente observe-se que a queda é menor. Este fenômeno pode ser considerado ótimo, uma vez que na fase inicial de indução e alongamento das raízes uma umidade pouco elevada é necessária. O meio com Gelrite® não apresentou muita perda de umidade porque um dos objetivos do gel é de proteger o meio da desidratação.

A partir dos dados da tabela 26, a atividade de água (Qw) não mostrou novamente nenhuma mudança significativa entre os dois tipos de suporte durante o tempo de cultivo. A atividade só mudou em relação à temperatura de determinação. Sendo assim, a atividade de água não diferiu nos dois tipos de meio testados para a enraizamento *in vitro* dos explantes de café.

**TABELA 26** – APRESENTAÇÃO DE UMIDADE RELATIVA (RH) E ATIVIDADE DE ÁGUA (Qw) NOS DOIS DIFERENTES MEIOS: À BASE DE GELRITE®, E SUPORTE ALTERNATIVO DETERMINADOS DURANTE O CULTIVO *IN VITRO*

Tempo (dias)	Umidade Relativa (%)		Atividade de Água-Qw		
	Gelrite®	Suporte alternativo	Gelrite®	Suporte alternativo	Temperatura (°C)
20	98,9	99,4	0,977	0,933	27,4
40	98,1	90,5	0,973	0,948	23,2
60	94,4	65,3	0,953	0,971	24,1
80	93,2	49,9	0,979	0,965	25,7

### 5.3.4. Estudos de aclimatização

Foram utilizadas plântulas enraizadas no suporte alternativo e no meio contendo Gelrite®. Os resultados são fornecidos na tabela 27 e nas figuras 27, 28 e 29. Apresentou-se um pequeno aumento (8,69%) no número de folhas novas quando comparada com a testemunha (Gelrite®), e uma diferença significativa (33,33%) em relação a percentagem de

aclimatização. Mas a diferença maior foi registrada na formação das mudas com maior quantidade de raízes em menor tempo de permanência na casa-de-vegetação com o explante que foi enraizado no meio alternativo (a figura 29 mostra bem as diferenças entre os dois).

**TABELA 27** – RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE OS DOIS SUPORTES: À BASE DE GELRITE® E À BASE DE BAGAÇO CANA-DE-AÇÚCAR TRATADOS, APRESENTADOS DURANTE A ETAPA DE ACLIMATIZAÇÃO, QUANTO AO NÚMERO DE FOLHAS NOVAS E À PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DOS EXPLANTES DE CAFÉ DO GERMOPLASMA *CATUAÍ VERMELHO*

Tempo (dias)	No. de folhas (média)		Sobrevivência (%)	
	Gelrite®	Sup. alternativo	Gelrite®	Sup. Alternativo
Início	4,0	4,0	75	100
15	6,0	6,2	75	100
30	9,2	10,0	75	100

Também foi observado que nos explantes enraizados em bagaço de cana-de-açúcar tratado, que as pontas das raízes novas apareceram antes no fundo da bandeja do que o outro tratamento (figura não apresentada). Estes fatos mostram que estes explantes podem ser tirados antecipadamente da parte de irrigação intermitente e com baixa luminosidade de luz natural. A formação de torrão é muito importante, porque este garante o momento da transferência do material vegetal da casa-de-vegetação com irrigação para o campo, ou em outros lugares sem sofrer qualquer estresse físico.

As figuras 27 e 28 mostram a diferença das mudas na fase de aclimação após 15 e 30 dias, respectivamente.

**FIGURA 27** – APARÊNCIA DAS MUDAS DE CAFÉ NA ETAPA DE ACLIMATAÇÃO DEPOIS DE 15 DIAS. A – MEIO GELRITE®; B – MEIO ALTERNATIVO.



**FIGURA 28** – APARÊNCIAS DAS MUDAS DE CAFÉ EM ACLIMATAÇÃO DEPOIS DE 30 DIAS, A – MEIO GELRITE®; B – MEIO ALTERNATIVO.



**FIGURA 29** – VISUALIZAÇÃO DOS TORRÕES FORMADOS (RAÍZES E SUBSTRATO) DEPOIS DE 30 DIAS DE PERMANÊNCIA NA CASA-DE-VEGETAÇÃO. A – MEIO GELRITE®; B – MEIO ALTERNATIVO.



