Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Micropropagação e acompanhamento bioquímico, fisiológico e nutricional da
babosa (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) cultivada *ex vitro* em doses de nitrogênio**

Enio Tiago de Oliveira

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de plantas**

Piracicaba
2007

Enio Tiago de Oliveira

Biólogo

Micropropagação e acompanhamento bioquímico, fisiológico e nutricional da babosa (*Aloe vera* (L.) Burm.f.) cultivada *ex vitro* em doses de nitrogênio

Orientador:

Prof. Dr. **LUIZ ANTÔNIO GALLO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Oliveira, Enio Tiago de

Micropropagação e acompanhamento bioquímico, fisiológico e nutricional da babosa (*Aloe vera* (L.) Burm. F.) cultivada *ex vitro* em doses de nitrogênio / Enio Tiago de Oliveira. - - Piracicaba, 2007.
93 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Babosa 2. Bioquímica vegetal 3. Fisiologia vegetal 4. Micropropagação vegetal 5. Nitrogênio 6. Nutrição vegetal I. Título

CDD 633.88432

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Ao meu pai **Jones**, que se foi sem presenciar este feito. Mas é como se nunca tivesse ido porque está sempre presente nas minhas lembranças e nas atitudes que direcionam minha vida.

À minha mãe **Olivia**, que assiste a vitória de mais um de seus nove filhos.

Aos meus irmãos Nailda, Alaide, Eliene, Dinarte, Ana Maria, Neuda, Wildes e Weldner (Léo).

Aos meus sogros Francisco e Mathilde

Aos meus filhos Marcelle e Tiago.

À minha esposa **Joana**, pelo incentivo, apoio, **amor** e paciência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao estimado professor Dr. Luiz Antônio Gallo pela orientação, amizade e confiança durante o curso.

Ao professor Dr. Otto Jesu Crocomo pela amizade, colaboração, incentivo, idéias, pelo máximo que um pai ofereceria ao seu filho.

Ao professor Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres cuja valorização de meu potencial me incentivou ao doutoramento.

Ao Departamento de Ciências do Solo, na pessoa do professor Dr. Godofredo Cesar Vitti pela sugestão e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros do Conselho do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da ESALQ/USP, nas gestões 2003 – 2007, na pessoa de seus respectivos presidentes, professores Dr. Ricardo Ribeiro Rodrigues, Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória e Dra Helaine Carrer pela permissão e incentivo para cursar o doutoramento.

À Comissão de Pós- Graduação do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas nas gestões 2003 – 2007, na pessoa de seus coordenadores professores Dr. Murilo de Melo e Dr. Ricardo Alfredo Kluge pelo apoio ao longo do curso.

Ao Departamento de produção Vegetal, na pessoa do professor Keigo Minami pelo fornecimento de plantas de *Aloe vera*.

Ao colega doutorando Engenheiro Agrônomo Rafael Vivian pelas críticas, sugestões e empenho nas análises estatísticas.

Aos colegas do Departamento de Ciências Biológicas, em especial a Química Valentina de Fátima de Martin, pela amizade e companheirismo.

Aos Biólogos José Elieiton Bispo Vieira, Fabiana Sinicatto, Tatiana Bistaco Farinha e George Rodrigues Lambais do Laboratório de Biotecnologia de Plantas pelo apoio técnico na execução deste trabalho.

Ao setor de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Ciências do Solo da ESALQ/USP, na pessoa de seus responsáveis professores Dr. Antonio Roque Dechen, Dr. Francisco Antonio Monteiro e Dr. Quirino Augusto de Camargo Carmelo pela disponibilização dos laboratórios e aos funcionários do mesmo setor, Bióloga Lúcia Helena Spessotto Pavan Forti, Química Lurdes Aparecida Dário de Gonzalez, Técnicas em Açúcar e Álcool Ednéia Cristina

Scervino Mondoni e Nivanda Maria de Moura Ruiz pelo apoio técnico nas análises dos teores de nutrientes foliares.

Ao Departamento de produção Vegetal, na pessoa do professor Dr. Marcos Silveira Bernardes e o funcionário Marcelo Valente Batista pela disponibilização do laboratório para secagem de material e medidas de áreas foliares.

À MSci Maria Paula Lovadino Crocomo pelas correções do “Abstract” da Tese e do artigo de periódico na Língua Inglesa.

A todos os funcionários da Biblioteca da ESALQ/USP, em especial a Maria da Glória Eloi da Silva, Silvia Maria Zinsly e Eliana Maria Garcia pela revisão das normas técnicas e pelo pronto atendimento ao longo do curso.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram na execução deste trabalho e que de forma injusta não foram citadas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Generalidades da planta.....	11
2.2 Características medicinais de plantas do gênero <i>Aloe</i>	13
2.3 Componentes químicos de natureza medicinal do gênero <i>Aloe</i>	13
2.4 Sistemas de produção de mudas.....	18
2.5 Nutrição mineral.....	23
2.6 O nitrogênio e as plantas.....	24
2.7 Cultivo e nutrição mineral em <i>Aloe</i>	25
2.8 Análise de crescimento.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Local do experimento e espécie.....	28
3.2 Micropropagação.....	29
3.2.1 Estágio I: Isolamento, desinfestação e inoculação dos ápices caulinares.....	29
3.2.2 Estágio II: Multiplicação dos brotos.....	30
3.2.3 Estágio III: Alongamento e enraizamento dos brotos.....	31
3.2.4 Estágio IV: Transplante das microplantas para condições <i>ex vitro</i> (aclimatação).....	31
3.3 Cultivo das plantas em doses de nitrogênio.....	32
3.4 Coleta e preparo das amostras.....	34
3.5 Análise de crescimento.....	39
3.6 Determinação dos teores de nutrientes nas folhas.....	41
3.7. Determinação dos teores de proteínas totais solúveis (PTS).....	41
3.8 Determinação dos teores de açúcares totais solúveis (ATS).....	42

3.9 Determinação dos teores de açúcares redutores (AR).....	42
3.10 Análises estatísticas.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Desinfestação dos ápices caulinares.....	43
4.2 Transplante das microplantas para condições <i>ex vitro</i> (aclimação).....	47
4.3 Efeito de doses de nitrogênio e tempo de cultivo sobre os teores de macronutrientes.....	54
4.4 Efeito de doses de nitrogênio e tempo de cultivo sobre os teores de micronutrientes.....	60
4.5 Efeito de doses de nitrogênio e tempo de cultivo sobre os teores de proteínas totais solúveis, açúcares redutores e açúcares totais solúveis.....	63
4.6 Efeito das doses de nitrogênio e tempo de cultivo sobre o crescimento das plantas.....	66
5 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	81

RESUMO

Micropropagação e acompanhamento bioquímico, fisiológico e nutricional da babosa (*Aloe vera* (L.) Burm.f.) cultivada *ex vitro* em doses de nitrogênio.

A babosa (*Aloe vera* (L.) Burm. f.), família Asphodelaceae, reconhecida e explorada mundialmente pela indústria farmacêutica e cosmética devido aos princípios medicinais de seus compostos fenólicos e principalmente ao gel de polissacarídeos específicos, foi submetida a dois experimentos interligados. O primeiro, refere-se a micropropagação no qual foram avaliados tratamentos de desinfestação de ápices caulinares, multiplicação *in vitro* e condições de aclimação *ex vitro*. O segundo experimento refere-se ao cultivo das plantas em areia lavada e irrigada com solução nutritiva, em condições controladas de casa de vegetação, onde foram testados os efeitos de doses (105; 210 e 315 ppm) de nitrogênio avaliados aos 90; 180 e 270 dias de cultivo. Os efeitos foram avaliados em função dos teores foliares dos macronutrientes e dos micronutrientes boro, cobre, ferro manganês e zinco, de proteínas totais solúveis (PTS), de açúcares redutores (AR) e açúcares totais solúveis (ATS) e sobre o crescimento por meio do índice de área foliar (IAF), da taxa de assimilação líquida (TAL), taxa de crescimento relativo (TCR), taxa de crescimento absoluto (TCA) e incrementos de massas de matérias fresca (IMMF) e seca (IMMS). Todos os dados foram analisados estatisticamente. Em relação a micropropagação, a eficiência de desinfestação foi aumentada em torno de 40% na obtenção de ápices caulinares verdes em início de brotação quando as plantas colhidas a campo foram previamente desinfestadas por lavagem com solução de hipoclorito de sódio com 0,5% de cloro ativo ou com solução de dicloroisocianurato de sódio (Sumaveg[®]) 0,66%. p.v⁻¹ e os ápices caulinares submetidos a imersões alternadas nas soluções dos dois produtos utilizados. A fase multiplicativa da micropropagação em meio MS apresentou um rendimento de 1:5,3 a cada intervalo de 30 dias de multiplicação. A partir de 136 ápices caulinares desinfestados, verdes, em início de brotação, foram obtidas 40.495 microplantas. Classificadas em pequenas, médias e grandes, foram submetidas a condições de aclimação observando-se que bandejas de 64 células com 40 cm³ de substrato apresentaram economia em torno de 50% de substrato e em espaço físico na casa-de-vegetação com micro-aspersão e exaustão de ar em sistema “pad-house”, e durante o processo de aclimação e transporte das microplantas aclimatadas. Em relação ao cultivo das plantas em doses de nitrogênio, apesar de algumas variáveis responderem melhor à dose de 105 ppm e outras à dose de 315 ppm, a dose de 210 ppm de nitrogênio favoreceu as melhores respostas para os teores de açúcares totais solúveis (504,21 mgATS.g⁻¹ de MMS), que são diretamente relacionados ao conteúdo de polissacarídeos específicos, de interesse comercial da cultura de *Aloe vera*. Esses teores, por sua vez, foram propiciados pelos melhores valores de IAF, TCA, IMMF e IMMS, todos observados aos 270 dias de cultivo, ratificando a significância do fator tempo e da dose de 210 ppm de nitrogênio no cultivo dessa espécie vegetal.

Palavras chave: *Aloe vera*; Micropropagação; Desinfestação; Aclimação, Nutrição; Proteínas; Açúcares; Polissacarídeos; Índice de área foliar; Taxa de assimilação líquida; Taxa de crescimento relativo; Taxa de crescimento absoluto; Incremento de massa de matéria fresca; Incremento de massa de matéria seca

ABSTRACT

Micropropagation and biochemical, physiological and nutritional aspects of *Aloe vera* (L.) burm.f cultivated *ex vitro* under nitrogen rates

Aloe vera (L.) Burm. f., family Asphodelaceae, worldwide renowned and explored by pharmaceuticals and cosmetics industries due to its phenolics bearing medicinal principles and mainly to the specific polysaccharides present in the gel, was submitted to two interlinked experiments. The first one refers to apical shoot micropropagation evaluating different disinfection treatments of the explants, the *in vitro* bud multiplication and *ex vitro* acclimatization of the microplants. The second one refers to cultivation in greenhouse of the micropropagated plants in washed sand and irrigated with nutritive solution, in the presence of three nitrogen rates (105, 210 and 315 ppm); the plant material was harvested at 90-, 180- and 270-day. All data were statistically analyzed. The effects of nitrogen were evaluated on the content of the macronutrients, the following micronutrients: B, Cu, Fe, Mn and Zn and total soluble proteins, reducing sugars, total soluble sugars; the growth of the *Aloe vera* plants was measured through the foliar area index, the rate of liquid assimilation, rates of relative and absolute growth and increases in the fresh and dry weights. In regards to micropropagation, the efficiency of the disinfection process was increased by 40% when the plants harvested in the field were previously washed either with sodium hypochloride (0.5% active chlorine) solution or sodium dichloroisocyanurate (Sumaveg[®]) 0.66% w.v⁻¹ solution and the apical shoots explants were afterwards alternatively treated with the two disinfectants. The multiplication phase in MS medium showed a rate of 1:5.3 of microplant production at each 30-day interval with a production of 40.495 microplants out of the 136 initial disinfected apical shoots. The microplants were classified as small, medium and large plants and acclimatized in polyethylene trays bearing 64 cells with 40 cm³ of substrate each cell, a 50% saving in terms of substrate amount and free space in the greenhouse equipped with micro-aspiration irrigation, pad-house and air exhaustion systems and also in the transport of the acclimatized microplants. In regards to the effect of nitrogen rates on the development of *Aloe vera* plants, besides the fact that the best responses were observed either to 105 ppm or 315 ppm nitrogen by some variables, at 210 ppm nitrogen rates the best result was obtained for total soluble sugars (504.21 mg.g⁻¹DW); the sugars are directly related to specific polysaccharides of *Aloe vera* and are of great importance for the industries. On the other hand, these values were favored by the best values reached by the physiological variables studied in this work at 270-day validate the significance of the time factor and the 210 ppm N rates in the *Aloe vera* production system.

Keywords: *Aloe vera*; Micropropagation; Disinfection; Acclimatization; Plant nutrition; Proteins; Sugars; Polysaccharides; Index of foliar area; Rate of liquid assimilation; Rate of relative growth; Rate of absolute growth; Increase in fresh matter weight; Increase in dry matter weight.

1 INTRODUÇÃO

Aloe vera (L.) Burm.f., pertencente à família Asphodelaceae (SOUZA; LORENZI, 2005), é popularmente conhecida no Brasil como babosa. O gênero *Aloe* compreende mais de 300 espécies catalogadas (HARDING, 1979), contudo, poucas espécies como *Aloe vera*, *Aloe ferox* (Cape aloés) e *Aloe perryi* Baker (Aloe da ilha de Socotra), têm sido exploradas pelas indústrias farmacêutica e cosmética (MAPP; McCARTHY, 1970; MORTON, 1961).

A planta possui folhas ensiformes, carnosas, lanceoladas, medindo de 0,5 a 0,9 m de comprimento e 0,05 a 0,1 m de largura na sua base e margens serrilhadas com espinhos triangulares curtos e espaçados (CORRÊA, 1984). As folhas do gênero *Aloe* funcionam como verdadeiros reservatórios de água, sendo a suculência de suas folhas e o metabolismo ácido das crassuláceas responsáveis pela sua natureza xerófila (NI et al., 2004). Segundo esse mesmo autor, essas folhas consistem de duas partes, uma externa verde, denominada “rind”, constituída basicamente pela epiderme, parênquima clorofiliano e feixe vascular, e outra interna, com parênquima mucilaginoso, espesso, denominado de polpa ou gel da folha.

Segundo Reynolds e Dweck (1999), apesar de introduzida e naturalizada em diferentes regiões como oeste da Índia e Bahamas, sul dos EUA, México, América Central e Arábia, sua provável origem tenha sido nas ilhas Canárias, Madeira, Cabo Verde ou no norte da África.

Inúmeras atividades biológicas têm sido estudadas e atribuídas a *Aloe vera*, particularmente ao gel da polpa de suas folhas. Entre elas, atividades antiviral, antibacteriana e antifúngica, laxante, antiinflamatória, proteção contra radiação, tratamentos contra queimaduras, estimulante do sistema imunológico, aceleração em cicatrizações de feridas, tratamento de edemas, adjuvante no tratamento de artrites, problemas gastrintestinais, úlceras, diabetes e até mesmo alguns tipos de câncer (REYNOLDS; DWECK, 1999).

Os princípios medicinais do gênero *Aloe*, até agora identificados, são atribuídos a compostos fenólicos e polissacarídicos. Entre os vários compostos fenólicos, destacam-se as aloínas (barbaloína e isobarbaloína), aloe-emodina, aloenina, aloesina, aloeresina e isoaloeresina (OKAMURA et al., 1996; PARK et al., 1998). Quanto aos polissacarídeos, são polímeros constituídos principalmente de manose com ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$. Entre os principais, destaca-se um polissacarídeo cujos resíduos de manose são acetilados e, por isso, denominado comercialmente de ‘acemanan’ (LEUNG et al., 2004).

A produção comercial e industrial de *Aloe vera* vem crescendo drasticamente em consequência do respaldo de resultados científicos publicados nos últimos anos. A matéria prima industrial tem sido obtida basicamente de plantações norte-americanas nos estados do Texas e Flórida, México, Costa Rica, Venezuela e Austrália. Essa matéria prima é processada, industrializada e exportada para várias partes do mundo (REYNOLDS; DWECK, 1999).

