

Alternativa Biotecnológica para Produção de Mudanças de *Aloe vera* L.

Biotechnological Alternative for the Seedlings Production of *Aloe vera* L.

Gabriella Silva Oliveira Souza Ciano^a; Eldo Ciano da Silva^a; Ludmilla Calixto Nery^b; Karolina Silva Leite de Santana^c; Gabriella Silva Leite de Santana^d; Mariane de Jesus da Silva da Silva de Carvalho^e; Weliton Antônio Bastos de Almeida^c

^aCentro Universitário Maria Milza, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente. BA, Brasil.

^bCentro Universitário Maria Milza, Programa de Graduação Stricto Sensu em Enfermagem. BA, Brasil.

^cCentro Universitário Maria Milza. BA, Brasil.

^dCentro Universitário Maria Milza, Programa de Graduação Stricto Sensu em Fisioterapia. BA, Brasil.

*E-mail: ludmillacalixto2@gmail.com

Resumo

Espécies medicinais como a babosa (*Aloe vera* L.) requerem otimização do seu cultivo *in vitro* por meio do estabelecimento de protocolos eficazes de micropropagação, que supram carências da demanda no mercado farmacêutico e cosmético, favorecendo a diversidade biológica da babosa. Frente a isso, o objetivo deste trabalho foi ajustar uma metodologia de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de plantas de babosa. As gemas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio comercial e água (1:1) e inoculadas em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) suplementado com ácido naftalenoacético (ANA) (0,2 mg L⁻¹) e 6-benzilaminopurina (BAP) (3,0 mg L⁻¹). Após o estabelecimento *in vitro*, na fase de multiplicação, as brotações obtidas foram transferidas para meio MS, acrescido de 0,2 mg L⁻¹ de ANA em diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹). No estudo, as gemas axilares desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio e água, durante 20 minutos, e inoculadas em meio MS com 0,2 mg L⁻¹ de ANA e 3,0 mg L⁻¹ de BAP, apresentaram a maior porcentagem de explantes responsivos e isentos de contaminação em comparação com aquelas desinfestadas por 15 minutos. Por meio das características avaliadas, os maiores valores médios de altura da planta e número de brotos foram alcançados na ausência e na menor concentração testada de BAP, respectivamente.

Palavras-chave: Fitocosméticos. Cultura de Tecidos. Fitoterápicos. Multiplicação *In Vitro*. Babosa.

Abstract

Medicinal species such as *aloe vera* (*Aloe vera* L.) require optimization their *in vitro* cultivation through establishment of effective *in vitro* micropropagation protocols, which supply shortages in demand in the pharmaceutical and cosmetic market, favoring the aloe biological diversity. In view of this, the objective of this work was to adjust a methodology of establishment for *in vitro* multiplication of aloe plants. The yolks were disinfected in commercial sodium hypochlorite solution and water (1: 1) and inoculated in Murashige & Skoog (MS) culture medium supplemented with naphthaleneacetic acid (NAA) (0.2 mg L⁻¹) and 6-benzylaminopurine (BAP) (3.0 mg L⁻¹). After the *in vitro* establishment, in the stage of multiplication, the shoots obtained were transferred to MS medium, plus 0.2 mg L⁻¹ of ANA and different concentrations of BAP (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mg L⁻¹). In the study, axillary shoots disinfected in sodium hypochlorite and water solution (1: 1), for 20 minutes and inoculated in MS medium with 0.2 mg L⁻¹ of ANA and 3.0 mg L⁻¹ of BAP, presented the highest percentage of responsive and contamination-free explants, compared to those disinfected for 15 minutes. Through the evaluated characteristics, the highest average values of plant height and number of shoots were achieved in the absence and in the lowest concentration tested of BAP, respectively.

Keywords: *Phytocosmetics. Tissue Culture. Phytotherapics. In Vitro Multiplication. Aloe Vera.*

1 Introdução

Entre as espécies de interesse medicinal e econômico se destaca a *Aloe vera* L., *Asphodelaceae*, conhecida popularmente como babosa, utilizada comumente em aplicações tópicas, em função de seus efeitos contra problemas dermatológicos (SOUZA; NEVES; ALVES, 2020). A espécie é utilizada tanto em cosméticos quanto fitoterápicos, sendo estes últimos os mais utilizados e extraídos das folhas.

Essa planta possui propriedades medicinais importantes tais como ação: hidratante, antioxidante, antimicrobiana, e anti-inflamatória, o que a torna muito conhecida (BRITO *et al.*, 2021).

Seus benefícios terapêuticos são conhecidos pelos povos mais antigos, há milhares de anos, mas somente a partir do

século XX tais benefícios foram comprovados cientificamente (QUEIROGA, 2019).