### 5.3.5. Estudo Econômico

Para visualizar as vantagens obtidas com a aplicação desta nova tecnologia, por meio de uso de suporte alternativo na fase de enraizamento e na aclimação de explantes em técnicas de micropropagação de café, todos os benefícios parciais foram transformados em

valores representativos (% , R\$). O resumo dos resultados realizados em planilhas de Excel podem ser visualizado na tabela 28.

**TABELA 28** - APRESENTAÇÃO DOS CUSTOS ESTIMADOS PARA ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO PARA 1000 PLANTAS A PARTIR DE MEIOS DE CULTIVO COM DIFERENTES SUPORTES (GELRITE® E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO) COM CAFEIEIRO DO GERMOPLASMA *CATUAÍ VERMELHO*.

Base de cálculo: 1000 plantas	Custo a base de Gelrite® (R\$)	Custo a base de BT (R\$)	Redução em relação ao Gelrite®
			BT (%)
Enraizamento	125,22	67,85	84,56
Aclimatização	----	----	38,00
<b>Redução Total Real %</b>			<b>32,97</b>

A partir dos resultados dos cálculos realizados conforme apresentados na tabela 28, foi possível obter uma diferença de 84,56% para enraizamento de 1000 explantes em relação aos dois diferentes meios, o que significa que para poder enraizar 1000 plantas com sucesso em um meio contendo um suporte alternativo à base de bagaço de cana tratado (BT) resulta em 84,56% mais barato em relação ao enraizamento de 1000 explantes em meio à base de Gelrite® para cafeeiro do germoplasma *Catuai Vermelho*.

Mas os resultados da tabela 28 também mostram que, para a obtenção de 1000 plantas aclimatizadas (clonadas) a partir do suporte alternativo à base de bagaço de cana tratado custa 32,97% menos que 1000 plantas aclimatizadas em um meio à base de Gelrite® para cafeeiro do germoplasma *Catuai Vermelho*. Lembrando que estes valores são valores estimados, e não apresentam valores exatos e que esta clonagem não é para lavoura comercial mas para clonagem de genótipos híbridos para pequena escala. As planilhas para o cálculo dos preços e reduções são apresentadas nas planilhas em anexo III: 1 e 2.

#### **5.4. Conclusões**

A aclimação de explantes de cafeeiro do germoplasma *Catuaí Vermelho*, previamente enraizados em suporte alternativo à base de bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT), reduziu os custos parcialmente em 38,00% quando comparado com explantes previamente enraizados em meio de cultivo à base de Gelrite<sup>®</sup>. Na fase de enraizamento, os custos no meio à base de Gelrite<sup>®</sup>, foram 86,56% menor que no meio à base de bagaço de cana-de-açúcar tratado (BT).

Estes custos são devido aos elevados preços dos componentes usados na formulação dos meios de cultivo convencionais, perdas e dificuldades das técnicas e além de tudo má qualidade dos produtos finais.

## REFERÊNCIAS

- ABECAFÉ (Associação Brasileira de Exportadores de Café). Relatório anual 2004. São Paulo, 2004.
- ABIC (Associação Brasileira de Indústrias de Café). Relatório de atividades - 1ª semestre 2005. São Paulo, 2005.
- ASCANIO, C.; ARCIA, M. Haploids from anther culture in *Coffea arabica* L. In: International Congress of Plant Tissue-Culture Tropical Species, 1987, Bogotá-Colombia. Anals...Bogotá-Colombia: UCV-FA, 1987.p.68.
- BERTHOULY, M.; DUFOUR, M.; ALVARD, D.; CARASCO, C.; ALEMANNI, L.; TEISSON, C. Coffee micropropagation in liquid medium using temporary immersion technique. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16., 1995, Kyoto. Anals...Paris: ASIC, 1995. p. 514-519.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Plant Cell Tissue and Organ Cult., n.44, p.169-176, 1996.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae, Amsterdam, n.14, p.335-345, 1981.
- DUBLIN, P. Techniques de reproduction vegetative *in vitro* et amelioration genétique chez les caféiers. Café, Cacao, Thé, n.28: p.231-244, 1984.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture, Part 2- In Practice. Edington: Exegetics Limited, p.671-732, 1996.
- HERMAN, E. B.; HAAS, G.J. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. Hort Sci., v.10, p.588-589, 1975.
- IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná). Relatório Anual 2004. Paraná, 2004.
- Instituto Adolfo Lutz (IAL). Métodos químicos e físicos para análise de alimentos normais. Normas analíticas de Instituto Adolfo Lutz, p.189-192; p.195-196, São Paulo, 1985.
- LANAUD, C. Production de plantules de *Coffea canephora* par embryogenèse somatique réalisée à partir de culture *in vitro* d'ovules. Café Cacao Thé. v.XXV, n.4, p.231- 236, 1981.
- JESUS, A.M.S.; DE CARVALHO, S.P.; PASQUAL, M.; CRAVALHO, M.; DUTRA, L.F. Micropropagação do cafeeiro com concentrações de BAP em meio de pré-cultivo e de BAP e TDZ em meio de subcultivo. Revista Ceres, v.49, n.283, p.253-263, 2002.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N.; DUBLIN, P.; SCHWENDIMAN, J. Etude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L. Café Cacao Thé v.XXXI, n.2, p.103-110, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. Plant Cell Reports v.10, n.12, p.608-612,1992.