Uma das principais etapas da cadeia produtiva refere-se à produção de mudas, na maioria das vezes produzidas convencionalmente por meio de reprodução vegetativa com aproveitamento de perfilhos. Esse sistema proporciona uma intensa propagação de pragas e doenças que infestam a planta mãe, de onde são tirados os rebentos. Para solucionar o problema, as plantas devem ser propagadas *in vitro*, processo bastante utilizado por biofábricas na produção de mudas de várias espécies (CROCOMO; OLIVEIRA, 1995).

Talvez, pelo fato de ser um mercado jovem e emergente, e altamente promissor economicamente, a maioria dos processos da cadeia produtiva de *Aloe* são patenteados e as pesquisas, principalmente aquelas relacionadas a sistemas de cultivo como obtenção de mudas, tratamentos culturais e principalmente nutrição mineral, não têm oferecido suporte para condução do cultivo, ou pelo menos, não têm sido publicadas.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção clonal, em larga escala, de mudas de babosa (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) avaliando-se técnicas de desinfestação de ápices caulinares e aclimação *ex vitro* de microplantas micropropagadas e acompanhamento bioquímico, fisiológico e nutricional durante o desenvolvimento das plantas cultivadas em condições controladas de casa-de-vegetação, sob três doses de nitrogênio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Generalidades da planta

Aloe vera (L.) Burm. f., pertencente à família Asphodelaceae (SOUZA; LORENZI, 2005), é popularmente conhecida no Brasil como babosa. São plantas com folhas arranjadas sobre o caule em forma de rosetas. Essas folhas são carnosas, lanceoladas, com margens serrilhadas e espinhos triangulares curtos e espaçados. Quando adultas, atingem de 0,5 a 0,9 m de comprimento e 0,05 a 0,1 m de largura em sua base. Têm coloração verde-acinzentada e quando

juvenis, apresentam pintas ou estrias brancas. O pedúnculo floral, normalmente esbranquiçado, é erecto com 0,6 a 0,9 m de altura com cachos de 0,3 a 0,45 m de comprimento com flores amareladas (MORTON, 1961; CORRÊA, 1984; JAMIESON, 1984). É de uma planta caracteristicamente xerófita com metabolismo ácido das crassuláceas e a suculência de seus tecidos funciona como verdadeiro reservatório de água, possibilitando sua sobrevivência em condições de baixa disponibilidade hídrica (Ni et al., 2004).

O gênero *Aloe* compreende mais de 300 espécies catalogadas (HARDING, 1979; JAMIESON, 1984) contudo, poucas espécies como *Aloe ferox* (cape aloés), *Aloe perryi* (aloe de Socotra) e, principalmente *Aloe vera*, têm sido exploradas comercialmente pela indústria farmacêutica e cosmética (JAMIESON, 1984; REYNOLDS; DWECK, 1999). O nome foi assimilado e prevalece popularmente, sendo que a maioria dos produtos oriundos das diferentes espécies do gênero são comumente referenciadas como sendo de *Aloe vera* (GRINDLAY; REYNOLDS, 1986).

A origem exata dessa espécie ainda é bastante discutível. Segundo Reynolds e Dweck, (1999), apesar de distribuída e naturalizada em diversas regiões como oeste da Índia, Bahamas, sul dos EUA, México e América Central de um modo geral, sua provável origem tenha sido nas Ilhas Canárias, Madeira ou Cabo Verde, ou até mesmo, devido ao seu uso relatado há mais de três mil anos no antigo Egito, Península Arábica e culturas mediterrâneas, sua verdadeira origem pode ter sido no norte da África.

A produção comercial e industrial de *Aloe vera*, em decorrência dos resultados científicos que ratificam seus poderes terapêuticos, vem crescendo drasticamente nos últimos anos. Esse fato alavancou a produção comercial da espécie que vinha sendo cultivada apenas domesticamente nas mais diferentes partes do mundo. Nos EUA, em 1978, o estado do Texas cultivava cerca de 95% da produção americana, que correspondia a apenas 84 ha. Essa área aumentou para 200 ha em 1979 e, em 2003 já era de 1600 ha. Devido à alta lucratividade da cultura na época, aproximadamente US\$ 12.000 ha⁻¹. ano⁻¹, e pelas severas geadas de 1983/84, o cultivo comercial expandiu-se para outras regiões como nos estados da Flórida e Arizona, para o México, América Central, principalmente Costa Rica e Caribe, Israel, Austrália e Índia (JAMIESON, 1984).

2.2 Características medicinais de plantas do gênero *Aloe*

As pesquisas científicas sobre os poderes medicinais do gel da polpa das plantas do gênero *Aloe* começaram por volta de 1930. Os primeiros resultados científicos referem-se a publicação de Collins e Collins, 1935 , apud Grindlay e Reynolds (1986), que basearam-se no uso popular do gel contra queimaduras solares severas em pacientes na Flórida. Pesquisas anteriores relatavam apenas o efeito purgativo do exsudato das folhas, o gel era ignorado. Resultados mais importantes no tratamento de lesões com o gel foram observados quando os raios-X começaram a ser usados no tratamento de alguns tipos de câncer. No início, esse tipo de terapia causava muitas queimaduras e irritação de pele, principalmente por exposições exageradas.

Muitas características medicinais são atribuídas a um polissacarídeo denominado ‘acemannan’ presente no gel das folhas de *Aloe* observando-se respostas terapêuticas positivas. Inibição da aderência de *Pseudomonas aeruginosa* em células do epitélio pulmonar em humanos (AZGHANI et al., 1995), estímulo na formação de macrófagos (EGGER et al., 1996a), ausência de reações tóxicas e toxicidade por via oral em cobaias (FOGLEMAN et al., 1992a e b), estímulo na produção de leucócitos em cavalos (GREEN, 1996), necrose de células tumorais em cães e gatos (HARRIS et al., 1991), atividades antiviral em cultura de células e supressão da replicação viral *in vitro* (KAHLON et al., 1991a), modificações na glicosilação de glicoproteínas de vírus (KEMP et al., 1990), tratamentos terapêuticos contra AIDS (McDANIEL, 1987; KAHLON et al., 1991b), indução de citocinas (MARSHALL; DRUCK., 1993; TIZARD et al., 1991), cicatrização de úlceras (PLEMONS et al., 1994; TIZARD et al., 1994) e tratamento de queimaduras por radiação (ROBERTS; TRAVIS, 1995), são alguns exemplos.

2.3 Componentes químicos de natureza medicinal do gênero *Aloe*

A pesquisa científica em busca dos princípios ativos de plantas do gênero *Aloe* tem sido muito intensificada nos últimos 40 anos. Contudo, parece haver um consenso de que o poder efetivo da planta se deve a uma complexa composição de seus constituintes químicos de natureza fenólica presentes no exsudato e, principalmente, a polissacarídeos específicos presentes na polpa de suas folhas, intensamente explorados pelas indústrias farmacêutica e cosmética (REYNOLDS; DWECK, 1999; ABURJAI; NATSHEH, 2003).

Os compostos fenólicos são os principais constituintes do exsudato do gênero *Aloe* e mais de 80 tipos já foram detectados cromatograficamente. Entre os já identificados, ressaltam-se as aloínas A e B (barbaloína e isobarbaloína), aloe-emodina, 8-*O*-metil-7-hidroxi aloína A e B, hidroxi aloína A, aloenina A e B, aloesina, 8-*C*-glucosil-7-*O*-*S*-aloesol, isoaloeresina D e aloeresina E (OKAMURA et al., 1996; PARK et al., 1998).

Zonta et al. (1995), caracterizaram vários compostos fenólicos (aloesina, aloeresina A e B, hidroxi aloína, aloína A e B e aloinoside A e B). Os compostos foram isolados e identificados simultaneamente por meio de HPLC em coluna Supelcosil LC18. Foram analisados extratos secos (pó) de *Aloe*, de natureza desconhecida, solubilizados em água, etanol 30% e etanol puro. As soluções foram conservadas a 4°C e a 20°C por várias semanas. Paralelamente, testaram duas bebidas alcoólicas comerciais preparadas com extrato de *Aloe* (Bitter e Fernet). Os autores observaram que aloína A e B são rapidamente degradadas em álcool e que nas bebidas alcoólicas à base de *Aloe*, apesar de apresentarem outros compostos característicos, aloína A e B não foram detectados. Um dos componentes de *Aloe* que se manteve estável em álcool foi aloeresina (ou aloesina) e, devido a essa característica, este composto deveria ser utilizado como indicador da natureza de bebidas alcoólicas à base de extratos de *Aloe*.

Okamura et al. (1996), também analisaram e compararam o conteúdo de dez compostos fenólicos (aloesina, 2-*O*-feruloilaloesina, aloenina, aloe-emodina, 8-*C*-glucosil-7-*O*-metil-*S*-aloesol, isolaoeresina D e aloeresina) em extratos de *Aloe barbadensis* Miller, *A. arborescens* Miller, var. *Natalensis* Berger, *A. vera* var. *Chinensis* Berger, *A. marlothii* Berger e *A. striata* Haw. Dois extratos comerciais também foram analisados. A extração dos compostos fenólicos foi feita com 2-9 g de extrato em 20 mL de metanol. O extrato foi filtrado e analisado em HPLC de fase reversa e detectado na faixa UV a 290 nm. As amostras foram separadas em coluna 'Wakosil-II 5C18 HG', por gradiente de eluição preparado com água e acetonitrila (88:12 a 54:46), com taxa de fluxo da fase móvel de 1mL.min⁻¹. Os limites de detecção dos compostos foram de 0,04 a 0,35 ng por injeção de 5 µL. Resultados satisfatórios foram obtidos em tempo de corrida de 38 minutos para determinação simultânea dos compostos. Os autores observaram que a camada externa 'rind' mostrou valores três vezes maiores de compostos fenólicos em relação ao gel da polpa da folha em *A. barbadensis*.

Os constituintes mais importantes do gel da polpa das folhas do gênero *Aloe* são os polissacarídeos. Eles têm características específicas e foram denominados, em sua maioria,

conforme sua composição de monossacarídeos. Gowda et al. (1979) fracionaram os polissacarídeos de *Aloe vera* encontrando diferentes polímeros nas diferentes frações. Nas frações A1a e 1b, observaram um ‘glucomanan’ com peso molecular maior que 200.000 Da. Nas frações A2 e B, observaram um ‘glucomanan’ com resíduos de manose acetilados. Nessas frações, as proporções de glicose e manose foram de 1:13 e 1:19, respectivamente. Em outro fracionamento de polissacarídeos, Mandal e Das (1980a) encontraram três tipos de ‘galactogalacturan’, as proporções de seus monossacarídeos foram de 1:20:1, 1:1:_ e 25:1:_ de glicose, ácido galacturônico e ranose, respectivamente. Nesse último polissacarídeo, observaram ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ e $\beta(1 \rightarrow 6)$ entre seus monômeros. Mandal e Das (1980b) e Mandal et al. (1983), observaram ‘glucomanan’ e ‘galactogalacturan’ nas frações A3 e B2(f2) respectivamente. As proporções monoméricas do ‘glucomanan’ foram de 1:22 para glicose e manose, respectivamente, com ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ e $\beta(1 \rightarrow 6)$. O ‘galactogalacturan’ mostrou proporções de 1:5 de glicose e ácido galacturônico, respectivamente, com ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ e $\beta(1 \rightarrow 1)$.

De maneira geral, os polissacarídeos mais importantes são polímeros constituídos principalmente de manose com ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$. São vistos como importantes modificadores de respostas biológicas, aumentam e reforçam o sistema imunológico contra diversas enfermidades. Entre os principais, destaca-se um polissacarídeo cujos resíduos de manose são acetilados, que foi processado e purificado a partir da polpa das folhas de *Aloe vera*, na forma de gel e, sem apresentar maiores informações sobre o produto, o mesmo foi denominado comercialmente de ‘acemanan’ ou ‘Carrisyn™’ por McDaniel e McAnalley (1987). Posteriormente, McAnaley (1988) apud Reynolds e Dweck, (1999), apresentaram e patentearam metodologias de processamento e composição do gel. Contudo, características desse polissacarídeo, segundo Reynolds e Dweck (1999), tinham sido estudadas anteriormente em *Aloe arborescens* e denominado como ‘aloe manan’ por Yaggi et al. (1977) e também como um tipo de ‘manan’ denominado de OS2 por Eberendu et al., 1988 apud Reynolds e Dweck (1999). Apesar dessas inconsistências, esse polissacarídeo pode ocorrer em plantas da mesma espécie em diferentes regiões geográficas, em subespécies do gênero e até mesmo em variedades da espécie de *A. vera* (REYNOLDS; DWECK, 1999).

A maioria das preparações dos géis de polissacarídeos, discutida acima, apresentava-se como isenta ou quase isenta de compostos nitrogenados, contudo, uma fração de gel de *A. arborescens* demonstrou a presença de uma glicoproteína, observada em uma banda única de

eletroforese (YAGGI et al., 1986). Subseqüentemente, Kodym (1991), observou duas glicoproteínas separadas através de precipitação diferencial. Atividades de hemaglutinação, característica das lectinas, foram observadas em frações de géis de *A. vera*, *A. saponária* e *A. chinensis* (WINTERS, 1993). Essa presença de polipeptídios nos géis do gênero *Aloe* tem sido observada pela técnica eletroforética em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Essa técnica separa as moléculas de polipeptídios de acordo com seu peso molecular. Foi demonstrado que *A. vera*, *A. saponária* e *A. arborescens* têm em comum polipeptídios com pesos moleculares de 15000, 46000, 65000, 66000, 71000 e 77000 Da (WINTERS; YANG, 1996). Apesar das lectinas serem proeminentes, outras glicoproteínas aparecem ligadas a carboidratos do gel da polpa das folhas de *Aloe*. Aloctina A e B, por exemplo, foram isoladas de *A. arborescens*. Aloctina A mostrou um peso molecular de 18000 Da, composta de duas subunidades de 7500 e 10500 Da. A aloctina B mostrou um peso molecular de 24000 Da com duas subunidades de 12000 Da cada uma e um conteúdo de 50% de carboidratos (SUZUKI et al., 1979; SAITO, 1993). Outras glicoproteínas têm sido observadas no gel de diferentes espécies de *Aloe*. Isso leva a crer que as atividades biológicas dos polissacarídeos podem depender da presença dessas glicoproteínas.

Talmadge et al. (2004) fracionaram o produto comercial ‘Acemanan Hydrogel™’ produzido pela empresa ‘Carrington Laboratories’. O material foi processado por centrifugação gerando a fração F1, composta de 85% de carboidratos solúveis, 3 a 4% de proteínas, 3% de material insolúvel e o restante composto de malato de cálcio e outros compostos de baixo peso molecular. Essa fração F1 foi novamente submetida à centrifugação, em maior velocidade, para remoção dos componentes insolúveis e o sobrenadante foi purificado através de cromatografia de troca iônica, resultando a fração F2 com 95% de carboidrato e menos de 1% de proteínas e traços de malato de cálcio e uma fração aniônica. O processo foi repetido obtendo-se a fração F3 contendo um carboidrato identificado como ‘Acemanan’. Essa fração mostrou mais de 99% de carboidrato com proporções de manose acetilada, glicose e galactose de 30:1:1, respectivamente.

Ni et al. (2004) analisaram os componentes estruturais da polpa de *Aloe vera* e do produto comercial ‘Acemanan Hydrogel™’ e determinaram a composição de seus carboidratos. Os autores observaram, utilizando microscopia de luz e eletrônica, que a polpa consiste de volumosas células de parênquima com aproximadamente 1000 µm de diâmetro. Da polpa homogeneizada foram isolados três componentes (parede celular, micropartículas de organelas

degeneradas e o gel líquido viscoso). Por meio de centrifugações sequenciais, os três componentes corresponderam a 16,2%, 0,70% e 80,1% do peso seco da polpa, respectivamente. A composição de carboidratos mostrou-se diferente para cada componente da polpa. O gel líquido continha o polissacarídeo ‘manan’, rico em manose. As micropartículas continham um polissacarídeo rico em galactose, e as paredes celulares continham um polissacarídeo rico em ácido galacturônico (34%). Os mesmos componentes foram observados no produto comercial ‘Acemanan Hydrogel™’, tendo o polissacarídeo ‘manan’ como principal componente. Os autores observaram, conseqüentemente, que os diferentes componentes estruturais da polpa têm predominância de polissacarídeos específicos e podem ter funções potencialmente diferentes.