Atualmente, a espécie tem sido empregada em cosmética na produção de xampu e, principalmente, no tratamento de queimaduras (BRITO *et al.*, 2021). Vale destacar que antes da etapa de obtenção da forma farmacêutica, creme e xampu, suas folhas passam por processos padronizados e/ou farmacopeicos, a fim de produzir o derivado vegetal, podendo ocorrer na forma de extrato e tintura, entre outros (BRASIL, 2012).

A babosa possui grande potencial nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos e a demanda, por matéria-prima de alta qualidade desta espécie, aumenta a cada ano. Desse modo, a adição da oferta necessita de expansão nas

áreas de cultivo (CIANO *et al.*, 2021). Atualmente, a matéria-prima de *Aloe vera* L. é importada, pois no Brasil, a espécie é cultivada em propriedades de pequeno e médio portes, que são ineficientes no fornecimento de matéria-prima em larga escala. Nesse contexto, a demanda se torna aquém, quando comparada com a produção internacional. Consoante a isso, a propagação vegetativa convencional não apresenta potencial suficiente para suprir a demanda do mercado, sendo considerada lenta e de baixo rendimento (SILVA; DEBIASI; PESCADOR, 2007; MOLSAGHI; MOIENI; KAHRIZI, 2014).

Por conseguinte, considerando que grande parte dos estudos desenvolvidos, no Brasil, voltados para a produção de babosa não têm fornecido suporte e incentivo para o seu cultivo, são necessários mais estudos de propagação. Assim, a multiplicação *in vitro* é uma opção que precisa ser otimizada por meio do desenvolvimento de protocolos eficazes com o intuito de suprir a carência de resultados quanto aos métodos de propagação e técnicas de cultivo em larga escala para uso comercial (CIANO *et al.*, 2021).

Além disto, o estabelecimento de um protocolo eficiente de cultivo *in vitro* favoreceria o estímulo ao desenvolvimento de ações e de pesquisas inovadoras, visando a descoberta de novas moléculas nessa espécie. A confiança adquirida por meio da produção, em larga escala de matéria-prima de qualidade, aliada ao cultivo *in vitro* de materiais isentos de patógenos, em um local controlado e acessível, facilitará sua multiplicação e disponibilidade, sempre que necessário (CIANO *et al.*, 2021).

Desse modo, contribuirá para o sucesso da cadeia produtiva dos fitoterápicos, que por sua vez, quando comparados aos sintéticos, apresentam menor custo para a população. Esta garantia otimizada colabora com a visão industrial de redução de custos e lançamento de novos produtos em um curto período de tempo.

Logo, frente a esta perspectiva, o estudo teve como objetivo ajustar uma metodologia de multiplicação *in vitro* de plantas de babosa (*Aloe vera* L.) de forma a facilitar esse processo e obter mudas em quantidade e de qualidade para atender a demanda de produção de fitoterápicos e fitocosméticos.

2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Saúde do Centro Universitário Maria Milza (UNIMAM), Governador Mangabeira, Bahia. Como material vegetal foram utilizadas as gemas axilares oriundas de plantas de babosa (*Aloe vera* L.) em bom estado sanitário e fisiológico, coletadas em uma residência no município de Muritiba, Recôncavo da Bahia.

O primeiro experimento consistiu de estabelecimento *in vitro* de gemas axilares. Os explantes foram excisados com auxílio de bisturi, mantidos em recipiente contendo água destilada e, posteriormente, sob condições de câmara de fluxo laminar, submetidos à desinfestação por imersão em álcool a 70% por 3 minutos sob agitação constante. Posteriormente,

procedeu-se a imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial contendo 2,5% de cloro ativo e água destilada autoclavada (1:1), durante 15 (Tratamento 1) e 20 minutos (Tratamento 2), seguida do processo de tríplice lavagem, em câmara de fluxo laminar com água destilada autoclavada.

Após a desinfestação, as gemas foram introduzidas em frascos contendo 35 ml de meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com ANA (Ácido Naftalenoacético, 0,2 mg L⁻¹) e BAP (6-benzilaminopurina, 3,0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem, com base nos resultados obtidos por Liao *et al.* (2004). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μMm⁻²s⁻¹.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, analisando dois tempos de desinfestação. Foram utilizadas cinco repetições, sendo a parcela experimental constituída por um frasco contendo três gemas.

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se para cada tempo de desinfestação a porcentagem de contaminação por fungos, bactérias e de oxidação dos explantes, bem como o percentual de explantes responsivos, que adaptaram ao meio de cultivo e conseguiram desenvolver raízes e folhas verdes.