PIERSON, E.S.; VAN LAMMEREN, A.A.M.; SCHEL, J.H.N.; STARITSKY, G. *In vitro* development embryoids from punched leaf discs of *Coffea arabica*. Protoplasma, v.115, p.208-216, 1983.

SOFFER, H.; BURGER, D.W. Studies on plant propagation using the aero-hydroponic method. Acta Hort., v.230, p.261-269, 1988.

SOFFER, H.; BURGER, D.W. Plant propagation using the aero-hydroponic systems. Hort. Science, n.24, p.154, 1989.

SONDAHL, M.R.; BRAGIN, A. Somaclonal variation as a breeding tool for coffee improvement. In: Conf. Coffee Science, 14th, 1991, San Francisco-USA. ASIC. San Francisco-USA: ASIC, 1991. p.701-710.

SONDAHL, M.R.; MARTINS, I.S. Early stages of somatic embryo differentiation from callus cells of bean (*Phaseolus vulgaris*) grown in liquid medium. Journal of Plant Physiology, v.117, p.97-103, 1984a.

SONDAHL, M.R.; MARTINS, I.S. Multiple shoot formation from shoot apex cultures of *Phaseolus vulgaris* L. Journal of Plant Physiology, v.115, p.205-208, 1984b.

SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation of coffee. In: HENKE, R.R; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, W.J.; HOLLAENDER, A. (eds). Tissue Culture in Forestry and Agriculture. New York: Plenum Press, 1985. p.15-22.

SONDAHL, M.R.; SALISBURY, J.I.; SHARP, W.R. Characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. Zeitschrift fur Pflanzenphysiol. v.94, p.185-188, 1979.

SONDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured Leaf explants of *Coffea arabica* L. Zeitschrift fur Pflanzenphysiol. v.81, p.39-40, 1977.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Botanica Neerlandica v.19, n.4, p.509-514, 1970.

YASUDA, T.; FUJI,Y.;YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Phvsiol. v.26, n.3, p.595-597,1985.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados mostraram a possibilidade da utilização do bagaço de cana-de-açúcar, tratado (BT) como não tratado (BNT) em técnicas de micropropagação, porém novas investigações e otimizações devem ser realizadas para que se possa utilizar esta técnica inovadora de maneira mais ampla em escala comercial. Assim, podem ser sugeridos trabalhos futuros, entre esses:

- Realizar os mesmos experimentos avaliando a interferência na adição de carvão ativado nos meios de cultivo contendo suporte à base de ágar e Gelrite®;
- Realizar os mesmos experimentos ao nível industrial e realizar estudos de custo-benefício comparando com o processo com meio comercial;
- Testar com outras espécies micropropagadas (bananeira, cana-de-açúcar, eucaliptos, videira, orquídeas, etc.);
- Estudar o comportamento das plantas a partir destes suportes na fase de crescimento exterior (estufa, canteiro e campo);
- Desenvolver um biorreator específico para a produção comercial de mudas utilizando a técnica desenvolvida;
- Testar outros tipos de resíduos agro-industriais (sabugo de milho, farelo de soja e outros) como um suporte alternativo, com as mesmas espécies vegetais aqui utilizadas;
- Misturar o material com outros (compostos orgânicos), e estudar o seu efeito em técnicas de micropropagação.