Femenia et al. (1999) caracterizaram quimicamente a composição de folhas de *Aloe barbadensis* Miller. Os autores dividiram a estrutura da folha em três componentes: a parte externa denominada ‘rind’, a polpa com suas fibras e o gel viscoso separado da polpa. O componente ‘rind’ correspondeu de 20 a 30% da folha, a polpa correspondeu de 70 a 80% e o gel viscoso, correspondeu a 70% da polpa. Esses componentes foram submetidos à extração alcoólica gerando as frações solúvel e insolúvel em álcool, e submetidos a diferentes determinações químicas. A fração insolúvel em álcool mostrou um conteúdo de carboidratos acima de 80%, constituídos de polissacarídeos em cuja composição observou-se uma predominância de manose, glicose, e alguns com significativa presença de substâncias pécticas. A composição dos polissacarídeos do componente ‘rind’, mostrou-se diferente do componente polpa e do gel viscoso, que apresentaram características correspondentes ao polissacarídeo denominado ‘acemanan’, caracterizando-o, como o polissacarídeo de reserva das folhas de *A. barbadensis*. Extrações sequenciais mostraram polissacarídeos pécticos ricos em ácido urônico, com composições similares a polímeros antitumorais encontrado em plantas.

Os componentes ‘rind’, polpa e gel apresentaram diferentes quantidades de água, quais sejam, 90, 98 e mais de 99%, respectivamente. Além de polissacarídeos e água, outros compostos como lipídeos, proteínas solúveis, açúcares solúveis e alguns elementos minerais como cálcio, magnésio, sódio, potássio, fósforo, ferro, cobre e zinco, foram analisados na matéria seca. Os teores de lipídeos variaram de 2,71 a 5,13%. Os teores de proteínas solúveis foram em torno de 6,33% para o componente ‘rind’ e 8,92% no gel viscoso. Os teores de açúcares solúveis foram de 11,22% para ‘rind’, 16,48% para a polpa e 27,81% para o gel. Glicose foi o açúcar solúvel mais abundante, em torno de 95%, nos três componentes analisados. Os teores de cinza foram

relativamente altos nos três componentes, particularmente no gel viscoso, correspondendo a 23,61% da sua matéria seca. Ca, K, Na e Mg foram os minerais predominantes. Cálcio foi o principal mineral nos componentes, exceto no gel viscoso onde predominaram Na e K em maiores quantidades. Outros elementos como Fe, Cu, Zn e P ocorreram em menores quantidades.

Esse trabalho desenvolvido por Femenia et al. (1999), pode ser considerado um dos trabalhos científicos mais completos em termos de caracterização química de *A. vera*. O trabalho fica mais valorizado ainda se comparado ao vasto número de informações comerciais existente, com objetivo de propaganda, cujas composições químicas declaradas perdem seus valores por falta de respaldo científico. Contudo, o trabalho não levou em consideração informações relativas ao sistema de cultivo das plantas analisadas, principalmente as condições de fertilização nutricional.

2.4 Sistemas de produção de mudas

Em relação à produção de mudas, na maioria das vezes utiliza-se propagação convencional por meio de colheita e plantio de rebentos. Culturas como bananeiras, alho, batata, abacaxi e muitas outras, têm sido propagadas dessa forma. Esse tipo de propagação pode acarretar uma série de problemas pelo fato de funcionar como um sistema simultâneo de propagação de pragas e doenças. Isto ocorre porque as matrizes escolhidas para propagação, apesar de não apresentarem sintomas, podem muitas vezes estar infestadas. Portanto, a propagação vegetativa convencional, muitas vezes necessária, funciona como eficiente veículo de propagação de doenças virais, fúngicas e bacterianas e pragas como nematóides e muitas outras.

Por outro lado, os aspectos negativos da propagação vegetativa convencional podem ser contornados pela micropropagação (CROCOMO; OLIVEIRA, 1995). Essa técnica, desenvolvida desde meados do século XX, gerou sistemas de propagação vegetal atualmente bastante explorada por biofábricas (GERALD, 1995). A técnica em si explora a capacidade organogenética de tecidos vegetais mediante ação de reguladores de crescimento. Os tecidos ou órgãos utilizados são, na maioria, aqueles com rotas de desenvolvimento já determinadas como gemas apicais e laterais, entre outros. Deles são obtidas microplantas que são submetidas a brotações sucessivas dentro de um sistema axênico. A técnica oferece uma produção massal de

mudas em pequeno espaço físico e cronológico; além disso, as plantas produzidas são clones perfeitos e livres de pragas e doenças.

Um sistema completo de micropropagação, pode ser dividido em poucos estágios, de acordo com os procedimentos de cada laboratório. Murashige 1974 apud Debergh e Maene (1981), dividiu a micropropagação em três estágios básicos: estágios I, II e III. Debergh e Maene (1981) reconheceram o estágio zero e dividiu o estágio III em IIIa e IIIb. O estágio zero, segundo esses autores, compreende a seleção e preparação de matrizes a serem cultivadas. O estágio IIIa pode ser considerado como estágio III, e o IIIb como estágio IV.

O estágio I compreende a desinfestação e introdução do material em cultivo *in vitro*. Os procedimentos e agentes desinfestantes utilizados são os mais diversificados. Segundo Grattapaglia e Machado (1990), os produtos mais utilizados são soluções a base de hipoclorito de sódio ou de cálcio, cloreto de mercúrio, cloreto de benzalcônio, coquetéis de fungicidas e antibióticos, e até mesmo, combinações dos vários produtos. A maior dificuldade nesse estágio reside na obtenção de explantes vegetais descontaminados sem conduzi-los a morte. O cloreto de mercúrio tem se revelado bastante tóxico aos tecidos vegetais. Os antibióticos, alguns deles tóxicos, têm espectros de ação específica, na maioria dos casos interferem no crescimento também do vegetal cultivado e além disso, quase sempre, funcionam não como agente bactericida e sim como agente bacteriostático. O mesmo pode ser dito em relação aos fungicidas. O cloreto de benzalcônio, apesar de pouco tóxico aos vegetais, sua eficiência na desinfestação parece ser menor em relação aos outros produtos. Um dos produtos mais utilizados e apontado entre os mais eficientes na desinfestação de explantes vegetais é o hipoclorito de sódio. Por outro lado, cabe enfatizar que as soluções desse produto são de altíssima alcalinidade visto que seu preparo se realiza por meio de dissolução de gás cloro em soluções saturadas de hidróxido de sódio.

O estágio II compreende a indução e multiplicação de brotos. Neste caso, em função da responsividade fisiológica do material vegetal utilizado, faz-se uso das mais diversas combinações de hormônios e reguladores de crescimento.

O estágio III compreende o enraizamento e alongamento dos brotos obtidos no estágio II. No estágio IV ocorre o transplante das microplantas obtidas no estágio III para condições *ex vitro*.

O transplante de microplantas produzidas *in vitro* para condições *ex vitro*, também referenciada como aclimação, caracteriza-se em outro grande problema da micropropagação.

Segundo Grattapaglia e Machado (1990), as dificuldades decorrem de vários fatores como a passagem da microplanta de condições de reduzido fluxo respiratório para condições de alta demanda na atividade respiratória. A microplanta passa de condições quase heterotróficas para condições autotróficas. Passa também de condições de alta disponibilidade de nutrientes para situações onde precisa rapidamente aumentar a absorção de sais e, finalmente, a microplanta sai de condições totalmente assépticas para condições sujeitas a toda sorte de microrganismos, principalmente saprofíticos. Outro fator bastante crítico, ressaltado pelos autores, refere-se ao tipo de substrato utilizado como suporte no transplântio.

Poucos trabalhos abordam detalhes na fase de aclimação. Entretanto, manutenção de umidade relativa alta, controle de temperatura e sombreamento no ambiente de adaptação das microplantas às condições *ex vitro*, bem como uso de substratos especiais, constituem em regras gerais a serem respeitadas no transplântio das microplantas. Em protocolos experimentais de micropropagação, onde são predominantemente produzidas pequenas quantidades de microplantas, os pesquisadores não têm dado muita ênfase ao substrato, utilizando desde solo para jardinagem (MARFORI; MALASA, 2005), misturas de solo, vermiculita e areia nas proporções de 1:1:1 (LIAO et al., 2004) e, em casos de números mais expressivos de microplantas, substratos comerciais, principalmente aqueles produzidos a base de vermiculita, areia, turfa, casca de eucalipto ou Pinus, casca de arroz carbonizada e fertilizantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1990; ARAÚJO et al., 2002).

Esse sistema de propagação *in vitro* também tem sido utilizado para plantas do gênero *Aloe*. Roy e Sarkar (1991), exploraram a micropropagação de *Aloe vera* por meio de organogênese indireta. Os autores obtiveram, primeiramente, a produção de calos (aglomerado de células indiferenciadas) a partir de gemas axilares jovens, desinfestadas com solução de cloreto de mercúrio 0,1% por 30 minutos. As gemas foram inoculadas em meio de cultura basal MS, estabelecido por Murashige e Skoog (1962), acrescido de polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico e carvão ativado para inibir a oxidação do tecido. Usaram ainda várias combinações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftaleno acético (ANA), ácido indolacético (AIA), furfurilaminopurina (cinetina) e 6-benzilaminopurina (6-BAP) como reguladores de crescimento. Uma das melhores combinações para indução da formação de calos foi 2,4-D (1 mg.L⁻¹) e cinetina (0,2 mg.L⁻¹). A regeneração de plantas a partir dos calos foi observada na combinação

inversa, ou seja, 2,4-D ($0,02 \text{ mg.L}^{-1}$) e cinetina (1 mg.L^{-1}). As plantas obtidas foram enraizadas em meio isento de qualquer regulador de crescimento e transplantadas para condições *ex vitro*.

Liao et al. (2004), exploraram o sistema de organogênese direta por meio de suplementação de várias combinações de 6-BAP, ANA e sacarose ao meio basal MS. Neste caso, ápices caulinares de *Aloe vera* foram isolados e desinfestados previamente com etanol 70% por 1 minuto, seguido de cloreto de mercúrio 0,1% por 10 minutos. Os melhores resultados na obtenção de brotos foram obtidos na combinação de 6-BAP (2 mg.L^{-1}), ANA ($0,3 \text{ mg.L}^{-1}$) e sacarose (30 g.L^{-1}). Os brotos foram alongados e enraizados em meio MS diluído a 50% acrescido de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e 2 g.L^{-1} de PVP. Os efeitos do tratamento de desinfestação sobre os índices de contaminação e lesões necróticas dos explantes, bem como os índices de sobrevivência no transplante das microplantas não foram avaliados pelos autores.

Marfori e Malasa (2005) desenvolveram trabalho explorando a organogênese direta em *Aloe barbadensis*. Plantas cultivadas em casa de vegetação tiveram suas folhas retiradas e os ápices caulinares isolados foram desinfestados com hipoclorito de sódio 5,25% por 30 minutos. Os ápices foram inoculados em meio basal MS com diferentes combinações de 6-BAP e cinetina. A melhor resposta em termos de produção de brotos foi observada no tratamento com 6-BAP (1 mg.L^{-1}). Para enraizamento e alongamento dos brotos obtidos testaram níveis de AIA, ANA e ácido indolbutírico (AIB). O melhor resultado em termos de número de raízes foi observado no tratamento com adição de ANA ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). Concentrações mais altas de ANA resultaram em decréscimos no número de raízes e intumescimento na base dos brotos. As raízes produzidas morriam depois de três semanas quando a base intumescida do broto se tornava amarronzada. O enraizamento, apesar de mais demorado, ocorreu também no meio isento de auxinas (testemunha). As microplantas bem enraizadas foram transplantadas para condições *ex vitro* observando-se 100% de sobrevivência.

Araújo et al. (2002), trabalhando com 16 genótipos de *A. vera*, desinfestaram ápices caulinares (0,5 a 1,5 cm de altura) em soluções de hipoclorito de sódio preparadas a partir de soluções comerciais com 2,5% de cloro ativo. As desinfestações foram realizadas por meio de imersões sequenciais em solução de hipoclorito de sódio 40%, por 10 minutos, etanol 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio 40%, por 5 minutos. Depois de três lavagens com água deionizada esterilizada, os explantes foram inoculados em meio MS semi-solidificado com agar (0,7%) e suplementado de sacarose (30 g.L^{-1}), ANA ($4,03 \text{ } \mu\text{M}$) e 6-BAP ($6,67 \text{ } \mu\text{M}$). Durante o cultivo *in*

vitro os autores observaram taxas de multiplicação que variaram de 1:2 a 1:8, dependendo do genótipo utilizado. Ao longo do experimento coletaram-se microplantas com parte aérea superior a 3 cm de altura e diferentes padrões de enraizamento, ou seja, bem enraizadas, pouco enraizadas e microplantas desprovidas de raízes. No transplante para condições *ex vitro*, em bandejas contendo substrato comercial, as taxas de sobrevivência foram de 80 a 95% para microplantas bem enraizadas e inferiores a 30% para aquelas desprovidas de raízes. O tratamento de desinfestação não foi avaliado e ao longo de 8 meses de multiplicação foram produzidas 2000 mudas.

Poucos trabalhos têm analisado a eficácia na descontaminação e efeitos de lesões necróticas provocadas pelos tratamentos de desinfestação de material vegetal coletados a campo e introduzidos em sistemas de micropropagação. No caso específico do gênero *Aloe*, cujo sistema de micropropagação comercial não está tão difundido, nenhum trabalho foi encontrado na literatura avaliando esses parâmetros. Contudo, em bananeira, cujo sistema de micropropagação comercial é bastante semelhante, Hamill et al. (1993), trabalhando com o cultivar ‘Williams’ (grupo genômico AAA, subgrupo Cavendish), coletaram a campo e avaliaram quatro tratamentos de desinfestação em dois padrões de brotos: filhotes maiores com rizoma medindo aproximadamente 12 cm de diâmetro por 20 cm de altura e filhotes menores medindo de 6 a 8 cm de diâmetro por 10 a 15 cm de altura. Foram testados material com 1 dia e material com 10 dias depois de coletados. Simultaneamente, foram testados quatro tratamentos de desinfestação, tratamento T₁, T₂, T₃ e T₄. O tratamento T₁, baseado na metodologia utilizada por Cronauer e Krikorian (1984), refere-se ao isolamento do ápice caulinar e desinfestação em solução a base de hipoclorito de sódio (0,0525%) acrescido de gotas de Tween 80, por 5 minutos e enxaguados 4 vezes em água destilada esterilizada. O T₂, baseado na metodologia utilizada por Wong (1986), refere-se a desinfestação em duas etapas. Na primeira os ápices caulinares são desbastados ao tamanho de 0,5 a 0,8 cm de diâmetro e desinfestados em solução a base de hipoclorito de sódio (1%) mais Tween 80, por 15 minutos. Na segunda etapa procedeu-se ao mesmo tratamento com os ápices desbastados a 0,2 a 0,3 cm de diâmetro e enxaguados com água destilada esterilizada. O T₃, baseado na metodologia utilizada por Novak et al. (1986), os ápices caulinares foram desbastados ao tamanho de 0,2 a 0,3 cm de diâmetro, desinfestados com solução a base de hipoclorito de sódio (3,5%) e tween 80, por 15 minutos, e novamente desbastados ao tamanho de 0,15 a 0,3 cm de diâmetro e desinfestados na mesma solução por 5 minutos. O T₄, refere-se a um

tratamento simples com solução a base de hipoclorito de sódio (3,5%) e tween 80, por 20 minutos, e enxaguados em água destilada esterilizada. Os ápices caulinares desinfestados pelos diferentes tratamentos foram inoculados em meio MS acrescido de sacarose 20 g.L⁻¹ e 6-BAP 2,5 mg.L⁻¹. Depois de 14 dias foram analisados os níveis de contaminação causados por bactérias. Os explantes desinfestados pelo tratamento T₄ apresentaram 100% de contaminação e foram eliminados. Os ápices isolados e inoculados 1 dia depois da coleta dos rizomas e desinfestados pelos tratamentos T₁, T₂ e T₃, apresentaram níveis de contaminação em torno de apenas 10%, tanto para os filhotes menores como para os filhotes maiores. Nos ápices inoculados 10 dias depois da coleta dos rizomas os níveis de contaminação foram bem mais altos, principalmente para aqueles isolados de rizomas menores, com níveis de contaminação em torno de 50% para T₁, 70% para T₂ e 30% para T₃. Para ápices isolados de rizomas maiores, os níveis de contaminação foram de 30% para T₁, 35% para T₂ e apenas 10% para T₃. Conclui-se, portanto, que o tratamento T₃, com duas desinfestações sequenciais em solução a base de hipoclorito de sódio (3,5%), mais Tween, por 15 minutos, apresentaram mais eficácia na desinfestação de ápices caulinares de bananeira, principalmente quando os mesmos são isolados e inoculados imediatamente após a coleta dos rizomas.