O segundo experimento foi estabelecido a partir das brotações de 1,0 cm de tamanho obtidas ao final do primeiro experimento. Essas brotações foram subcultivadas em meio de cultivo, contendo a mesma composição citada anteriormente e transferidas para frascos contendo 35 ml de meio de cultivo MS, acrescido de ANA (0,2 mg L⁻¹), em combinação com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; e, 4,0 mg L⁻¹). Após a inoculação, os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob condições descritas para o primeiro experimento.

O delineamento experimental para o segundo experimento foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 5 (três subcultivos e cinco concentrações distintas de BAP), com 5 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental representada por um frasco com 35 ml de meio de cultivo, contendo três explantes com aproximadamente 1,0 cm de tamanho.

Os brotos foram submetidos à multiplicação por meio de três subcultivos sucessivos com intervalo de 30 dias de cultivo, nas mesmas condições descritas acima. Para tanto, a cada replicagem foram avaliadas as características: altura de planta (AP), número de brotos (NB), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e presença de raiz em cada broto.

Os dados resultantes das avaliações dos dois experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste F e Tukey a 5% de probabilidade, para os dados do primeiro e segundo experimentos, respectivamente. Para as concentrações de BAP

não foi possível o ajuste de modelos de regressão polinomial significativos e com alto R². Os dados das variáveis NB e NFV foram transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da ANOVA. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 2004).

3 Resultados e Discussão

3.1 Desinfestação e estabelecimento *in vitro* dos explantes

No primeiro experimento, (Quadro 1), observou-se que o tratamento de desinfestação (T2) utilizado para o estabelecimento *in vitro* dos explantes foi bastante eficiente, uma vez que 90% dos explantes foram responsivos, sem ocorrência de contaminações, apresentando apenas 10% de explantes oxidados. Em T1 ocorreu menor porcentagem de explantes responsivos (40%), 30% oxidados e 30% do número total de explantes foram contaminados. Este resultado está em consonância com Silva, Debiassi e Pescador (2007), que obtiveram taxa de sobrevivência de 93,33% utilizando ápices meristemáticos isolados de brotações laterais de babosa por 1 minuto em solução de álcool 70% e 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio 40%. Os autores testaram tempos de imersão de 5, 10 e 20 minutos e constataram que o aumento do tempo de imersão dos explantes nas soluções de hipoclorito de sódio e de álcool demonstrou melhores resultados quanto à eliminação dos agentes de contaminação (fungos e bactérias).

Quadro 1 - Efeito do tratamento de desinfestação de gemas axilares de *Aloe vera* L., em função de diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio 2,5%, aos 30 dias de inoculação *in vitro* dos explantes

	Tratamento 1 (15 minutos)	Tratamento 2 (20 minutos)
Explantes responsivos	40%	90%
Explantes oxidados	30%	10%
Explantes contaminados	30%	0%

Fonte: dados da pesquisa.

Diniz *et al.* (2008) ressaltam que as altas taxas de oxidação obtidas, em pesquisa com *Spathiphyllum wallisi*, foram possivelmente causadas pelo tempo de exposição ao álcool. Frente a isto, o presente trabalho visou minimizar o tempo de contato dos explantes em álcool (3 minutos).

Andrade, Luz e Lacerda (2000) citam que a liberação dos compostos fenólicos na cultura *in vitro*, é responsável pela oxidação, que comumente ocorre por meio de danos provocados às células durante a excisão dos explantes. A oxidação fenólica é causada pela reação das polifenoxidases, que por sua vez levam à produção de substâncias tóxicas, capazes de alterar a absorção de metabólitos, resultando em prejuízos significativos para o desenvolvimento dos explantes (CAMOLESI *et al.*, 2007). No caso da babosa, a abundância dos compostos fenólicos afeta o seu crescimento *in vitro*, promovendo principalmente o escurecimento dos explantes (ABRIE; VAN STADEN, 2001).

Portanto, no presente trabalho se buscou utilizar carvão ativado no meio de cultura, uma vez que o carvão ativado apresenta elevada heterogeneidade superficial e porosidade, além de um papel eficaz na adsorção de compostos orgânicos de baixo peso molecular, como os fenóis (PODKOSCIELNY; NIESZPOREK; SZABELSKI, 2006).

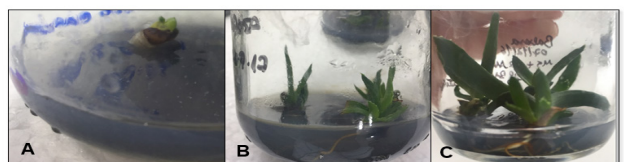
Dwivedi *et al.* (2014) obtiveram explantes de babosa livres de contaminação após serem desinfestados, superficialmente, por meio da imersão em Bavistin a 0,15% por 5 minutos, posteriormente, em álcool etílico (70%), em seguida, em solução de cloreto de mercúrio a 0,1% durante 5 minutos, e por fim três enxágues em água destilada autoclavada. Já Kumar *et al.* (2017) procederam a desinfestação superficial dos explantes em água corrente, contendo detergente a 2% e, posteriormente, em solução aquosa de cloreto de mercúrio a 0,1% (p/v) durante 20 minutos seguido por quatro lavagens com água destilada autoclavada, alcançando 90% de explantes isentos de contaminação.