## Anexo I

### I - PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGAR PARA ENRAIZAMENTO *IN VITRO* (PARA 1000 EXPLANTES)

Meio de enraizamento de macieira-meio Espécie vegetal: Marubakaido comercial (ágar).

Quantidade:	500ml	* =fator de divisão do meio		
Compostos	Conc. Solução (ml)	estoque	Quantidade da Solução estoque	Preço parcial (US\$)
Sais: veja anexo I		A	41,25 g	2,26875
MS*		B	47,5 g	2,85
* = 2		C	2,5 g	0,125
		D	2,5 g	0,125
		E	2,5 g	0,125
		F	2,5 g	0,125
Vitaminas:		A	0,25 mg	0,0325
		P	0,25 mg	0,37
		T	0,05 mg	0,117
		G	1 mg	0,159
Outros:				
AIB		0,1 mg/ml	0,05 mg	0,254
Mio-inositol		50 Mg	0,05 g	0,0225
Açúcar:				
SACAROSE			15 g	0,75
Ágar :				
plant ágar			3,5 g	0,98
Preço (US\$)			Preço total	5,499 US\$
				15,124 R\$\$
Cotação de dólar:	2,75		Número das plantas enraizadas com sucesso:	70
		Fator de correção em relação % de enraizamento:		0,20
Meio suficiente p/ 14 frascos = 1 frasco contém 5 plantas		15,124 R\$\$		

**Preço para 1000 explantes: 259,20 R\$\$**

Obs. Nesta planilha de cálculo foram relacionados apenas os custos ligados à composição do meio e percentagem de enraizamento com sucesso

**II – PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA PARA ENRAIZAMENTO *IN VITRO* À BASE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, NÃO TRATADO (BNT) E TRATADO (BT) (PARA 1000 PLANTAS).**

Meio de enraizamento de macieira -bagaço Espécie vegetal:		Marubakaido	
<b>BNT e BT</b>			
Quantidade :	500ml	* = fator de divisão do meio	
Compostos	Conc. Solução estoque (ml)	Quant. da Solução estoque	Preço parcial
Sais: veja anexo I	A	41,25 g	2,26875
MS*	B	47,5 g	2,85
* = 2	C	2,5 g	0,125
	D	2,5 g	0,125
	E	2,5 g	0,125
	F	2,5 g	0,125
Vitaminas:	A	0,25 mg	0,0325
	P	0,25 mg	0,37
	T	0,05 mg	0,117
	G	1 mg	0,159
Outros:			
AIB	0,1 mg/ml	0,05 mg	0,254
Mio-inositol	50 Mg	0,05 g	0,0225
Açúcar:			
SACAROSE		15 g	0,75
Preço (US\$)		Subtotal	4,51 US\$
Suporte: Partículas < 0,18 mm		Preço total:	12,45 R\$\$
BNT - bagaço não tratado		35 g 0,045	1,575 R\$\$
BT - bagaço tratado		35 g 0,085	2,975 R\$\$
Cotação de dólar: 2,75			
<b>Parte de Enraizamento</b>			
		Preço: 1000 explantes	<b>200,36 R\$\$</b>
		BNT	
Meio suficiente p/ 14 frascos = 1 frasco contém 5 plantas			<b>220,36 R\$\$</b>
		BT	
Número das plantas enraizadas com sucesso: 70			
<b>Parte aclimatização</b>			
<b>% de redução de custos estimativos comparados à base de Ágar, relativa aos:</b>		BNT	BT
Mão de obra de manipulação dos explantes	%	4,00	4,00
Consumo de materiais e água	%	6,00	8,00
Consumo de energia (eletricidade, bomba de água, sistema de ventilação)	%	3,00	8,00
% de plantas aclimatizados com sucesso	%	24,00	24,00
<b>ReduçãoTotal (%)</b>	<b>%</b>	<b>37,00</b>	<b>44,00</b>
<b>% de redução de tempo estimativa comparada à base de Ágar,relativa aos:</b>		BNT	BT
Tempo de permanência na câmara de cultivo in vitro		<b>3,00</b>	<b>6,00</b>
Manipulação dos explantes	%	4,00	4,00
Transporte de in vitro para ex vitro	%	3,00	3,00
Tempo de permanência com irrigação intermitente	%	20,00	20,00
Tempo de permanência com irrigação manual	%	25,00	25,00
<b>ReduçãoTotal (%)</b>	<b>%</b>	<b>55,00</b>	<b>58,00</b>
<b>% de redução de custos estimativos comparados à base de Ágar, relativa aos:</b>		BNT	BT
Preço de produção de 1000 explantes enraizados com sucesso	%	<b>29,36</b>	<b>17,63</b>
Redução total (%) para aclimaçãode 1000 plantas com sucesso	%	<b>37,00</b>	<b>44,00</b>
<b>ReduçãoTotal Real (%) para a produção de 1000 plantas aclimatizadas:</b>	<b>%</b>	<b>16,20</b>	<b>14,09</b>
<i>Obs. Nesta planilha de calculo foram relacionados os custos ligados à composição do meio e percentagem de enraizamento com sucesso, % de aclimaçãoe custos</i>			