2.5 Nutrição mineral

Uma fertilização nutricional adequada é de fundamental importância para a produtividade de qualquer espécie vegetal. Dentro desse contexto, a nutrição mineral de plantas tem sido estudada desde a antiguidade. Atualmente, milhares de pesquisas têm oferecido suporte para fertilização mineral das culturas vegetais bem como a essencialidade dos macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) e dos micronutrientes (ferro, manganês, zinco, cobre, níquel, boro, cloro e molibdênio). Um elemento para ser essencial deve satisfazer a dois critérios: primeiro, fazer parte de uma molécula que seja componente intrínseco da estrutura ou do metabolismo da planta; segundo, se a planta for severamente privada do elemento, a mesma deve exibir anormalidades em seu crescimento, desenvolvimento ou reprodução em comparação com plantas menos privadas (EPSTEIN; BLOOM, 2004).

Para estudar o efeito de qualquer elemento na planta devem-se levar em consideração as condições gerais de cultivo, se naturais ou artificiais, preferencialmente artificiais que oferecem

maior controle sobre as variáveis testadas. A dificuldade de controle no cultivo natural pode ser exemplificada pela complexidade e heterogeneidade do solo. Portanto, considerando o controle das variáveis essenciais para esse tipo de experimentação, os pesquisadores de nutrição de plantas buscaram substratos mais simples, mais inertes, que proporcionassem melhor controle do ambiente de absorção. Assim, desenvolveram as mais diversas formas de cultivo e uma das mais difundidas refere-se ao cultivo em solução nutritiva. Essa técnica, segundo Epstein e Bloom (2004), introduzida por Knop e Sachs desde meados do século XIX, levou, ao longo do tempo, às mais diversas formulações, sendo que uma delas, clássica e utilizada na maioria das experimentações de nutrição de plantas, trata-se da formulação elaborada por Hoagland e Arnon (1950), (mostrada na Tabela 1, em Materiais e Métodos). Desde então, as experimentações vêm sendo realizadas diretamente em solução nutritiva com modificações de acordo com os objetivos do experimento, ou melhor ainda, em areia fertilizada com solução nutritiva modificada.

2.6 O nitrogênio e as plantas

Segundo Epstein e Bloom (2004) e Malavolta (2006), o nitrogênio faz parte de uma infinidade de compostos orgânicos tais como todos os aminoácidos e proteínas, enzimas e coenzimas, bases nitrogenadas e ácidos nucléicos, vitaminas, glicoproteínas, lipoproteínas, pigmentos e compostos secundários. Seu requerimento pelas plantas, em termos de quantidade, é maior do que qualquer outro nutriente essencial e sua falta limita o desenvolvimento de ecossistemas naturais e agrícolas. Excetuando o déficit hídrico, nenhuma deficiência é tão dramática em seus efeitos quanto a de nitrogênio. Clorose variegada, hábito estiolado e crescimento retardado são os sintomas mais característicos de sua deficiência.

O nitrogênio na forma de gás N_2 constitui 78% em volume na atmosfera. Contudo, a maioria dos organismos não pode acessar esse reservatório diretamente devido à tripla ligação covalente, excepcionalmente estável entre os dois átomos $N \equiv N$. Para quebrar essa ligação tripla e gerar formas mais reativas, utilizáveis pelas plantas, como NO_3^- e NH_4^+ , é requerido enorme quantidade de energia. Entretanto, reações químicas de tais proporções ocorrem por meio de processos naturais e industriais conhecidos como fixação de nitrogênio. Uma vez fixado, o nitrogênio torna-se acessível às plantas, principalmente nas formas NO_3^- e NH_4^+ , e assimilados em aminoácidos, primariamente por um dos processos enzimáticos: via glutamina sintetase e

glutamato sintase (via GS-GOGAT), formando glutamina e glutamato a partir de NH_4^+ e glutamato, e via glutamato desidrogenase (GDH) formando glutamato a partir de NH_4^+ e 2-oxoglutarato.

Ainda segundo Malavolta (2006), várias interações são observadas entre o nitrogênio e outros nutrientes e mesmo entre as diferentes fontes do elemento, se amoniacal ou nítrica. O fornecimento de NH_4^+ aumenta mais o teor de nitrogênio na planta do que o fornecimento de NO_3^- , aumentando também os teores de ferro, manganês e zinco. Efeito diverso das formas de N regulam as concentrações de cálcio e magnésio nas raízes, mas o transporte e concentrações relativas na parte aérea são regulados pela própria planta. Parte desse efeito é devido à variação do pH que diminui com a absorção de NH_4^+ e aumenta com NO_3^- . Plantas deficientes em N mostram teores mais elevados de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, ferro e manganês. Por outro lado, teores tóxicos de N levam a teores mais baixos de fósforo e potássio.

2.7 Cultivo e nutrição mineral em *Aloe*

Em experimento com objetivo de avaliar o efeito da luminosidade sobre o crescimento e produção de carboidratos e aloína em *Aloe vera*, cultivadas em vasos, Paez et al. (2000), embora sem avaliar o efeito nutricional sobre o crescimento, utilizaram uma suplementação de NPK de 100:50:50 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, respectivamente, a cada três meses.

Schaik et al. (1997), investigaram os efeitos da irrigação e fertilização nitrogenada na iniciação, crescimento e produção de gel nas folhas de *A. barbadensis* Mill., em condições áridas, típicas de Aruba. A irrigação provou ser essencial para o crescimento vegetativo e aumento de massa de matéria fresca das folhas ao longo do ano. Contudo, nos meses de seca, o déficit hídrico afetou drasticamente o crescimento e o perfilhamento. A fertilização nitrogenada aumentou o teor de gel e o surgimento de folhas. A interação de nitrogênio e irrigação mostrou-se significativa sob estresse hídrico severo.

Fuentes-Carvajal et al. (2006), cultivaram *A. vera* durante seis meses em água e em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) completa e isenta de N, P, K, Ca, Mg ou S. O objetivo foi induzir sintomas de deficiência de cada um dos nutrientes. Os efeitos foliares foram maiores nos tratamentos somente com água, -N, -P e -K, cujos sintomas manifestaram-se nas

formas de nanismo da planta e avermelhamento das folhas em -N, brilho e palidez em -P, necrose basipetal em -K, depressões irregulares em -Mg, clorose em -Ca e compactação basal em -S.

Shao et al. (2005), estudaram o efeito de aplicações de fósforo em ‘seedlings’ de *A. vera* submetidas a estresse salino. Foram testados duas concentrações de P (0,5 e 1,5 mMol.L⁻¹) em duas concentrações de água do mar (natural e diluída 30%) contendo Na⁺, Cl⁻, K⁺ e Ca⁺². A adição de P aumentou a massa de matéria seca e o conteúdo de água das folhas. Não houve diferença significativa entre as duas concentrações de água salgada sobre as variáveis citadas. Observaram que as aplicações de P decresceram relativamente os conteúdos de Na⁺ e Cl⁻ em algumas células da raiz e aumentaram drasticamente os conteúdos de K⁺ e Ca⁺² na epiderme, floema e xilema do mesmo órgão. O mesmo efeito foi observado nas folhas. Ao mesmo tempo, altos níveis de K⁺ sobre Na⁺ e Ca⁺² sobre Na⁺, nas folhas, foi mantido com aplicação de P, indicando que P aumenta a absorção seletiva e o transporte de K⁺ e Ca⁺² das raízes para as folhas em condições de salinidade.

Garcia-Hernández et al. (2006) estudaram diagnose de nutrientes foliares em *A. vera* L. em região árida, de solo calcário, no México. Os autores calcularam a composição nutricional e também identificaram interações nutricionais significativas em cultura irrigada. As normas diagnósticas da composição de nutrientes para produtividade de 136,67 t.ha⁻¹ de massa de matéria fresca, nas condições específicas de cultivo, sugeriram os seguintes teores foliares: 8,13 g N.Kg⁻¹; 1,68 g P.kg⁻¹; 22,39 g K.kg⁻¹; 45,42 g Ca.kg⁻¹ e 11,33 g Mg.kg⁻¹. Observaram interações positivas entre P-K e Ca-Mg e negativas entre P-Ca, P-Mg, K-Ca, K-Mg.

2.8 Análise de crescimento

O crescimento de plantas é definido como aumento irreversível no volume. O maior componente do crescimento vegetal é a expansão celular governada pela pressão de turgor. Durante este processo, as células aumentam várias vezes de volume e tornam-se altamente vacuoladas. Todavia, o tamanho é apenas um critério para se medir o crescimento vegetal. Sendo assim, a massa de matéria fresca pode ser usada como uma medida de crescimento, no entanto ela é alterada em função do “status” hídrico da planta, conseqüentemente as medidas de massa de matéria seca são mais apropriadas. Em algas ou organismos unicelulares, o número de células

pode ser um parâmetro para medir crescimento. Entretanto em organismos multicelulares essa medida pode ser enganosa, pois estes podem aumentar o número de células sem aumentar o peso.

Trabalhando com milho no final do século XIX, Kreusler e colaboradores, foram os pioneiros na definição precisa do crescimento como mudanças irreversíveis com o tempo, que ocorrem principalmente no tamanho, freqüentemente na forma e ocasionalmente no número. Esse crescimento pode ser analisado considerando-se o balanço de carbono e troca de gás nas plantas (EVANS, 1972), permitindo estimar a produção fotossintética líquida, ou seja, fotossíntese menos respiração, das plantas, em amplos intervalos de tempo. Para tanto, medem-se a massa de matéria seca e as dimensões de área foliar (HUNT, 1990). Desse modo, podem ser obtidos dados de adaptações fisiológicas relativas, por exemplo, à partição de carbono entre as várias partes das plantas como folhas, raízes e sementes. Correlacionados à medição da atividade fotossintética por unidade de área, esses dados, somados, determinam a produtividade (PEREIRA, 2002).

A análise de crescimento das plantas é expressa utilizando-se equações matemáticas. De acordo com Pereira (2002), Blanckman (1919) derivou a relação $dW/dt = R W$, em que W é a massa de matéria seca atual (g), t o tempo (dia) e R uma constante de proporcionalidade. O autor considerou R como um ‘índice de eficiência’ para produção de massa de matéria seca, o qual foi o primeiro índice usado para comparar o comportamento de diferentes espécies, ou de uma mesma espécie crescendo em ambientes diferentes. Briggs et al. (1920), apud Pereira (2002), isolaram R e o consideraram como taxa relativa de crescimento (TCR) ($g \cdot g^{-1} \cdot dia^{-1}$). Alguns anos depois (1926), Gregory introduziu a taxa de assimilação aparente (TAA) ($g \cdot m^{-2}(\text{área foliar}) \cdot dia^{-1}$), com três novos conceitos, ou seja, a relação de área foliar (RAF) ($m^2(\text{folha}) \cdot g^{-1}(\text{planta})$), área foliar específica (AFE) ($m^2(\text{folha}) \cdot g^{-1}(\text{folha})$) e a relação de massa foliar (RMF) ($g(\text{folha}) \cdot g^{-1}(\text{planta})$).

A taxa de assimilação aparente (TAA) ($g \cdot m^{-2}(\text{área foliar}) \cdot dia^{-1}$) foi introduzida por Gregory em 1926 apud Pereira (2002). A análise dessa relação introduziu três novos conceitos, ou seja, a relação de área foliar (RAF) ($m^2(\text{folha}) \cdot g^{-1}(\text{planta})$), área foliar específica (AFE) ($m^2(\text{folha}) \cdot g^{-1}(\text{folha})$) e a relação de massa foliar (RMF) ($g(\text{folha}) \cdot g^{-1}(\text{planta})$).

Watson (1947) introduziu mais três novos conceitos. O primeiro foi o índice de área foliar (IAF), que é a superfície da área plana das folhas por unidade de área do solo. O segundo foi a taxa de crescimento da cultura (TCC), que considera a assimilação por unidade de área plantada e não por planta. O terceiro conceito foi a duração de área foliar (DAF), que é uma medida da

persistência assimilatória da cultura. Ele sugeriu que esta medição está mais bem correlacionada com a acumulação de biomassa do que a TAA.

Avanços na teoria estatística e o uso de computadores possibilitaram, a partir da década de 1960, a elaboração de novos métodos de análise de crescimento. Inicialmente as curvas foram ajustadas a dados de crescimento primário, contudo, de acordo com Hughes e Freeman (1967), quando submetidos à análise estatística, comprovou-se que esses dados atendiam melhor a uma distribuição logarítmica e assim, as curvas polinomiais ajustadas aos dados logaritmizados passaram a ser utilizadas para fornecer uma descrição empírica do crescimento, facilitando comparações e esclarecendo variações no crescimento. De acordo com Hunt (1979), as funções ajustadas aos dados básicos de crescimento oferecem vantagens uma vez que as variações, decorrentes da variabilidade biológica, tornam-se menores, fornecendo uma visão mais adequada de seu crescimento que no início apresenta-se quase exponencialmente, ou seja, a taxa de crescimento aumenta até um máximo do ponto de inflexão e então, diminui com a massa de matéria seca aproximando-se de um valor final. Apesar de todos os dados matemáticos calculados a partir de observações, os pesquisadores acreditam que não há base teórica para aplicar essas equações à análise de crescimento das plantas e, como aponta Pereira (2002), embora tenham sido utilizadas com sucesso, suas utilizações em estudos sobre crescimento de plantas permanece empírico. Nesse contexto, as curvas são em geral ajustadas por interações, sendo que nem sempre a convergência é obtida.

De modo geral, essa excelente revisão e discussão elaborada por Pereira (2002) refletem a complexidade de procedimentos na análise de crescimento de plantas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento e espécie

O presente trabalho, utilizando *Aloe vera* (L.) Burm. f. como material vegetal, foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (CEBTEC), do Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Campus ESALQ / USP, em Piracicaba, Estado de São Paulo. As plantas iniciais foram colhidas no campo experimental do Departamento de Produção Vegetal da própria ESALQ.

Foram conduzidos dois experimentos. O primeiro refere-se aos estágios I, II, III e IV da micropropagação nos quais, foram realizados tratamentos de desinfestação e aclimação. No segundo experimento as microplantas obtidas foram cultivadas em areia irrigada com solução nutritiva com três doses de nitrogênio. Ao longo do cultivo foram analisados parâmetros fisiológicos, químicos e bioquímicos.

3.2 Micropropagação

Os quatro estágios da micropropagação envolveram o isolamento, desinfestação e introdução (inoculação) de ápices caulinares em cultivo *in vitro* (estágio I), indução e multiplicação de brotos (estágio II), alongamento e enraizamento dos brotos (estágio III) e, finalmente, transplante (aclimação) das microplantas obtidas para condições *ex vitro* (estágio IV).

3.2.1 Estágio I: Isolamento, desinfestação e inoculação dos ápices caulinares

Foram inoculados 480 ápices caulinares (explantos) com volume aproximado de 1 cm³, isolados a partir de brotos laterais jovens (filhotes) com 6 a 9 folhas, com comprimento médio aproximado de 20 cm. Os ápices foram isolados, desinfestados e inoculados ao longo de uma semana, cerca de 10 dias após a coleta dos filhotes a campo. As desinfestações, utilizando dois produtos a base de cloro, foram feitas por meio de 3 tratamentos (T₁, T₂ e T₃), cada um deles em várias etapas. Cada etapa, detalhada abaixo, foi caracterizada pelo seu número sequencial precedido por uma letra especificando o produto utilizado, sendo que (H) refere-se a solução de hipoclorito de sódio com 0,5% de cloro ativo, preparada a partir de alvejantes comerciais à base de hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, (S) refere-se a solução 0,66% preparada a partir de dicloroisocianurato de sódio (Sumaveg[®]) com 3% de cloro ativo.