Diferente do trabalho em questão, a presença de oxidação não foi detectada por Abrie e Van Standen (2001), quando os explantes de *Aloe polyphylla* foram postos em contato com álcool 70% por dois minutos, seguido de hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos, obtendo uma desinfestação eficiente das sementes inoculadas *in vitro*, resultando em 100% de plantas saudáveis sem sintomas de oxidação.

Quanto ao meio de cultivo para o estabelecimento *in vitro* dos explantes (Figura 1), utilizou-se MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e 3,0 mg L⁻¹ de BAP, sendo possível evidenciar que na concentração de BAP 3,0 mg L⁻¹ houve um melhor desenvolvimento dos explantes, com baixo índice de folhas senescentes e alta porcentagem de enraizamento. Desse modo, corroboram com os estudos realizados por Brito *et al.* (2021), que no estabelecimento *in vitro* de babosa utilizaram o meio de cultivo MS adicionado de BAP nas concentrações de 3,0 e 4,0 mg L⁻¹, registrando porcentagem de sobrevivência de explantes de 70% e 72%, respectivamente.

Os trabalhos de Gupta *et al.* (2014) e Molsaghi, Moieni e Andkahrizi (2014) ratificam os benefícios do emprego de combinações de reguladores vegetais na micropropagação de babosa, alcançando taxas de multiplicação de 1:9,5 a 1:58, respectivamente, em meio de cultivo MS com adição de 1,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de ANA e em meio MS com 4,0 mg L⁻¹ BAP e 1,0 mg L⁻¹ de ácido indolacético (IAA).

Figura 1 - Estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de *Aloe vera* L. em meio de cultivo MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e 3,0 mg L⁻¹ de BAP. A) gemas intumescidas aos 10 dias de cultivo *in vitro*. B) desenvolvimento de brotos aos 30 dias de cultivo *in vitro*. C) múltiplas brotações aos 45 dias de cultivo *in vitro*



Fonte: dados da pesquisa.

3.2 Multiplicação *in vitro* da *Aloe vera* L.

Em relação à análise de variância para os fatores avaliados (Tabela 2), observa-se que a interação número de subcultivo x concentração de BAP foi significativa apenas para variável AP e que os subcultivos realizados promoveram efeito significativo para NB. Para altura da planta e número de brotos, as concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultivo apresentaram efeito significativo.

Quadro 2 - Resumo da análise de variância para altura da planta (AP), em cm, número de brotos (NB) e número de folhas verdes (NFV) de plantas de *A. vera* L. cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante três subcultivos sucessivos de 30 dias.

Fonte de Variação	Quadrado Médio			
	GL	AP	NB	NFV
Subcultivos (SUB)	2	0,42 ^{ns}	0,28 ^{**}	1,11 ^{ns}
BAP	4	4,44 ^{**}	0,22 [*]	0,93 ^{ns}
SUB x BAP	8	1,60 ^{**}	0,08 ^{ns}	0,70 ^{ns}
Erro	56	0,20	0,07	0,40
CV (%)		17,41	17,79	21,65
Média geral		2,59	1,88	8,53

^{**},^{*}significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F. ns não significativo a 5% de probabilidade.

Fonte: dados da pesquisa.

Quanto à altura das plantas, o segundo subcultivo apresentou valor médio superior aos demais (4,31), em plantas cultivadas em meio de cultivo MS sem adição de BAP, sendo considerado o maior valor médio de AP, em relação aos valores observados nos três subcultivos e nas diferentes concentrações de BAP.

Além disso, não houve diferenças significativas entre os subcultivos, quando as plantas foram cultivadas em meio MS com 1,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BAP (Quadro 3). Em relação às concentrações de BAP, no primeiro subcultivo se observou uma constância nos resultados; no entanto, no segundo e terceiro subcultivos a não suplementação do meio de cultura com o regulador vegetal BAP apresentou as maiores alturas de planta, 4,15 cm no segundo subcultivo e 3,48 cm no terceiro subcultivo (Figura 2). A Figura 3 evidencia esses resultados em plantas de *A. vera* L. cultivadas em meio MS na ausência do regulador BAP, apresentando plantas com altura satisfatória e folhas verdes bem vigorosas.