## Anexo II

### I – PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGAR PARA ENRAIZAMENTO DE 1000 EXPLANTES PARA MORANGUEIRO cv. CAMAROSA

Componente	Vol. p/ 500 mL	Conc. estoque	Massa p/ 500 mL	Preço por grama	Preço parcial
SAIS MS	(mL)	(mg/mL)	(mg)	US\$/g	US\$
A	10	82,5	825	4,07E-02	0,0336
B	10	95	950	5,00E-02	0,0475
C	2,5	variada	Variada	Variado	0,0055
D	2,5	88	220	4,19E-02	0,0092
E	2,5	variada	Variada	Variado	0,0077
F	2,5	variada	Variada	Variado	0,0026
<b>VITAMINAS</b>					
A	5	0,05	0,25	5,44E-02	0,0000
P	5	0,05	0,25	6,80E-01	0,0002
T	5	0,01	0,05	3,18E-01	0,0000
G	5	0,2	1	3,63E-02	0,0000
<b>OUTROS</b>					
Mio inositol			50	1,97E-01	0,0099
AIB	1,25	0,1	0,125	2,47E+00	0,0003
<b>ACÚCAR</b>					
Sacarose			15000	2,83E-02	0,2745
<b>Cotação do dólar</b>	R\$ 2,75				
				<b>Subtotal</b>	<b>0,39</b>
<b>SUPORTE</b>					
Plant agar			3200	2,813E-01	0,90
				<b>Total (R\$)</b>	<b>3,55</b>
<b>OBS.</b>					
500 mL meio = 14 frascos					
1 frasco = 5 plantas			<b>Custo para produzir</b>		
Número média de plantas enraizadas com sucesso:			<b>1 planta enraizada (R\$):</b>		<b>0,05</b>
70			<b>1000 plantas enraizadas (R\$):</b>		<b>50,71</b>
% média de plantas aclimatizadas:			71		
Obs. Nesta planilha de calculo foram relacionados apenas os custos ligados na composição do meio e percentagem de enraizamento com sucesso					

**II – PLANILHA DE CÁLCULO COMPARATIVO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA E DE PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE 1000 EXPLANTES ENRAIZADOS E ACLIMATIZADOS À BASE DE MISTURA BAGAÇO DE MANDIOCA/CANA-DE-AÇÚCAR (40/60%) E ÁGAR PARA MORANGUEIRO cv. CAMAROSA**