Os tratamentos consistiram em T₁: H₁, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H₇; T₂: H₀, S₁, S₂, S₃, H₄, H₅, H₆, H₇; T₃: S₀, S₁, H₂, S₃, S₄, H₅, H₆, H₇ e cada etapa (0-7) representa: 0 - lavagem prévia dos filhotes com a respectiva solução; 1 - desbaste de 3 a 4 folhas dos filhotes e imersão na respectiva solução por aproximadamente 30 minutos; 2 - desbaste do restante das folhas e imersão na respectiva solução por aproximadamente 30 minutos; 3 - enxágüe na respectiva solução; 4 -

repouso em imersão na respectiva solução por aproximadamente 2 horas; 5 - enxágue na respectiva solução; 6 - enxágue na respectiva solução preparada com água esterilizada; 7 - desinfestação final por imersão na respectiva solução, preparada com água esterilizada, por 30 minutos, desbaste das camadas mais externas dos explantes até volume aproximado de 1 cm³ e inoculação em meio MS acrescido de 2 mg.L⁻¹ de 6-benzyl aminopurina (6-BAP). O meio MS refere-se à formulação de Murashige e Skoog (1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, pH 5,8 e semi-solidificado com 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel[®].

As desinfestações finais de cada tratamento (etapa 7) foram feitas em câmara de fluxo de ar esterilizado e as esterilizações de água e meios de cultura foram feitas por autoclavagem a 120°C, 1 atm de pressão, por 20 minutos. Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água purificada por sistemas de osmose reversa..

Os efeitos dos três tratamentos de desinfestação sobre os percentuais de contaminação por microrganismos (contaminados), percentuais de explantes necrosados pelos tratamentos (necrosados), e percentuais de explantes descontaminados e verdes em início de brotação (VIB), foram avaliados aos 30 dias de cultivo. Ao final dessas avaliações os resultados foram tabulados e submetidos à análise estatística.

3.2.2 Estágio II: Multiplicação dos brotos

Os ápices caulinares inoculados no estágio I que apresentaram viabilidade de cultivo (ausência de necrose ou contaminação por microorganismos), foram submetidos à multiplicação por meio de quatro repicagens sucessivas com intervalos de 30 dias de cultivo. Na primeira repicagem os ápices caulinares foram divididos longitudinalmente e reinoculados em meio de cultura com mesma formulação, para obtenção de brotações. As repicagens subsequentes, para multiplicação, tiveram o mesmo procedimento anterior, ou seja, isolamento, divisão longitudinal dos brotos e reinoculação no meio de cultura. Para tanto, foram utilizados frascos de 300 mL de capacidade com 50 mL de meio de cultura. Cada frasco, a cada repicagem, recebeu de 7 a 9 inóculos.

3.2.3 Estágio III: Alongamento e enraizamento dos brotos

Depois de cinco repicagens sucessivas com intervalos de cultivo de 30 dias no estágio II, todos os brotos obtidos foram separados e transferidos para meio de cultura com a mesma formulação inicial, porém, em ausência de 6-BAP e induzidos ao alongamento e enraizamento para produção subsequente de microplantas (mudas) íntegras.

3.2.4 Estágio IV: Transplante das microplantas para condições *ex vitro* (aclimação)

Para avaliação das condições de aclimação das microplantas alongadas e enraizadas no estágio III, foram testados dois tipos de bandejas em dois ambientes com três tipos de microplantas. Do total, 38.480 microplantas foram retiradas dos frascos de cultura, avaliado o rendimento médio de cada frasco e de acordo com seu desenvolvimento, foram classificadas em três tipos: pequenas (M_p) com 3 a 4 cm de comprimento, com 2 a 3 folhas; médias (M_m) com 6 a 8 cm de comprimento, com 3 a 4 folhas e grandes (M_g) com 13 a 16 cm de comprimento, com 5 a 7 folhas. O rendimento de cada frasco e as dimensões de cada uma das classificações são mostrados na Figura 1. Essas microplantas foram transplantadas para dois tipos de bandejas, um com 36 células de 80 cm³ de volume (B_1), e outro com 64 células de 40 cm³ de volume de substrato (B_2). Os dois ambientes de cultivo, duas casa-de-vegetação, diferiram em relação ao sistema de irrigação, refrigeração e umidificação. O primeiro refere-se à casa de vegetação com manutenção da umidade relativa e temperatura por meio de micro-aspersão e exaustão de ar em sistema “pad-house” (CV_1). O segundo ambiente refere-se à casa-de-vegetação com manutenção da umidade relativa e temperatura por meio de nebulização e ventilação forçada de ar (CV_2). O sistema de exaustão (CV_1) ou ventilação (CV_2) era acionado sempre que a temperatura atingia 30°C e o sistema de micro-aspersão ou nebulização, acionado diversas vezes ao dia, de acordo com a necessidade de irrigação da cultura.

Como substrato para transplante das microplantas foi utilizado substrato industrializado, preparado a base de casca de Pinus compostada, vermiculita, areia e fertilizantes, com valores pH e condutividade elétrica aproximados de 6,04 e 0,62 $\mu S \cdot cm^{-1}$, respectivamente.

Nesse experimento foram avaliados o percentual de sobrevivência, o incremento de massa de matéria fresca (IMMF) e o incremento de massa de matéria seca (IMMS) em relação à combinação dos três tamanhos de microplantas (M_p , M_m e M_g), os dois tipos bandejas (B_1 e B_2) e os dois sistemas de casa-de-vegetação (CV_1 e CV_2).

Figura 1 – Classificação do tamanho das plantas micropropagadas. A: Microplantas tipo pequenas (M_p). B: médias (M_m) e C: Grandes (M_g)

3.3 Cultivo das plantas em três doses de nitrogênio

O cultivo em diferentes doses de N foi feito com plantas micropropagadas, aclimatadas e padronizadas em relação ao estágio fisiológico de crescimento. Todas as plantas foram submetidas ao cultivo em areia de granulometria média e irrigadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada de acordo com os objetivos dos experimentos. Foram testadas três doses de nitrogênio correspondentes aos tratamentos T_1 , T_2 e T_3 com 105; 210 e 315 ppm, respectivamente. O tratamento T_2 , com 210 ppm de nitrogênio, corresponde à formulação original de Hoagland e Arnon (1950). A composição química das soluções, formulação original, concentrações e modificações realizadas, são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química das soluções nutritivas (macronutrientes em mM e micronutrientes mg.L⁻¹), adaptado de Hoagland e Arnon (1950) e modificada para testar o efeito nutricional de três doses Nitrogênio (N) sobre o desenvolvimento de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. f.

SOLUÇÕES	CONC.	T ₁		T ₂		T ₃	
		mMoles (Sal)	mMoles (N)	mMoles (Sal)	mMoles (N)	mMoles (Sal)	mMoles (N)
KH ₂ PO ₄	M	1	-	1	-	1	-
KNO ₃	M	-	-	-	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂	M	2,5	5	5	10	5	10
MgSO ₄	M	2	-	2	-	2	-
NaNO ₃	M	-	-	-	-	7,5	7,5
NH ₄ NO ₃	M	1,25	2,5	2,5	5	2,5	5
KCl	M	5	-	5	-	5	-
CaCl ₂	M	2,5	-	2,5	-	2,5	-
Micro**	mL	1		1		1	
Fe-EDTA***	mL	1		1		1	

Concentração geral dos elementos												
	T1(N)	T2(N)	T3(N)	Ca	Mg	S	B	Cu	Mn	Mo	Zn	Fe~
mM	7,5	15	22,5	5	2	2	0,05	2,9.10 ⁻⁴	0,009	1,1.10 ⁻⁴	7,3.10 ⁻⁴	0,086
ppm	105	210	315	200	48,6	64,2	0,5	0,02	0,5	0,01	0,05	4,82

* O tratamento T₂ corresponde à concentração original de Hoagland e Arnon (1950).

** Solução de micronutrientes tem a seguinte composição (g.L⁻¹) H₃BO₃ = 2,86; MnCl₂ . 4H₂O = 1,81; ZnCl₂ = 0,10; CuCl₂. 2H₂O = 0,05; H₂MoO₄. H₂O = 0,02

*** Solução de Fe-EDTA foi preparada segundo Jacobson (1951), dissolvendo-se 26,1g de EDTA-Na₂ em 286mL de NaOH 1N e 24g de FeSO₄. 7H₂O, arejando-se por 12 horas no escuro e completando-se o volume a 1litro.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com sistema de exaustão de ar, coberta com plástico transparente de polietileno com tratamento anti-UV, de agosto de 2006 a maio de 2007. A areia de granulometria média (0,25 a 0,5 mm), utilizada como suporte de cultivo, foi lavada com água do sistema de tratamento de água do campus Luiz de Queiroz, acondicionada em vasos de polietileno de 15 litros com 12 litros de areia repassada com 15 litros de água purificada por osmose reversa, por vaso, para lixiviação de resíduos deixados pela água utilizada na lavagem da areia. Os vasos de cada tratamento foram irrigados com 600 mL de sua respectiva solução, em dias alternados, mantendo a areia sempre umedecida sem ocorrência de drenagem. A cada 15 dias foram repassados 5 litros de água purificada para drenagem do excesso de sais.

3.4 Coleta e preparo das amostras

As amostragens das plantas para análises de parâmetros fisiológicos, químicos e bioquímicos foram realizadas aos 90 (tempo 1), 180 (tempo 2) e 270 (tempo 3) dias de cultivo. Os padrões das plantas no início do experimento, evolução do crescimento no momento de cada amostragem e com 330 dias de cultivo, são mostrados nas Figuras 2; 3; 4; 5; 6, 7, 8, 9 e 10. Em cada amostra de cada tratamento, nos respectivos tempos de amostragem, foram calculados os índices de área foliar (IAF), a taxa de assimilação líquida (TAL), a taxa de crescimento relativo (TCR), a taxa de crescimento absoluto (TCA), o incremento de massa de matéria fresca (IMMF), o incremento de massa de matéria seca (IMMS), determinação dos teores foliares de nitrogênio total, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês e zinco, teores de proteínas totais solúveis (PTS), açúcares totais solúveis (ATS) e açúcares redutores (AR).

A cada tempo de cultivo foram colhidas cinco plantas de cada tratamento, lavadas e separadas em raízes e folhas. Cada folha teve seu desenho contornado e recortado em papel tipo cartolina para leitura em medidor de área foliar LI-COR 3100TM. Os desenhos foram feitos pela dificuldade de se medir a área foliar diretamente no aparelho devido à espessura diferenciada desse tipo de folha.

Figura 2 – Padrão das plantas de *Aloe vera* no início do cultivo em doses de nitrogênio, em casa-de-vegetação

Figura 3 – Padrão das plantas no início do cultivo, em centímetros, em três doses de Nitrogênio

Figura 4 – Padrão das plantas de *Aloe vera* aos 90 dias de cultivo em doses de nitrogênio, em casa-de-vegetação

Figura 5 – Padrão das plantas de *Aloe vera* aos 90 dias de cultivo em doses de Nitrogênio (N)

Figura 6 – Padrão das plantas de *Aloe vera* aos 180 dias de cultivo em doses de nitrogênio, em casa-de-vegetação

Figura 7 – Padrão das plantas de *Aloe vera* aos 180 dias de cultivo em doses de Nitrogênio (N)

Figura 8 – Padrão das plantas de *Aloe vera* aos 270 dias de cultivo em doses de nitrogênio, em casa-de-vegetação

Figura 9 – Padrão das plantas de *Aloe vera* aos 270 dias de cultivo em doses de Nitrogênio (N)

Figura 10 – Padrão das plantas de *Aloe vera* aos 330 dias de cultivo em doses de nitrogênio

As determinações químicas e bioquímicas foram realizadas em todo o conjunto de folhas que constitui a parte aérea da planta inteira (Figura 11A). Essas folhas foram pesadas para determinação de massa matéria fresca (MMF) e colocadas para secagem. Para facilitar a secagem, as folhas foram cortadas em pedaços menores e pré-secadas em casa de vegetação, em temperatura ambiente, com circulação de ar por 3 a 4 dias (Figura 11B), e então, colocadas para secagem final em estufa com renovação e circulação de ar a 65°C, por 14 dias, até massa de matéria seca (MMS) constante. A seguir, o material foi pesado para determinação de massa de matéria seca, moído em moinho tipo Wiley para obtenção de partículas homogêneas, acondicionado em frascos de vidro, devidamente tampados, identificados e armazenados em freezer a -20°C.

3.5 Análise de crescimento

Além do incremento de massa de matéria fresca (IMMF) e incremento de massa de matéria seca (IMMS), o crescimento das plantas foi analisado em termos de evolução do índice

Figura 11 – A: Conjunto de folhas de uma planta inteira (Pi) aos 270 dias de cultivo com dose de nitrogênio de 210 ppm. B: Visão geral da pré-secagem das folhas em casa de vegetação com circulação de ar

de área foliar (IAF) eq. (1), taxa de assimilação líquida (TAL) eq. (2), taxa de crescimento relativo (TCR) eq. (3) e taxa de crescimento absoluto (TCA) eq. (4). Os cálculos foram feitos com base nas equações de Blackman e Wilson 1951 apud Castro (1974) e Benicasa (2003).

$$IAF = \frac{A}{S} \quad (1)$$

$$TAL = \frac{(P_2 - P_1)}{(A_2 - A_1)} \cdot \frac{(\log_e A_2 - \log_e A_1)}{(T_2 - T_1)} \cdot 1000 = mg.cm^{-2}.dia^{-1} \quad (2)$$

$$TCR = \frac{(\log_e P_2 - \log_e P_1)}{(T_2 - T_1)} = g.g^{-1}.dia^{-1} \quad (3)$$

$$TCA = \frac{P_2 - P_1}{T_2 - T_1} = g.dia^{-1} \quad (4)$$

em que:

A/S = razão, área foliar / área da superfície do vaso.

$P_2 - P_1$ = diferença de massa matéria seca, em g, entre duas amostras de coletas consecutivas.

$A_2 - A_1$ = diferença de área foliar, em cm^2 , entre duas amostras de coletas consecutivas.

$T_2 - T_1$ = tempo transcorrido, em dias, entre duas amostras de coletas consecutivas.

3.6 Determinação dos teores de nutrientes nas folhas

Os teores de nutrientes nas folhas, excetuando o enxofre, foram determinados segundo Sarruge e Haag (1974). Os teores de nitrogênio total foram determinados por destilação alcalina em microkjeldahl seguida de titulação com ácido sulfúrico no extrato obtido por digestão sulfúrica de 100 mg de MMS. Os teores de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, manganês e cobre, foram determinados no extrato obtido pela digestão nítrico-perclórica de 500 mg de MMS. O boro foi determinado no extrato obtido por digestão via seca de 100 mg de MMS. O fósforo, o enxofre e o boro foram determinados pelos métodos analíticos colorimétricos, sendo a do metavanadato para o fósforo, a turbodimetria para o enxofre e a colorimetria com azometina-H para o boro. Os teores de potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês, cobre e zinco foram determinados pelo método espectrofotométrico de absorção atômica. A metodologia para determinação dos teores de enxofre, baseada na turbidez do precipitado na forma de sulfato de bário, foi realizada segundo Vitti (1988).

Os valores obtidos nas determinações colorimétricas e de absorção atômica foram calculados com base nas interpolações em curvas padrão específicas para cada elemento.

3.7 Determinação dos teores de proteínas totais solúveis (PTS)

A determinação dos teores de PTS foi feita pelo método de Bradford (1976). A extração das proteínas foi feita com 100 mg de matéria seca mais 1,5 mL de tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5. Depois de agitação vigorosa (vortex), o material foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante colhido como extrato. A reação foi feita com 0,1 mL de extrato mais 5 mL de reagente de Bradford. A leitura colorimétrica da reação foi feita em espectrofotômetro modelo “ultrospec 2100 pro” a 595 nm. Os teores de PTS foram calculados pela interpolação dos resultados na curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). Os resultados foram expressos em mg de PTS.g⁻¹ de MMS.

3.8 Determinação dos teores de açúcares totais solúveis (ATS)

A determinação dos teores de ATS foi feita pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956). A extração dos açúcares foi feita em duas etapas. Inicialmente, 100 mg de MMS mais 5 mL de água desionizada. Depois de agitação vigorosa (vortex), a mistura foi incubada em banho-maria a 60°C por 30 minutos, seguida por centrifugação a 3.000 g por 15 minutos e coleta do sobrenadante como extrato 1. Na segunda etapa, o sedimento foi submetido novamente a mesma extração e o sobrenadante foi coletado como extrato 2. Os extratos 1 e 2 foram misturados gerando o extrato final. A reação foi feita adicionando 0,5 mL de extrato, diluído de zero a dez vezes conforme os teores de ATS, acrescentado de 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A leitura colorimétrica da reação, depois de resfriada a temperatura ambiente, foi feita em espectrofotômetro modelo “ultrospec 2100 pro” a 490 nm. Os teores de ATS foram calculados pela interpolação dos resultados na curva padrão de glicose. Os resultados foram expressos em mg de glicose.g⁻¹ de MMS.