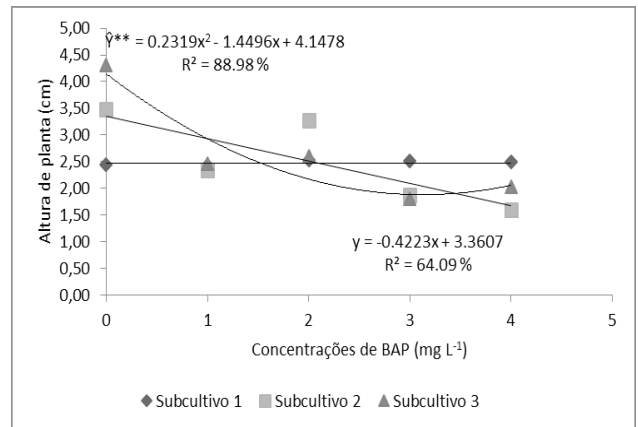
Quadro 3 - Efeito de subcultivos, em diferentes concentrações de BAP, na altura das plantas (cm) de *Aloe vera* L., cultivadas *in vitro* com intervalos de 30 dias cada.

Subcultivos	Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)				
	0	1	2	3	4
1	2,45 c	2,43 a	2,53 b	2,51 a	2,50 a
2	4,31 a	2,46 a	2,59 b	1,80 a	2,03 ab
3	3,48 b	2,35 a	3,28 a	1,87 a	1,60 b

Médias seguidas pelas mesmas letras na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

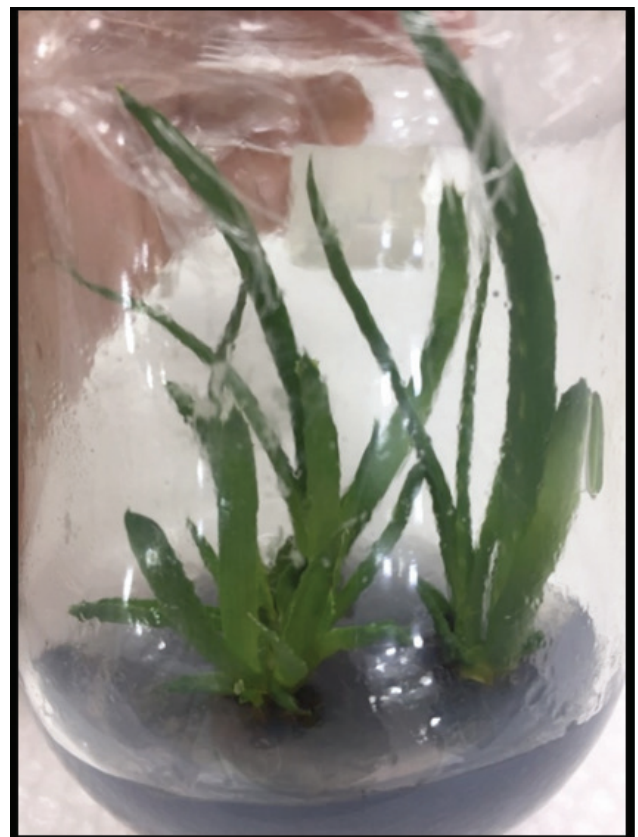
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 2 - Efeito de concentrações de BAP, em três subcultivos, sob a altura das plantas (cm) de *Aloe vera* L., cultivados *in vitro* com intervalos de 30 dias



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 3 - Plantas de *Aloe vera* L., cultivadas *in vitro* em meio de cultivo MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e ausência de BAP, aos 30 dias de cultivo *in vitro*



Fonte: dados da pesquisa.

A pesquisa realizada por Silva, Debiasi e Pescador (2007) apresenta resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, como os autores observaram que a ausência de BAP no meio de cultivo MS proporcionou melhor desenvolvimento da altura de novos brotos de babosa em três, dos seis subcultivos realizados. Estes resultados são semelhantes com o estudo de Machado *et al.* (2006), em que o efeito do BAP na altura das plantas do porta-enxerto de videira VR043-43 foi negativo, principalmente, quando os autores utilizaram

as maiores concentrações (5,0 e 10,0 mg L⁻¹), enquanto na ausência, os valores para AP resultados foram maiores. Resultado semelhante foi observado por Mhatre, Salunkhe e Rao (2000), em que as brotações de *Vitis vinifera* não tiveram alongamento satisfatório, quando cultivadas em meio de cultura suplementado BAP, sendo necessária uma inclusão de uma etapa de alongamento na pesquisa.

Por outro lado, Brum, Silva e Pasqual (2002), trabalhando com *Ficus carica* L. obtiveram os melhores resultados de altura das plantas quando adicionaram apenas BAP no meio de cultivo em concentrações entre 2,0 e 4,0 mg L⁻¹. Ao utilizar ANA, menores valores de altura foram encontrados, principalmente, quando o meio foi adicionado de 0,2 mg L⁻¹ de ANA.