Componente	Vol. p/ 500 mL	Conc. estoque	Massa p/ 500 mL	Preço por grama	Preço parcial
SAIS MS	(mL)	(mg/mL)	(mg)	US\$/g	US\$
A	10	82,5	825	4,07E-02	0,03358
B	10	95	950	5,00E-02	0,04750
C	2,5	variada	Variada	variado	0,00548
D	2,5	88	220	4,19E-02	0,00922
E	2,5	variada	Variada	variado	0,00773
F	2,5	variada	Variada	variado	0,00265
<b>VITAMINAS</b>					
A	5	0,05	0,25	5,44E-02	0,00001
P	5	0,05	0,25	6,80E-01	0,00017
T	5	0,01	0,05	3,18E-01	0,00002
G	5	0,2	1	3,63E-02	0,00004
<b>OUTROS</b>					
Mio inositol			50	1,97E-01	0,00985
AIB	1,25	0,1	0,125	2,47E+00	0,00031
KOH	14	0,1 N	78,40	2,40E-02	0,00188
Carvão ativado			1000	4,00E-02	0,04000
<b>AÇÚCAR</b>					
Sacarose			15000	1,83E-02	0,27450
<b>Cotação do dólar</b>	R\$ 2,75				
				<b>Subtotal</b>	<b>0,43</b>
<b>SUPORTE</b>	Mistura bagaço de mandioca/cana (40/60)				
Quantidade de massa p/ 500mL:			<b>40.000</b>	6,50E-02	2,60
	Bagaço de Cana(g)		24.000		
	Mandioca (g)		16.000		
				<b>Total (R\$)</b>	<b>3,79</b>
<b>OBS:</b>					
500 mL meio = 20 frascos			<b>Custo para produzir</b>		
1 frasco = 5 plantas			<b>1 planta enraizada (R\$):</b>		<b>0,04</b>
Número de plantas enraizadas com sucesso:			<b>1000 plantas enraizadas (R\$):</b>		<b>30,32</b>
	100				
<b>% de redução de custos estimativas comparado à base de Agar, relativa aos:</b>					
Mão de obra de manipulação dos explantes				%	4,00
Consumo de materiais e água				%	6,00
Consumo de energia (luz, bomba de água, sistema de ventilação).				%	3,00
% de plantas aclimatizados com sucesso				%	30,00
<b>Redução Total (%)</b>				%	<b>43,00</b>
<b>% de redução de tempo estimativa comparada à base de Agar, relativa aos:</b>					
Manipulação dos explantes				%	5,00
Transporte de in vitro para ex vitro				%	4,00
Tempo de permanência com irrigação intermitente				%	25,00

Tempo de permanência com irrigação manual		%	35,00
<b>Redução Total (%)</b>		%	69,00
<b>% de redução de custos estimativos comparados à base de Agar, relativa aos:</b>			
Preço de produção de 1000 explantes enraizados com sucesso		%	<b>43,36</b>
Redução total (%) para aclimação de 1000 plantas com sucesso		%	<b>43,00</b>
<b>Redução Total (%) para a produção de 1000 plantas aclimatizadas:</b>		<b>%</b>	<b>21,60</b>
Obs: redução estimativa de preço de 1000 plantas aclimatizadas no meio de suporte alternativo			
comparado ao meio à base de ágar para cv. <i>Camarosa</i>			

### Anexo III

#### I – PLANILHA DE CÁLCULO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA À BASE DE GELRITE PARA ENRAIZAMENTO DE 1000 EXPLANTES DE CAFEIEIRO VAR. CATUAÍ VERMELHO

Componente	Vol. p/ 500 mL	Conc. estoque	Massa p/ 500 mL	Preço por grama	Preço parcial
SAIS MS (1/2)	(mL)	(mg/mL)	(mg)	US\$/g	US\$
A	5	82,5	412,5	4,07E-02	0,0168
B	5	95	475	5,00E-02	0,0238
C	1,25	variada	variada	variado	0,0027
D	1,25	88	110	4,19E-02	0,0046
E	1,25	variada	variada	variado	0,0039
F	2,5	variada	variada	variado	0,0026
VITAMINAS					
A	0,5	1	0,5	5,44E-02	0,0000
P	0,5	1	0,5	6,80E-01	0,0003
T	0,5	1	0,5	3,18E-01	0,0002
Pantotenato Ca ++	0,5	1	0,5	2,29E-01	0,0001
OUTROS					
Biotina	0,5	0,01	0,005	3,86E+01	0,0002
Mio inositol			50	1,97E-01	0,0099
AIB	2,5	0,1	0,25	2,47E+00	0,0006
AÇÚCAR					
Sacarose			15000	1,83E-02	0,2745
				Subtotal	0,3402
SUPORTE					
Gelrite			1600	6,24E-01	0,99
Cotação do dólar	2,75			Total (R\$)	3,68
500 mL meio = 25 frascos					
1 frasco = 1 planta					
				Custo	para
				produzir	
Número de plantas enraizadas com sucesso: 25				1 planta (R\$)	0,15
				1000 plantas	
				(R\$):	125,22