3.9 Determinação dos teores de açúcares redutores (AR)

A determinação dos teores de AR, no mesmo extrato descrito anteriormente para ATS, foi feita pelo método de Somogyi e Nelson descrito por Nelson (1944), modificado. O reagente de Somogyi foi preparado dissolvendo 28g de Na₂HPO₄ mais 40g de tartarato duplo de sódio e potássio em 700 mL de água desionizada. Adicionou-se 100 mL de NaOH 1N. A seguir, sob agitação constante e vigorosa, gotejou-se 80 mL de CuSO₄.5H₂O a 10% e acrescentou-se 180 g de NaSO₄ anidro. O volume foi aferido para 1L, acondicionado em frasco escuro, ficou em repouso por 48 horas. O reagente de Nelson foi preparado dissolvendo-se 50 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O em 450 mL de água desionizada. Cuidadosamente, adicionou-se 56 mL de ácido sulfúrico concentrado e acrescentou-se 6g de Na₂HAsO₄.7H₂O dissolvido em 50 mL de H₂O. O volume foi aferido para 1L, acondicionado em frasco escuro, ficou em repouso por 48 horas.

Para determinação dos açúcares foram utilizados 1 mL do extrato, diluído de zero a dez vezes conforme os teores de AR, acrescentado de 1 mL de reagente de Somogyi, incubação em banho-maria a 95 °C por 10 minutos, resfriado à temperatura ambiente e acrescentado 1 mL do

reagente de Nelson. A solução colorida, resultante da reação, foi analisada em espectrofotômetro modelo “ultrospec 2100 pro” a 520 nm. Os teores de AR foram calculados pela interpolação dos resultados na curva padrão de glicose. Os resultados foram expressos em mg de glicose.g⁻¹ de MMS.

3.10 Análises estatísticas

O experimento de desinfestação foi delineado em blocos inteiramente casualizados e o experimento de aclimação delineado em blocos inteiramente casualizados em arranjo fatorial 3x2x2 representando tamanho de microplantas, tipos de bandejas e tipos de casa-de-vegetação, respectivamente.

Os resultados foram analisados por meio do aplicativo ‘Statistical Analysis System’ (SAS Institute, 1996), sendo todos os dados submetidos à análise da variância a 5% de probabilidade. Quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste DMS (experimento de desinfestação) ou de Tukey (experimento de aclimação), procedendo-se o desdobramento dos níveis de cada fator quando a interação foi significativa.

Os resultados dos efeitos das doses de 105; 210 e 315 ppm de nitrogênio aos 90; 180 e 270 dias de cultivo sobre as variáveis avaliadas, em delineamento inteiramente casualizado, foram submetidos à análise de regressão e analisadas utilizando-se o modelo estatístico de superfície de resposta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desinfestação dos ápices caulinares

A partir dos 480 ápices amostrados, conforme análise de variância (anexos 1, 2 e 3), observou-se que os tratamentos de desinfestação T₁ (H₁, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆ e H₇), T₂ (H₀, S₁, S₂, S₃, H₄, H₅, H₆ e H₇) e T₃ (S₀, S₁, H₂, S₃, H₄, H₅, H₆ e H₇), mostrados na Figura 12, exerceram diferentes efeitos sobre os percentuais de contaminação por microorganismos, basicamente por bactérias, sobre o necrosamento dos ápices e sobre os ápices verdes em início de brotação (VIB).

Figura 12 – Efeito dos tratamentos de desinfestação sobre os percentuais de ápices caulinares contaminados, necrosados e verdes com início de brotações (V.I.B.). Colunas seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Em relação aos percentuais de contaminação, apesar dos tratamentos T_2 e T_3 não apresentarem diferenças significativas entre si ($P > 0,05$), eles diferiram significativamente do tratamento T_1 ($P < 0,05$). Os três tratamentos mostraram eficiência na desinfestação dos ápices caulinares. O melhor resultado foi observado no tratamento T_3 com apenas 13,12% de explantes contaminados. De forma similar observou-se 15,00% de contaminação para T_2 . O pior resultado foi observado no tratamento T_1 com 32,81% de explantes contaminados.

Essa maior eficiência de desinfestação apresentada pelos tratamentos T_2 e T_3 pode ser justificada pela alternância de utilização dos dois produtos desinfestantes ao longo dos tratamentos ou pelo fato dos filhotes terem sido previamente lavados em solução desinfestante no início do processo na etapa zero (S_0 e H_0). Apesar dos dois procedimentos, alternância de produtos e lavagem prévia dos filhotes, utilizadas nos tratamentos T_2 e T_3 , pode-se atribuir a maior eficiência relativa desses tratamentos à lavagem prévia dos filhotes colhidos a campo pelo fato de causar a eliminação do excesso de partículas de sujeira. Esse excesso de partículas carregadas de agentes contaminantes, se não eliminadas previamente, transmitem os microrganismos contaminantes de uma etapa a outra. Por outro lado, os procedimentos de

alternância na utilização de diferentes produtos e lavagem prévia dos filhotes devem ser testados separadamente em novos experimentos.

Outro fato a considerar, apesar de não ter sido avaliado, refere-se ao tempo decorrido entre a coleta dos filhotes a campo e o isolamento, desinfestação e inoculação dos ápices caulinares. Tudo indica que se os filhotes forem colhidos e imediatamente tratados, mais eficiente será qualquer tratamento de desinfestação. Esse fato é bem justificado pelos resultados obtidos por Hamill et al. (1993). Esses autores testaram 4 tratamentos de desinfestação a base de hipoclorito de sódio, sobre ápices caulinares isolados a partir de rizoma de bananeira 1 dia e 10 dias depois de coletados a campo. Os melhores resultados de desinfestação foram observados nos ápices isolados de rizomas 1 dia depois de coletados. O percentual de contaminação nesse caso foi de apenas 10%. No caso de ápices isolados 10 dias depois da coleta dos rizomas, o percentual aumentou expressivamente nos diferentes tratamentos testados.

Quanto aos efeitos necróticos nos explantes, os resultados não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos cujas médias foram de 49,69% para T₁, 50,00% para T₂ e 54,38% para o tratamento T₃. Observa-se que os três tratamentos foram bastante lesivos aos ápices caulinares, ressaltando-se que esses resultados são bastante elevados para o rendimento de um bom protocolo de micropropagação. Isso se justifica pelo fato de que a necrose em questão levou à morte total dos explantes os quais, foram descartados. Se for considerado que ao longo de quatro repicagens multiplicativa cada ápice caulinar viável de cultivo, como observado nos explantes VIB, poderia gerar 300 microplantas, qualquer percentual menor de mortes geraria rendimentos expressivos ao longo do processo de micropropagação.

Analisando essa agressividade dos tratamentos de desinfestação sobre os explantes introduzidos em cultivo *in vitro*, espera-se que esses tratamentos causem lesões necróticas às células e tecidos dos explantes. Isto se explica pelo fato dos agentes desinfestantes destruírem as células de maneira generalizada por oxidação, seja dos microrganismos contaminantes, seja das células vegetais componentes do tecido ou órgão vegetal e, dependendo do grau das lesões, é possível causarem a morte total do explante. Esse grau de agressividade depende da natureza do material vegetal, do tipo de agente desinfestante e dos processos que envolvem o tratamento de desinfestação e no caso específico deste experimento, os ápices caulinares de *Aloe vera* são órgãos com tecidos pouco lignificados e bastante sensíveis a agentes desinfestantes. Considerando ainda que as soluções tendo cloro como princípio ativo são bastante efetivas em

tratamentos de desinfestação e facilmente removíveis por meio de lavagens com água, os efeitos necróticos causados aos explantes possivelmente não tenham sido consequência da toxidez do cloro do hipoclorito, nem pelo produto dicloroisocianurato de sódio, amplamente utilizada na desinfestação de produtos minimamente processados (LUND et al., 2005), e sim pela alta alcalinidade da solução desinfestante, principalmente durante a etapa 4 dos tratamentos de desinfestação, na qual os explantes ficaram imersos, em repouso, por 2 horas.

Apesar dos índices de contaminação e dos altos índices de necrose dos explantes, constatou-se um bom índice de ápices caulinares VIB totalmente descontaminados e com excelentes potenciais de multiplicação. Depois de 90 dias de cultivo esses ápices apresentaram-se com excelente aparência, tornaram-se verdes e apresentaram início de emissão de brotos. Os tratamentos T₂ e T₃ não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$), mas foram significativamente diferentes de T₁ ($P < 0,05$). As médias de ápices caulinares VIB para T₁ foi de 17,50%, para T₂ de 35,00% e para o tratamento T₃ foi de 32,50%.

Os 136 ápices verdes em início de brotação (VIB), resgatados dos tratamentos de desinfestação e introduzidos na fase de multiplicação, utilizando meio MS acrescido de 6-BAP (2 mg.L^{-1}), foram submetidos a quatro repicagens multiplicativa com intervalos de cultivo de 30 dias. Ao final do processo de multiplicação e enraizamento foram resgatadas 40.495 microplantas, conferindo portanto, um rendimento de 300 microplantas por ápice caulinar, ou seja, uma razão de 1:5,3 a cada repicagem.

Resultados semelhantes em *Aloe vera* foram observados por Marfori e Malasa (2005) testando níveis de 6-BAP ou cinetina. Os melhores resultados foram observados nos tratamentos utilizando $2,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP com rendimento de 1:11,3 e no tratamento utilizando 1 mg.L^{-1} 6-BAP com rendimento de 1:9. Outro resultado condizente foi observado por Liao et al. (2004) que, utilizando 2 mg.L^{-1} de 6-BAP combinado com $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, obtiveram um rendimento de 1:15. Araújo et al. (2002) utilizaram combinações de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP e $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA na multiplicação de 16 genótipos de *Aloe vera*. O rendimento multiplicativo variou de 1:2 até 1:8, dependendo do genótipo utilizado. Esses resultados, entretanto, não devem ser confrontados integralmente com os resultados do presente trabalho pelo fato de terem produzido no máximo algumas centenas de microplantas, o que não caracteriza uma produção comercial, com produção massal.

4.2 Transplante das microplantas para condições *ex vitro* (aclimação)

Conforme análise de variância para a variável porcentual de sobrevivência (anexo 4), apenas o fator tamanho das microplantas apresentou diferença significativa ($P < 0,05$). Nenhum dos outros fatores, como tipo de casa de vegetação ou tipo de bandeja, nem suas interações, apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$). Quanto ao tamanho (Figura 13), as microplantas tipo médias (M_m) e tipo grandes (M_g) apresentaram diferenças significativa ($P < 0,05$) sobre as microplantas tipo pequenas (M_p).

Figura 13 - Porcentuais de sobrevivência em função do tamanho das microplantas. M_p - microplantas pequenas; M_m - microplantas médias e M_g - microplantas grandes. Colunas seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

As análises de variância para as variáveis IMMF (anexo 5) e IMMS (anexo 6) mostraram interação positiva entre os três fatores testados ($P < 0,05$) durante a aclimação das microplantas. Contudo, verifica-se, tanto para IMMF (Tabela 2) como para IMMS (Tabela 3), que as variações estabelecidas para casa-de-vegetação e tamanho de bandejas não interferiram no crescimento das plantas, com exceção do tratamento com microplantas grandes. Nesse caso, observa-se maior IMMF quando microplantas grandes foram cultivadas em bandejas de 36 células (B_1) na casa-de-vegetação com microaspersão (CV_1). Porém, o IMMF de microplantas grandes (M_g), foi maior na casa-de-vegetação com micro-aspersão (CV_1) em relação ao mesmo tipo de microplantas cultivadas na casa-de-vegetação com nebulização (CV_2), tanto em bandejas de 36 (B_1) como em

Tabela 2 - Efeito das condições de aclimação sobre o incremento de massa de matéria fresca (IMMF) em gramas

Tamanho de microplantas	C. Vegetação 1 (CV ₁)		C. Vegetação 2 (CV ₂)	
	Bandeja 1 (B ₁)	Bandeja 2 (B ₂)	Bandeja 1 (B ₁)	Bandeja 2 (B ₂)
M _p	10,49 aA*	8,60 aA*	8,36 aA*	7,03 aA*
M _m	15,58 aA*	12,01 aA*	15,39 aA [■]	9,66 aA*
M _g	32,50 aA [■]	20,55 bA [■]	21,69 aB [■]	18,86 aA [■]

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra ou símbolo iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras minúsculas: Comparação na linha para bandejas (Microplantas e C.Vegetação constantes). Letras Maiúsculas: Comparação na linha para C. Vegetação (Microplantas e bandeja constantes). Símbolos (* ■): Comparação na coluna para tamanho de microplantas (Bandeja e C. Vegetação constantes). (M_p): Microplantas tipo pequenas. (M_m): Microplantas tipo média. (M_g): Microplantas tipo grande. (CV₁): Casa-de-vegetação com micro-aspersão e refrigeração por exaustão tipo 'pad-house'. (CV₂): Casa-de-vegetação com nebulização e ventilação forçada. (B₁): Bandeja de 36 células com 80 cm³ de substrato. (B₂): Bandeja de 64 células com 40 cm³ de substrato.

Tabela 3 - Efeito das condições de aclimação sobre o incremento de massa de matéria seca (IMMS) em gramas

Tamanho de microplantas	C. Vegetação 1 (CV ₁)		C. Vegetação 2 (CV ₂)	
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 1	Bandeja 2
M _p	0,20 aA*	0,16 aA*	0,18 aA*	0,15 aA*
M _m	0,29 aA*	0,24 aA* [■]	0,35 aA [■]	0,21 aA*
M _g	0,60 aA [■]	0,38 bA [■]	0,48 aA [■]	0,39 aA [■]

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra ou símbolo iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras minúsculas: Comparação na linha para bandejas (Microplantas e C.Vegetação constantes). Letras Maiúsculas: Comparação na linha para C. Vegetação (Microplantas e bandeja constantes). Símbolos (* ■): Comparação na coluna para tamanho de microplantas (Bandeja e C. Vegetação constantes). (M_p): Microplantas tipo pequenas. (M_m): Microplantas tipo média. (M_g): Microplantas tipo grande. (CV₁): Casa-de-vegetação com micro-aspersão e refrigeração por exaustão tipo 'pad-house'. (CV₂): Casa-de-vegetação com nebulização e ventilação forçada. (B₁): Bandeja de 36 células com 80 cm³ de substrato. (B₂): Bandeja de 64 células com 40 cm³ de substrato.

bandejas de 64 células (B₂). O tamanho das microplantas foi o fator que mais interferiu no IMMF e no IMMS e, em apenas um caso, as microplantas tipo média (M_m), juntamente com tipo grande (M_g), diferiram significativamente (P<0,05) daquelas do tipo pequena (M_p), cultivadas em bandeja de 36 células (B₁), na casa-de-vegetação com nebulização (CV₂). No restante dos casos, as microplantas tipo grande (M_g) apresentaram diferença significativa (P<0,05) em quaisquer das condições testadas.

Portanto, analisando conjuntamente as variáveis percentuais de sobrevivência, IMMF e IMMS, observou-se que microplantas tipo grande (M_g) foi o fator preponderante no sucesso do processo de aclimação.

As diferenças significativas das microplantas tipo grande (M_g) sobre tipo pequenas (M_p) e tipo médias (M_m), em quaisquer das condições testadas, ocorreram devido ao tamanho das microplantas que apesar de ser um parâmetro numérico apresentam maior vigor. Caracterizam-se também pelo estágio de desenvolvimento fisiológico representado, por exemplo, por estádios mais avançados de diferenciação cloroplastidial, pela epiderme com seus estômatos e camada de cutina mais desenvolvida, pela lignificação de células e tecidos e principalmente pelo estágio de indução radicular. Obviamente, as microplantas tipo grande carregam consigo toda essa gama de aspectos fisiológicos. Portanto, ao invés de se retirar todas as microplantas do frasco em ambiente aberto, os resultados sugerem uma seleção em ambiente asséptico, retornando as microplantas menores para mais um período de alongamento e enraizamento *in vitro* até que atinjam um tamanho ideal para aclimação. Contudo, esse procedimento envolve tempo, mão-de-obra e material, e o seu custo/benefício deve ser melhor analisado.