Em relação ao número de brotos (NB), constatou-se que nos subcultivos realizados (Quadro 4), a maior média foi observada no segundo subcultivo, sendo que no primeiro, apresentou diferença significativa em relação ao segundo, independente da concentração de citocinina.

Quadro 4 - Valores médios do número de brotos de mudas de *Aloe vera* L. cultivadas *in vitro* durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada

Subcultivos	Médias
1	1,51 b
2	2,32 a
3	1,84 ab

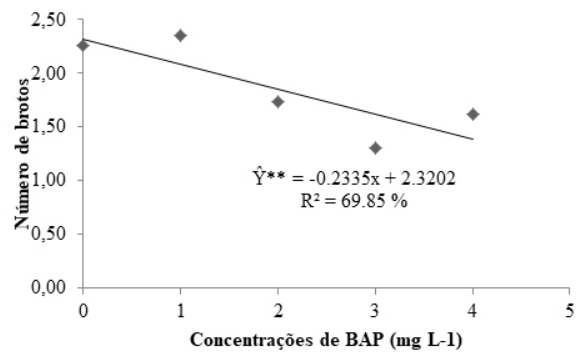
Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: dados da pesquisa.

No que se refere à influência das concentrações de BAP no NB (Figura 4), é possível observar um comportamento linear decrescente, indicando que o aumento da concentração de BAP no meio de cultivo, principalmente, a partir de 1,0 mg L⁻¹, provocou uma redução no NB. Supostamente, isso pode ter ocorrido devido ao efeito residual da citocinina presente no meio de cultivo desde a fase de estabelecimento *in vitro*.

Apesar da citocinina BAP promover a indução de brotações, os resultados sugerem que o aumento significativo das concentrações deste regulador no meio de cultivo pode ser considerado negativo na multiplicação *in vitro* de babosa. Além disso, constatou-se desenvolvimento de brotos no meio de cultivo sem adição de BAP e, isto pode ter ocorrido em função de que durante a fase de estabelecimento *in vitro* dos explantes, o meio de cultivo utilizado continha citocinina ou em função da presença de níveis hormonais endógenos nos explantes.

Figura 4 - Número de brotos de mudas de *Aloe vera* L. cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP, aos 30 dias de cultivo *in vitro*



Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados de Silva, Debiassi e Pescador (2007) se assemelham ao descrito neste trabalho, uma vez que o meio nutritivo na ausência de suplementação de reguladores vegetais promoveu as maiores taxas de brotos em babosa. Segundo os autores, em casos assim, os explantes apresentam níveis hormonais endógenos suficientes para se diferenciarem e formarem novos brotos. Com base em Oliveira (2001), em sua pesquisa sobre bananeira tetraploide, subcultivos sucessivos de explantes em meios nutritivos com concentrações elevadas de BAP também promovem redução da taxa de multiplicação.

Lima e Moraes (2006) citam, em seu trabalho, sobre a bananeira que, quando suplementaram o meio de cultivo com o BAP, nos dois últimos subcultivos foi perceptível menores taxas de multiplicação, sugerindo que este decréscimo ocorreu em consequência do acúmulo da citocinina no explante, e que um modo de estimular as brotações seria alternando entre altas e baixas concentrações da citocinina.

No presente estudo, as mudas de plantas obtidas apresentaram poucas folhas senescentes, uma ou no máximo quatro, sendo que no primeiro e no último subcultivo a maioria dos tratamentos não apresentou folhas senescentes. No experimento sem adição de BAP e no de menor concentração do mesmo, a senescência foi constante (Quadro 5).

Quadro 5 - Folhas senescentes de mudas (%) de *Aloe vera* L., cultivadas *in vitro* em meio de cultivo MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante três subcultivos, de 30 dias cada

Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)	Folhas senescentes (%)		
	Subcultivo 1	Subcultivo 2	Subcultivo 3
0	16,7	20,0	26,7
1	6,7	13,3	13,3
2	0,0	0,0	0,0
3	0,0	6,7	0,0
4	0,0	0,0	0,0

Fonte: dados da pesquisa.

A senescência é um desarranjo metabólico que se destaca como um grande limitante na multiplicação *in vitro* de muitas espécies vegetais (BARRUETO CID, 2005; LIM; NAM,

2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Em suma, os processos que ocorrem na senescência foliar são controlados e geneticamente programados pelas ações coordenadas em níveis celulares, de tecidos, órgãos e organismo (LIM; NAM, 2007). No trabalho em questão, o aumento de folhas senescentes teve como fator determinante o tempo de cultivo, o qual proporcionou o envelhecimento da planta.