Obs. Nesta planilha de cálculo foram relacionados apenas os custos ligados à composição do meio e percentagem de enraizamento com sucesso

**II – PLANILHA DE CÁLCULO COMPARATIVO DOS CUSTOS DO MEIO DE CULTURA E DE PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE 1000 EXPLANTES ENRAIZADOS E ACLIMATIZADOS À BASE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO E GELRITE DE CAFEEIRO VAR. CATUAÍ VERMELHO**

Componente	Vol. p/ 500 mL	Conc. Estoque	Massa p/ 500 mL	Preço por grama	Preço parcial
SAIS MS	(mL)	(mg/mL)	(mg)	US\$/g	US\$
A	5	82,5	412,5	4,07E-02	0,0168
B	5	95	475	5,00E-02	0,0238
C	1,25	Variada	variada	variado	0,0027
D	1,25	88	110	4,19E-02	0,0046
E	1,25	Variada	variada	variado	0,0039
F	2,5	Variada	variada	variado	0,0026
VITAMINAS					
A	0,5	1	0,5	5,44E-02	0,0000
P	0,5	1	0,5	6,80E-01	0,0003
T	0,5	1	0,5	3,18E-01	0,0002
Pantotenato Ca ++	0,5	1	0,5	2,29E-01	0,0001
OUTROS					
Biotina	0,5	0,01	0,005	3,86E+01	0,0002
Mio inositol			50	1,97E-01	0,0099
AIB	2,5	0,1	0,25	2,47E+00	0,0006
KOH	14	0,1 N	78,40	2,40E-02	0,00188
Carvão ativado			750	4,00E-02	0,03000
AÇÚCAR					
Sacarose			15000	1,83E-02	0,2745
Cotação do dólar:	2,75			Subtotal	0,37
				R\$	
Bagaço de cana de açúcar tratado - BT			35000	0,10	3,50
				Total (R\$)	4,52
500 mL meio = 50 frascos					
1 frasco = 1 planta					
Número de plantas enraizadas com sucesso:	50			Custo para produzir	
				1 planta (R\$):	0,09
				1000 plantas (R\$):	67,85
<b>% de redução de custos estimativos comparado à base de gelrite, relativa aos:</b>					
Mão de obra de manipulação dos explantes				%	4,00
Consumo de materiais e água				%	6,00
Consumo de energia (luz, bomba de água, sistema de ventilação)				%	3,00
% de plantas aclimatizadas com sucesso				%	25,00
<b>Redução Total (%)</b>				<b>%</b>	<b>38,00</b>
<b>% de redução de tempo estimativa comparada à base de Gelrite, relativa aos:</b>					
Manipulação dos explantes				%	4
Transporte de invitro para ex vitro				%	3
Tempo de permanência com irrigação intermitente				%	25
Tempo de permanência com irrigação manual				%	30
<b>Redução Total (%)</b>				<b>%</b>	<b>62</b>
<b>% de redução de custos estimativos comparados à base de Gelrite, relativa aos:</b>					
<b>Preço de produção de 1000 explantes enraizados com sucesso (aumento)</b>				<b>%</b>	<b>84,56</b>
<b>Redução total (%) para aclimatação de 1000 plantas com sucesso</b>				<b>%</b>	<b>38,00</b>
<b>Redução Total (%) para a produção de 1000 plantas aclimatizadas:</b>				<b>%</b>	<b>32,97</b>

Obs. Nesta planilha de calculo foram relacionados apenas os custos ligados à composição do meio e percentagem de enraizamento com sucesso

**Anexo IV:****Meio Murashige e Skoog (1962): COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE**

Soluções estoque	Sais	Conc. final (mg/L)	Quantidade para 500 mL (g)	Quantidade para preparar 1 L de meio
A	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	41,25	20 ml
B	$\text{KNO}_3$	1900	47,50	20 mL
C	$\text{H}_3\text{BO}_3$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ KI $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,2 170 0,83 0,25 0,025	0,62 17,00 0,083 0,025 0,0025	5 mL
D	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	44,00	5 mL
E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	370 22,30 8,6 0,025	37,00 2,23 0,86 0,0025	5 mL
F	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Na <sub>2</sub> EDTA	27,80 37,30	2,78 3,73	5 mL



**“The best model of a cat is another cat, or, better, the cat him self”**

**N. WIENER**