Além disso, o fato das diferenças significativas em favor das microplantas tipo grande ter apresentado resultados quase que padronizados pode ser justificado pelo respeito aos princípios básicos, exigidos nos transplantes de microplantas produzidas *in vitro* para condições *ex vitro*. Esses princípios, eleitos ao longo do desenvolvimento de técnicas de produção de plantas *in vitro*, para os mais diversos propósitos, referem-se às exigências básicas para adaptações progressivas ao ambiente natural, iniciando-se em ambiente sombreado com alta umidade relativa do ar, para que as microplantas desenvolvam seu potencial fotossintético, antes quase heterotróficas; para que incrementem sua taxa respiratória, antes reduzido e, finalmente, para que as plantas se adaptem à grande diversidade de microrganismos saprofíticos e as vezes patogênicos (GROUT; ASTON, 1977; WARDLE et al., 1983; e GRATTAPAGLIA; MACHADO 1990).

Os resultados mostrando que o tamanho das microplantas foi fator preponderante na aclimação, remete à reflexão sobre procedimentos que ofereçam melhor custo/benefício durante o processo. Nesse sentido, em se tratando de produção *in vitro*, em larga escala, a escolha de bandeja mostrou-se com um custo benefício/altamente vantajoso em termos de economia de substrato e espaço em casa-de-vegetação. Os dois tipos de bandejas, quadradas, têm as mesmas medidas externas, 40 cm de largura. A diferença reside no fato de que uma é dividida em 36

células de 80 cm³, e outra em 64 células de 40 cm³. O custo unitário é praticamente o mesmo para os dois tipos. Portanto, considerando que o tipo de bandeja, quando utilizada com microplantas tipo grande não interferiu no porcentual de sobrevivência, no IMMF e IMMS, a escolha de bandeja de 64 células de 40 cm³ (B₂) garante 43,75% de economia em espaço físico na casa-de-vegetação e 50% em relação ao substrato por microplanta aclimatada.

De maneira semelhante, como os fatores casa-de-vegetação com micro-aspersão (CV₁) ou com nebulização (CV₂), também não interferiram no processo de aclimação de microplantas tipo grande e considerando que a dimensão da casa de vegetação com micro-aspersão utilizada foi de 800 m², e sua área útil, respeitando todos os espaçamentos de mesas, comportaria 3.330 bandejas, se forem utilizadas bandejas de 36 células, aclimatar-se-iam no máximo 119.880 microplantas. Utilizando-se bandejas de 64 células, elevar-se-ia a capacidade para 213.120, quase 100.000 microplantas a mais por etapa de aclimação, que no caso de *Aloe vera*, é de aproximadamente 3 meses até que as plantas estejam prontas para o plantio definitivo.

O melhor custo/benefício proporcionado pela bandeja de 64 células não se restringe a economia de substrato e espaço físico na casa-de-vegetação. Essa economia se estende ao transporte e armazenamento das microplantas para o local de destino de plantio. Como as plantas são transportadas nas bandejas em caminhões e o custo desse tipo de transporte é normalmente alto, as bandejas de 64 células representam excelente economia sobre as bandejas de 36 células, pois cada caminhão, independente de seu tamanho, levaria quase o dobro da quantidade. Além disso, segundo Scheffer (1993), para plantio definitivo de microplantas produzidas *in vitro* e aclimatadas em casas-de-vegetação, é recomendável adaptá-las às condições de campo. Essa fase de aclimação final, denominada endurecimento, é feita a campo aberto com certa proteção por meio de cobertura com tela sombrite, pelo menos por uma semana. Isso demanda mais investimento em área, irrigação e cobertura, e conseqüentemente, quanto menor for a área ocupada mais prático e econômico será o processo de endurecimento, portanto, se constitui em uma vantagem a mais das bandejas de 64 células.

Outra economia mostrada neste trabalho refere-se aos sistemas de irrigação na casa-de-vegetação, se por micro-aspersão ou por nebulização. Esses sistemas, além de irrigarem a cultura, funcionam também para o aumento da umidade relativa e para a manutenção do controle de temperatura do ambiente, especialmente em condições tropicais nas quais o experimento foi desenvolvido. É sabido que os custos de um sistema de nebulização é muito mais caro e se no

caso, não existirem diferenças funcionais entre os dois sistemas, é muito mais econômico usar o sistema de micro-aspersão. Contudo, apesar dos resultados mostrarem quase nenhuma diferença de interferência entre os dois sistemas sobre processo de aclimação, e pelo fato desses sistemas terem sido testados com vários outros fatores, sugere-se que sejam melhor estudados, de preferência, utilizando somente esses sistemas de irrigação sobre microplantas tipo grande em bandejas de 64 células.

As novas condições de solo ou substrato de cultivo que a microplanta tem de enfrentar também se caracterizam como etapa crítica nos processos de aclimação. *In vitro* as condições são de formulações nutricionais mais adequadas, com excelente disponibilidade hídrica e nutricional propiciada por meio de controle de pH e semi-solidificação do meio de cultura. Assim, o substrato para o qual as microplantas são transplantadas deve fornecer boa capacidade de retenção de umidade, textura e porosidade que possa garantir drenagem e aeração do sistema radicular adequadas, devendo ser quimicamente inerte (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1990; ARAÚJO et al., 2002). Nesse contexto, o substrato utilizado na aclimação, a base de casca de *Pinus* compostada, vermiculita e areia, com baixos teores de fertilizantes químicos, pH e condutividade elétrica em torno de 6,04 e 0,62 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$, respectivamente, com boa capacidade de retenção de umidade e simultânea drenagem de excessos de água, mostrou bons resultados para aclimação das microplantas de *Aloe vera* produzidas *in vitro*.

De maneira geral, os resultados obtidos preenchem, pelo menos parcialmente, uma lacuna na literatura. Segundo Grattapaglia e Machado (1990), e que prevalece até os dias de hoje, poucos trabalhos têm relatado os detalhes de procedimentos de transplante e aclimação. Essa carência de informações, talvez devido a segredos industriais, se torna ainda maior no caso de produção de grandes quantidades de plantas num sistema comercial de micropropagação.

Uma visão geral do processo, detalhes das microplantas depois de três meses de aclimação, e aspectos das microplantas aclimatadas em bandejas de 36 e de 64 células, são mostrados nas Figuras 14, 15, 16 e 17, respectivamente.

Figura 14 – Visão geral do processo de aclimação das microplantas de *Aloe vera* na casa-de-vegetação com micro-aspersão e exaustão de ar com sistema 'Pad-house' (CV₁) com dimensões de 800 m² e espaço útil para 3.330 bandejas

Figura 15 – Detalhes de microplantas com três meses de aclimação na casa-de-vegetação com micro-aspersão e exaustão de ar com sistema 'Pad-house' (CV₁)

Figura 16 – Aspecto de microplantas aclimatadas em bandejas de 36 células com 80 cm³ de substrato (B₁) depois de dois meses de aclimação

Figura 17 – Aspecto de microplantas aclimatadas em bandeja de 64 células com 40 cm³ de substrato (B₂) depois de dois meses de aclimação

4.3 Efeito de doses de nitrogênio e tempo de cultivo sobre os teores de macronutrientes

Os fatores doses de nitrogênio (105; 210 e 315 ppm) e tempo (90; 180 e 270 dias de cultivo) foram significativos ($P < 0,05$) em relação aos teores de nitrogênio, fósforo, cálcio e magnésio na planta. Para os teores de potássio e enxofre apenas o fator tempo foi significativo ($P < 0,05$) (Anexos 7; 8; 9; 10; 11 e 12). Os teores de cada macronutriente, expressos em g.Kg^{-1} de massa de matéria seca (MMS), em cada tempo de cultivo e em cada dose de nitrogênio são mostrados na Tabela 4 e nas figuras 18A; B; C; D; E e F.

Tabela 4 – Teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) expressos em g.Kg^{-1} de massa de matéria seca em plantas de *Aloe vera*, cultivadas em doses de nitrogênio expressas em ppm e tempos expressos em dias de cultivo

Doses N (ppm)	Tempo (DDC)	N	P	K	Ca	Mg	S
105	90	16,96	2,39	64,43	34,94	14,47	3,11
	180	24,88	4,84	81,10	40,91	11,20	4,48
	270	16,45	4,83	51,14	27,34	6,47	2,76
210	90	21,54	3,00	68,69	38,01	13,84	3,39
	180	24,81	5,19	73,92	36,27	9,88	4,49
	270	19,50	5,14	56,23	22,81	6,40	2,15
315	90	22,48	2,72	58,54	30,19	12,31	2,75
	180	26,19	4,13	77,62	24,78	6,98	4,17
	270	23,32	4,11	52,27	16,73	4,15	2,19

Os teores de nitrogênio na planta apresentaram comportamentos diferentes em relação ao tempo de cultivo e às doses testadas de nitrogênio. Os teores de nitrogênio aumentaram e decresceram dos 90 aos 180 dias e dos 180 aos 270 dias de cultivo, respectivamente. As doses crescentes de nitrogênio (105; 210 e 315 ppm) favoreceram um incremento contínuo nos teores de nitrogênio na planta, explicado pelo aumento da disponibilidade desse nutriente. Aos 90 dias de cultivo, os teores de nitrogênio na planta aumentaram de 16,96 na dose de 105 ppm para 21,54 na dose de 210 ppm e para 22,48 gN.Kg^{-1} de MMS na dose de 315 ppm de nitrogênio. Aos 180 dias de cultivo, os teores se mantiveram estáveis nas doses de 105 e 210 ppm e aumentaram de 24,88 na dose de 105 ppm para 26,19 gN.Kg^{-1} de MMS na dose de 315 ppm de nitrogênio. Aos

Figura 18 – Efeito de doses de nitrogênio (N) em ppm e tempo em dias de cultivo sobre os teores de macronutrientes, em g.Kg⁻¹ de massa de matéria seca, em plantas de *Aloe vera*. A: Teores de nitrogênio (N); B: Teores de fósforo (P); C: Teores de potássio (K); D: Teores de cálcio; (Ca). E: Teores de magnésio e F: Teores de enxofre (S)

270 dias de cultivo os teores de nitrogênio aumentaram continuamente nas doses de 105; 210 e 315 ppm de nitrogênio, aumentando de 16,45 para 19,50 e para 23,32 gN.Kg⁻¹ de MMS, respectivamente.

O aumento dos teores de nitrogênio, observados ao longo de todo período de cultivo, correspondente ao período de maior crescimento vegetativo mostrando a exigência da planta por esse elemento, principalmente nesse período de crescimento quando a taxa fotossintética é alta e demanda altos teores de clorofila e proteínas estruturais e enzimáticas como a fosfoenolpiruvato carboxilase e ribulose 1,6-bifosfato carboxilase/oxigenase, responsáveis pela assimilação e fixação de CO₂ em plantas com metabolismo ácido das crassuláceas como *Aloe vera*. Os aumentos nos teores de nitrogênio acompanharam os aumentos do índice de área foliar (IAF), da taxa de crescimento relativo (TCR), do incremento de massa de matéria fresca (IMMF) e seca (IMMS) (Tabela 7). Em função do comportamento dessas variáveis, discutidas adiante, os aumentos dos teores de nitrogênio apresentados acima poderiam até ter sido mais acentuados, contudo, o crescimento observado, referiu-se principalmente ao aumento da polpa, constituída basicamente de gel a base de polissacarídeos que, segundo Femênia et al. (1999), corresponde a 80% das folhas e desses 80% quase 99% constitui-se de água. Além disso, o gel da polpa é bastante pobre em compostos nitrogenados (GOWDA et al., 1979; MANDAL; DAS, 1980a; MANDAL; DAS, 1980b; MANDAL et al., 1983). Portanto, o discreto aumento dos teores de nitrogênio das folhas restringe-se quase que exclusivamente ao crescimento do componente “rind”, que corresponde basicamente à epiderme, parênquima clorofiliano e feixes vasculares (NI et al. 2004). Por outro lado, as doses de 105 ppm de nitrogênio não causaram nenhum sintoma de deficiência nas plantas e as doses de 315 ppm, não causou nenhum aumento exagerado desse elemento nas folhas.

Os teores médios, em torno de 20 gN.Kg⁻¹ de MMS observados ao longo de 270 dias de cultivo, equivaleram aos teores de nitrogênio em *Aloe vera* observados por Fuentes-Carvajal et al. (2006), aos 180 dias de cultivo na mesma solução nutritiva utilizada neste trabalho. Entretanto, Garcia-Hernandez et al. (2006) apontou um teor foliar de 8,1 gN.Kg⁻¹ para uma boa produtividade de *Aloe vera* se cultivada em solo calcário de regiões áridas do México.

Segundo Malavolta (2006), nas principais culturas brasileiras, os teores foliares adequados de nitrogênio variam desde de 11 a 18 gN.Kg⁻¹ em gramíneas forrageiras e até de 55 a 58 gN.Kg⁻¹ de MMS em soja.

Semelhantemente ao comportamento dos teores de nitrogênio ao longo do tempo, os teores de fósforo na planta aumentaram dos 90 aos 180 dias e permaneceram estáveis dos 180 aos 270 dias de cultivo. As doses de 210 ppm favoreceram teores de fósforo mais altos em relação às doses de 105 e 315 ppm de nitrogênio aos 90; 180 e 270 dias de cultivo.

O aumento nos teores de fósforo na planta, observado dos 90 aos 180 dias de cultivo está relacionado diretamente a expansão foliar mais intensa justamente nesse período (FUENTES-CARVAJAL et al. 2006). Nessa fase de crescimento observam-se maiores intensidades fotossintéticas. Diferentemente de outras espécies vegetais que acumulam outras formas de reserva como amido nos cloroplastos, por exemplo, quase todos os açúcares produzidos na fotossíntese pela *Aloe vera* são exportados para células parenquimáticas do tecido aquífero onde são convertidos em manose e polimerizados. Essas células quando totalmente expandidas ocupam cerca de 60% do volume foliar (JING-YUAN et al. 2003).

Nesse experimento, os teores de fósforo nas folhas aos 180 dias de cultivo em presença de 210 ppm de nitrogênio, foi de $5,19 \text{ gP.Kg}^{-1}$ de MMS. Dos 180 aos 270 dias de cultivo os teores permaneceram estáveis independentemente do aumento das doses de nitrogênio. Talvez, se tivesse ocorrido deficiência de nitrogênio, possivelmente os teores médios teriam aumentado continuamente pelo fato da deficiência de nitrogênio promover aumentos no teor de fósforo. Inversamente, teores tóxicos de nitrogênio levam a teores mais baixos de fósforo nas folhas. Contudo, as doses de 315 ppm de nitrogênio não chegaram ao nível de toxicidade mas levaram a teores relativamente mais altos de nitrogênio, podendo assim, justificar a estabilização e até uma ligeira queda nos teores de fósforo na dose de 315 ppm de nitrogênio.

Para a maioria das culturas vegetais, Malavolta (2006) preconiza, teores de fósforo que variam de 1 a 5 gP.Kg^{-1} de MMS. Portanto, os teores máximos em torno de 5 gP.Kg^{-1} de MMS observados nesse trabalho, no período de maior crescimento da planta, aos 180 dias de cultivo, pode indicar que a espécie *Aloe vera* possa exigir teores mais elevados de fósforo em relação a outras espécies vegetais. Deve-se lembrar que plantas de *Aloe vera* exportam a glicose produzida pela fotossíntese sob forma de glicose-fosfato que, nos tecidos aquíferos, é convertida em polissacarídeos de manose.

Os teores de potássio na planta aumentaram dos 90 aos 180 dias e decresceram dos 180 aos 270 dias de cultivo. O aumento das doses de nitrogênio pouco interferiram no incremento de teores de potássio na planta. Os teores máximos de potássio em torno de 77 gK.Kg^{-1} de MMS

foram observados aos 180 dias de cultivo em presença de quaisquer das doses de nitrogênio. O aumento de potássio dos 90 aos 180 dias de cultivo, e seu decréscimo dos 180 aos 270 dias de cultivo, reitera que *Aloe vera* apresenta sua maior taxa metabólica em torno dos 180 dias de cultivo.