No entanto, o principal fator que interfere no processo de senescência é o balanço entre os reguladores vegetais, em especial os da classe das citocininas e auxinas. A redução da concentração desses reguladores nos órgãos maduros tende a desencadear a senescência foliar (WINGLER *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2007). O descrito pelos autores condiz com os resultados aqui apresentados para a senescência foliar, uma vez que se utilizou a combinação de uma citocinina (BAP) e uma auxina (ANA), ocorrendo na ausência de BAP a maior senescência foliar.

Analisando as plantas a cada subcultivo de 30 dias, verificou-se que as maiores porcentagens de enraizamento ocorreram no primeiro e segundo subcultivos (Quadro 6), quando se utilizou 3,0 mg L⁻¹ de BAP no meio nutritivo, assim como na ausência de BAP no primeiro subcultivo. Na medida em que foram sendo realizados os subcultivos, percebeu-se que essa concentração de BAP (3 mg L⁻¹) foi a que as plantas apresentaram maior porcentagem de enraizamento.

Quadro 6 - Porcentagem de número de brotos enraizados de *Aloe vera* L., cultivados *in vitro* em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP durante três subcultivos sucessivos de 30 dias cada

Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)	Enraizamento (%)		
	Subcultivo 1	Subcultivo 2	Subcultivo 3
0	73	27	17
1	6	47	25
2	66	0	27
3	100	70	40
4	0	0	0

Fonte: dados da pesquisa.

Frente a isto se pode inferir que houve um equilíbrio entre a concentração da auxina e da citocinina na indução do enraizamento, quando ocorreu a adição de 3,0 mg L⁻¹ de BAP no meio nutritivo. Esses resultados contradizem Xavier, Wendlig e Silva (2009), que afirma que o equilíbrio entre os fitoreguladores auxinas e citocininas é uma relação primária no cultivo *in vitro*, uma vez que a alta relação entre estas duas classes contribui para o enraizamento, uma baixa relação favorece a formação de brotos e um elevado nível dessas promove a formação de calos.

As plantas de babosa com desenvolvimento adequado tanto das partes aérea, quanto radicular, cultivadas em meio de cultivo MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e 3,0 mg L⁻¹ de BAP (Figura 5) indica que essas podem ser submetidas ao processo de aclimação.

Figura 5 - Desenvolvimento de raízes em planta de *Aloe vera* L. cultivada em meio de cultura MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e 3,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 30 dias de cultivo *in vitro*



Fonte: dados da pesquisa.

A vitalidade das partes aéreas obtidas na multiplicação *in vitro*, os níveis de auxinas endógenas, as concentrações de auxinas exógenas e o tempo de contato do explante com este tipo de regulador, assim como a presença de carvão ativado, no meio de cultivo, e condições ambientais, são alguns dos fatores determinantes para o enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998; MORAES *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2004; SOUZA; PEREIRA, 2007). Entretanto, são poucos os trabalhos que demonstram o efeito do BAP como fundamental no enraizamento de brotos, conforme descrito neste trabalho.

Considerando que o carvão ativado atua na exclusão da luz e retenção de substâncias tóxicas expelidas pelos explantes, torna-se uma alternativa benéfica no crescimento de raízes *in vitro*, uma vez que esse é um estimulador na formação de raízes. (PASQUAL; CHALFUN; RAMOS, 2001). Desse modo, o estudo em questão visou otimizar o enraizamento das plantas e a redução da oxidação dos explantes, utilizou além do ANA, o carvão ativado no meio de cultura na etapa de multiplicação, no entanto, percebeu-se que a presença desse contribuiu na minimização dos efeitos oxidativos dos compostos fenólicos nos explantes de babosa.

4 Conclusão

A desinfestação de gemas axilares em solução de hipoclorito de sódio 2,5% e água durante 20 minutos se mostrou uma estratégia eficiente para o estabelecimento *in vitro* de explantes mais responsivos de *A. vera*.

Para multiplicação *in vitro* de *A. vera*, os maiores valores médios de AP e NB foram alcançados na ausência e na menor concentração (1,0 mg L⁻¹) de BAP, respectivamente.

O meio de cultivo MS contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA e 3,0 mg L⁻¹ de BAP demonstrou ser um excelente meio para multiplicação *in vitro* de babosa, uma vez que foram obtidas mudas das plantas com formação de raiz e bem desenvolvidas, podendo essas serem submetidas ao processo de aclimação de mudas micro propagadas de babosa.

Referências

- ABRIE, A.L.; VAN STADEN, J. Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. *Plant Growth Regul.*, v.33, p.19-23, 2001. doi: 10.1023/A:1010725901900.
- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). *Ciênc. Agrotecnol.*, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.261-296.
- BARRUETO CID, L. P. Citocininas em plantas superiores: síntese e propriedades fisiológicas. In: BARRUETO CID, L.P. *et al.* – *Hormônios vegetais em plantas superiores*. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 58-79, 2005.
- BRASIL. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2012. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- BRITO, C.F. *et al.* Otimização de protocolo para micropropagação de *aloe vera* L. (babosa). *Rev. Vale do Rio Verde*, v. 20, n. 2, 2021.
- BRUM, G.R.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). *Ciênc. Agrotecnol.*, v.26, p.1403-9, 2002.
- CIANO, G.S. *et al.* Efeito do seccionamento de explantes no cultivo *in vitro* de babosa (*Aloe vera*). *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.21, p.92-97, 2021.
- CAMOLESI, M.R. *et al.* Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira ‘maçã’. *Ciênc. Agrotec.*, v.31, n.4, p.1237-1241, 2007.
- DINIZ, J.D.N. *et al.* Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. *Rev. Ciênc. Agron.*, v.39, p.107-113, 2008.
- DWIVEDI, N.K., A. *et al.* A protocol for micropropagation of *Aloe vera* L. (Indian Aloe): a miracle plant. *Res. Biotechnol.*, v.5, p.1-5, 2014.
- GUPTA, S. *et al.* Propagation of *vera* (L.) Burm. f. *Br. Biotechnol. J.*, v.4, p.806-816, 2014. doi: 10.9734/BBJ/2014/9747.
- KUMAR, M. *et al.* *In vitro* morphogenesis of *Aloe vera*: The “Medicinal Wonder” Plant. *J. Med. Plants Studies*, v.5, n.6, p.130-134, 2017.
- LIAO, Z. *et al.* Micropropagation of endangered Chinese *aloe*. *Plant Cell Tiss. Org.*, v.76, p.83-86, 2004. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1025868515705>.
- LIM, P.O.; NAM, H. G. Aging and Senescence of the Leaf Organ. *J. Plant Biol., Pavia*, v.50, p.291-300, 2007. doi: <https://doi.org/10.1007/BF03030657>.
- LIMA, J.D.; MORAES, W.S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa AAA* cv. CAPIRA). *Pesq. Agropec. Trop.*, v.36, p.181-186, 2006.
- MACHADO, M. P. *et al.* Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera* *Vitis rotundifolia*). *Ciênc. Agrotec.*, v.30, p.648-655, 2006. doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000400009>.
- MHATRE, M.; SALUNKHE, C. K.; RAO, P. S. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards na improved protocol. *Scie. Horticulturæ*, v.84, 2000. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00109-0).
- MOLSAGHI, M.; MOIENI, A.; KAHRIZI, D. Efficient protocol for rapid *Aloe vera* micropropagation. *Pharm. Biol.*, v.52, p.735-739, 2014. doi: <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.868494>.
- MORAES, R.M. *et al.* Micropropagação e banco de germoplasma “*in vitro*” para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A.M.S. (Org.) *Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do cerrado*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2007. p.185-214.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- OLIVEIRA, L.M. de *et al.* Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. *Rev. Bras.Fruticul.*, v.29, p.25-30, 2007. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452007000100008>.
- OLIVEIRA, R. P. *et al.* Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). *Scie. Agrícola*, v.58, p.73-78, 2001. doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000100013>.
- PASQUAL, M; CHALFUN, N.N.J; RAMOS, J.D. *Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações: aplicação na propagação de plantas*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.
- PODKOSCIELNY, P.; NIESZPOREK, K.; SZABELSKI, P. Adsorption from aqueous solution on heterogeneous surfaces of activated carbons – Comparison of experimental data and simulations. *Colloids and Surfaces A: Physicochem, Eng. Aspects*, v.277, p.52-58, 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.10.078>.
- QUEIROGA, V.P. *Aloe vera* (Babosa): Tecnologias de plantio em escala comercial para o semiárido e utilização. Campina Grande: *Revista Eletrônica a Barriguda - AREPB*, 2019.
- SILVA, C.G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.9, p.29-35, 2007.
- SOUZA, A. V. *et al.* Enraizamento *in vitro* de plântulas de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.7, n.1, p.86-91. 2004.
- SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.9, p.103-117, 2007.
- SOUZA, E.A.O.; NEVES, E.A.; ALVES, C.R. Potencial Terapêutico de *Aloe Vera* (*Aloe Barbadensis*): uma breve revisão. *Rev. Virtual Quim.*, v.12, n.2, p.378-388, 2020.
- WINGLER, A. *et al.* Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light: effects on NADH-Dependent Hydroxypyruvate Reductase. *Plant Physiol.*, v.116, p.329-335, 1998. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.116.1.329>.
- XAVIER, A.; WENDLIG, I.; SILVA, R. L. Biologia da propagação clonal. In: XAVIER, A.; WENDLIG, I.; SILVA, R.L. *Silvicultura clonal: princípios e técnicas*. Viçosa, UFV, 2009. p.24-58.