O potássio, segundo Malavolta (2006), caracteriza-se no cátion mais abundante nas plantas concentrando-se, em sua maior parte, nos vacúolos. É reconhecidamente ativador de mais de meia centena de enzimas, em cuja ação, está relacionado a mudanças de conformação e aumento da afinidade para com os seus substratos. É possível que a alta exigência de potássio pelas plantas esteja relacionada à elevadas concentrações citoplasmáticas desse elemento para garantir atividade enzimática ótima e, principalmente, devido ao seu papel nas diversas funções bioquímicas em vários processos como abertura e fechamento de estômatos, regulação osmótica e translocação de açúcares, processos estes, de vital importância em plantas como *Aloe vera*, caracteristicamente xerófita, com metabolismo ácido das crassuláceas e é grande armazenadora de polissacarídeos.

Malavolta (2006) aponta para as principais culturas brasileiras, teores de potássio que variam de 11 a 50 gK.Kg⁻¹ de MMS. Garcia-Hernandez et al. (2006), indica um teor foliar de potássio de 22,39 gK.Kg⁻¹ de MMS para uma boa produtividade de *Aloe vera* cultivada em solos calcários de regiões áridas. Portanto, os teores máximos de potássio em torno de 70 gK.Kg⁻¹ de MMS, evidenciados nas condições de cultivo deste trabalho, foram relativamente altos.

Os teores de cálcio na planta aumentaram somente dos 90 aos 180 dias de cultivo na dose de 105 ppm de nitrogênio. Dos 180 aos 270 dias de cultivo os teores de cálcio decresceram simultaneamente aos aumentos das doses de 105; 210 e 315 ppm de nitrogênio.

Os teores mais altos de cálcio na planta, entre 38,01 e 40,91 gCa.Kg⁻¹ de MMS na fase de maior crescimento, em torno dos 180 dias de cultivo, equivalem aos resultados obtidos e sugeridos por Garcia-Hernandez et al. (2006) como teores ótimos para uma boa produtividade de plantas de *Aloe vera*. Esse teor foliar ótimo sugerido foi de 45,42 gCa.Kg⁻¹ de MMS para solos calcários. Malavolta (2006) observou que para as principais culturas brasileiras, os teores foliares de cálcio dependem muito da espécie vegetal, variando desde 3 a 5 gCa.Kg⁻¹ de MMS em *Pinus* até de 21 a 50 gCa.Kg⁻¹ de MMS em milho.

Essa variação nos teores foliares de cálcio em diferentes espécies se justifica pelas próprias funções desse elemento na planta, as quais, referem-se principalmente a funções

estruturais, reguladores enzimáticos e de mensageiros secundários exercido pelas calmodulinas que são associadas ao cálcio. Estruturalmente, faz parte dos pectatos de cálcio principais formadores da lamela média com funções cimentantes entre as células.

As doses mais altas de nitrogênio, 315 ppm, levaram a teores de cálcio mais baixos em relação às doses de 105 e 210 ppm, independentemente dos tempos de 90; 180 e 270 dias de cultivo. Contudo, dos 180 aos 270 dias os decréscimos dos teores foram mais acentuados. Dos 90 aos 180 dias pode ter ocorrido maior aumento no número de células parenquimáticas do tecido aquífero (FEMENIA et al., 1999), demandando assim, formações mais intensas de lamela média e conseqüentemente, síntese de pectatos de cálcio. Os decréscimos dos teores de cálcio dos 180 aos 270 dias de cultivo pode ter sido devido ao aumento do gel de polissacarídeos que é pobre em cálcio.

Os teores de magnésio na planta decresceram ao longo dos 270 dias de cultivo independentemente do aumento nas doses de 105; 210 e 315 ppm de nitrogênio. O decréscimo nos teores de magnésio dos 90 aos 270 dias de cultivo pode ser devido à própria natureza de acúmulo e funções desse elemento nas plantas. Esse acúmulo ocorre normalmente na fase inicial de crescimento das plantas e suas funções estão diretamente ligadas à estruturação e funcionamento do aparato fotossintético, seja como integrante de moléculas como clorofilas que demandam de 5 a 10% do magnésio da planta, seja como integrante ou ativador enzimático. Quase todas as enzimas relacionadas à fotossíntese, principalmente da fase fosforilativa da via glicolítica e da cadeia respiratória, são dependentes de magnésio. Nos processos de transferência de energia, na incorporação e transferência de fósforo inorgânico, o magnésio participa na formação do complexo ADP ou ATP e das enzimas fosforilativas (MALAVOLTA 2006).

Os teores de magnésio em *Aloe vera* observados neste trabalho se comportaram proporcionalmente inversamente aos aumentos das doses de nitrogênio, principalmente durante a fase mais jovem das plantas, em torno dos 90 dias de cultivo. Os teores médios, variando de aproximadamente 14; 13 e 12 gMg.Kg⁻¹ de MMS nas respectivas doses de 105; 210 e 315 ppm de nitrogênio, aproximam-se dos teores 11,33 gMg.Kg⁻¹ de MMS, observados e sugeridos por Garcia-Hernandez et al. (2006) para uma boa produtividade de massa de matéria fresca em *Aloe vera*.

O comportamento dos teores de enxofre na planta foi semelhante ao comportamento dos teores de nitrogênio. Os teores de enxofre aumentaram e decresceram dos 90 aos 180 dias e dos

180 aos 270 dias de cultivo, respectivamente. As doses de 210 ppm favoreceram incrementos maiores nos teores de enxofre em relação às doses de 105 e 315 ppm de nitrogênio.

Esse comportamento dos teores de enxofre ao longo dos 270 dias de cultivo nas três doses testadas de nitrogênio, obedeceu a um paralelismo ao comportamento dos teores de nitrogênio e de proteínas totais solúveis (Tabela 6). Tal comportamento não poderia ser diferente já que as funções do enxofre e do nitrogênio se resumem praticamente à integração a proteínas (MALAVOLTA, 2006). Esse mesmo autor observa uma relação de 24 átomos de nitrogênio para cada átomo de enxofre para a maioria das plantas. No caso deste experimento, essa relação foi um pouco mais estreita entre o nitrogênio e o enxofre, observando-se uma média de 7:1, respectivamente. O paralelismo mais evidente foi em torno dos 180 dias de cultivo, 6N:1S, em quaisquer das doses testadas de nitrogênio.

4.4 Efeito de doses de nitrogênio e tempo de cultivo sobre os teores de micronutrientes

Foram analisados os teores de boro, cobre, ferro, manganês e zinco. Os fatores doses de nitrogênio (105; 210 e 315 ppm) e tempo de cultivo (90; 180 e 270 dias de cultivo) foram significativos ($P < 0,05$) em relação aos teores de boro, ferro e manganês. Para os teores de cobre e zinco apenas o fator tempo foi significativo ($P < 0,05$) (Anexos 13; 14; 15; 16 e 17). Os teores de cada micronutriente analisado, expressos em mg.Kg^{-1} de massa de matéria seca (MMS), em cada tempo (90; 180 e 270 dias de cultivo) e em cada dose de nitrogênio (105; 210 e 315 ppm), são mostrados na Tabela 5 e nas Figuras 19A; B; C; D e E.

Os teores de boro na planta apresentaram diferentes comportamentos ao longo dos 90; 180 e 270 dias de cultivo e em relação às crescentes doses de nitrogênio de 105; 210 e 315 ppm. Nas doses de nitrogênio de 105 e 315 ppm os teores de boro aumentaram dos 90 aos 180 dias e decresceram dos 180 aos 270 dias de cultivo. Esse comportamento, segundo Malavolta (2006), pode ser explicado não pela deficiência de nitrogênio nem por inibição na absorção e acúmulo de boro provocado por altas concentrações de nitrogênio, mas possivelmente pelo efeito diluição conseqüente do crescimento ao longo dos 270 dias de cultivo. Na dose de 210 ppm o aumento dos teores de boro foi contínuo e uniforme ao longo do período de cultivo, explicado, talvez de maneira contraditória, pelo aumento dos volumes celulares conseqüentes do armazenamento de

Tabela 5 – Teores de boro (B) cobre (Cu), ferro (Fe) manganês (Mn) e zinco (Zn) em mg.Kg^{-1} de massa de matéria seca em plantas de *Aloe vera*, cultivadas em doses de nitrogênio expressas em ppm e tempo expressos em dias de cultivo (DDC)

Doses N (ppm)	Tempo (DDC)	B	Cu	Fe	Mn	Zn
105	90	59,99	6,17	138,34	552,16	76,99
	180	78,04	8,37	146,49	592,41	103,09
	270	64,87	3,57	114,64	483,37	56,74
210	90	57,34	12,38	155,88	548,43	79,20
	180	59,87	5,92	198,01	573,61	88,97
	270	63,69	2,93	135,92	501,84	51,99
315	90	52,32	7,13	124,21	588,93	70,10
	180	70,14	6,02	118,42	518,33	87,00
	270	59,87	3,60	74,53	249,79	48,12

gel de polissacarídeos nas células parenquimáticas do tecido aquífero já que o boro é componente das paredes e membranas celulares.

Em relação aos teores de cobre na planta, apesar de aumentarem discretamente dos 90 aos 180 dias de cultivo na dose de nitrogênio de 105 ppm, a tendência geral dos teores foi decrescente ao longo do período experimental. A dose de nitrogênio de 210 ppm apresentou um comportamento de decréscimos nos teores de cobre mais uniforme em relação às doses de nitrogênio de 105 e 315 ppm. Tais decréscimos podem também, possivelmente, ser explicados pelo efeito diluição provocado pelo crescimento da planta. Contudo, os teores foliares médios de aproximadamente 6 mgCu.Kg^{-1} de MMS coincidem exatamente com os teores sugeridos por Epstein e Bloom (2004) como teor adequado para a maioria das plantas.

Os teores de ferro na planta apresentaram comportamento mais ou menos padronizado, aumentando dos 90 aos 180 dias e decrescendo dos 180 aos 270 dias de cultivo em quaisquer das doses testadas de nitrogênio. A dose de 210 ppm favoreceu teores mais altos de ferro em relação às doses de 105 e 315 ppm. Apesar da observação de teores médios de 198 mgFe.Kg^{-1} de MMS aos 180 dias de cultivo na dose de 210 ppm de nitrogênio, ainda assim, tais teores podem ser comparados àqueles sugeridos por Epstein e Bloom (2004), de 100 mgFe.Kg^{-1} de MMS, pelo fato de tais teores terem diminuído para próximo dos valores sugeridos aos 270 dias de cultivo.

Figura 19 – Efeito de doses de nitrogênio (N) em ppm e tempo em dias de cultivo sobre os teores de micronutrientes, em mg.Kg⁻¹ de massa de matéria seca em plantas de *Aloe vera*. A: Teores de boro (B); B: Teores de cobre (Cu); C: Teores de ferro (Fe); D: Teores de manganês; (Mn) e E: Teores de zinco (Zn)

Os comportamentos dos teores de manganês e de zinco foram semelhantes ao comportamento dos teores observados para o ferro, tanto ao longo dos 270 dias de cultivo como em relação às doses testadas de nitrogênio. Os teores médios observados para o manganês e para o zinco, aos 180 dias de cultivo na dose de 210 ppm de nitrogênio, foram em torno de 573 mgMn.Kg⁻¹ de MMS para o manganês e de 88 mgZn.Kg⁻¹ de MMS para o zinco. Ambos os teores se revelaram exageradamente altos em relação aos teores sugeridos por Epstein e Bloom (2004) para a maioria das plantas, equivalentes a 50 mgMn.Kg⁻¹ de MMS e 20 mgZn.Kg⁻¹ de MMS, respectivamente.

4.5 Efeito de doses de nitrogênio e tempo de cultivo sobre os teores de proteínas totais solúveis, açúcares redutores e açúcares totais solúveis

Os fatores doses de nitrogênio (105; 210 e 315 ppm) e tempo de cultivo (90; 180 e 270 dias de cultivo) foram significativos ($P < 0,05$) em relação aos teores das variáveis proteínas totais solúveis (PTS), açúcares redutores (AR) e açúcares totais solúveis (ATS) (Anexos 18; 19 e 20). Os teores de cada variável, expressos em mg.g⁻¹ de massa de matéria seca (MMS), em cada tempo de cultivo e em cada dose de nitrogênio, são mostrados na Tabela 6 e nas Figuras 20A; B e C.

Tabela 6 – Teores de proteínas totais solúveis (PTS), açúcares redutores (AR) e açúcares totais solúveis (ATS), expressos em mg.g⁻¹ de massa de matéria seca em plantas de *Aloe vera*, cultivadas em doses de nitrogênio expressas em ppm e tempos expressos em dias de cultivo (DDC)

Doses N (ppm)	Tempo (DDC)	PTS	AR	AT
105	90	2,01	11,71	152,52
	180	8,70	9,53	204,05
	270	4,91	18,12	496,58
210	90	2,27	8,48	175,77
	180	9,24	10,90	165,56
	270	7,27	18,42	504,21
315	90	3,64	7,45	48,07
	180	11,72	11,58	315,64
	270	9,07	21,19	486,00

$$\hat{Y} = -13,6787 - 0,0138(N) + 0,2339(T) + 0,00004(N^2) + 0,00007(N*T) -$$

$$R^2 = 0,8881$$

$$\hat{Y} = 24,1135 - 0,0589(N) - 0,1429(T) + 0,00006(N^2) + 0,0002(N*T) + 0,0004(T^2)$$

$$R^2 = 0,8411$$

$$\hat{Y} = 288,2655 - 0,5272(N) - 2,1145(T) + 0,0002(N^2) + 0,0025(N*T) + 0,0101(T^2)$$

$$R^2 = 0,8228$$

Figura 20 – Efeito de doses de nitrogênio (N) em ppm e tempo em dias de cultivo sobre as variáveis: A: Teores de proteínas totais solúveis (PTS); B: Teores de açúcares redutores (AR) e C: Açúcares totais solúveis (ATS), expressos em mg.g^{-1} de massa de matéria seca (MMS), em plantas de *Aloe vera*

Os teores de proteínas totais solúveis (PTS) apresentaram comportamento bastante semelhante ao comportamento dos teores de nitrogênio e de enxofre na planta. Essa observação não poderia ser diferente visto que o enxofre e principalmente o nitrogênio, são componentes estruturais de todas as proteínas que, por sua vez são caracterizados pela presença de nitrogênio do grupo amino dos aminoácidos. Outro fato interessante refere-se ao acentuado aumento dos teores de PTS dos 90 aos 180 dias, seguido de discretos decréscimos dos 180 aos 270 dias de cultivo, em quaisquer das doses testadas de nitrogênio. Esse comportamento pode ser justificado pelo acentuado aumento de açúcares, tanto redutores e principalmente açúcares totais, observados dos 180 aos 270 dias de cultivo, também em quaisquer das doses testadas de nitrogênio.

Fisiologicamente, a fase de crescimento das plantas de *Aloe vera*, observada dos 90 aos 180 dias de cultivo representa a formação e estruturação do aparato metabólico para síntese de seus compostos de reserva a base de polissacarídeos. Essa fase inicial de crescimento, é marcada por acentuada assimilação de nitrogênio e conseqüente síntese de aminoácidos e proteínas, bases nitrogenadas e ácidos nucléicos, enzimas, coenzimas, vitaminas, glicoproteínas, pigmentos e produtos secundários (MALAVOLTA 2006). A síntese mais acentuada de proteínas nesse período se deve principalmente àquelas envolvidas na fixação de carbonos pela fotossíntese. Essas proteínas, no caso da *Aloe vera*, referem-se às enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase e ribulose 1,6-ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase, caracterizadas como as mais abundantes nas folhas.

Os teores de PTS aumentaram dos 90 aos 180 dias e decresceram dos 180 aos 270 dias de cultivo. As doses crescentes de nitrogênio (105; 210 e 315 ppm) favoreceram aumentos discretos nos teores de PTS à medida que as doses foram aumentadas.

Os discretos decréscimos nos teores de PTS observados dos 180 aos 270 dias de cultivo em quaisquer das doses testadas de nitrogênio, já discutidos anteriormente, possivelmente não sejam conseqüentes de decréscimos na síntese de proteínas e sim, ao acentuado aumento nos teores de polissacarídeos, característicos dessa espécie e pobres em proteínas, que acabaram causando um efeito de diluição dos teores protéicos (LEUNG et al., 2004).

O teor médio de PTS, aos 180 dias de cultivo na dose de 210 ppm de nitrogênio, foi de 9,24 mgPTS.g⁻¹ de MMS.

Em relação aos açúcares, os teores de açúcares redutores (AR) e açúcares totais solúveis (ATS) apresentaram aumentos mais discretos dos 90 aos 180 dias e incrementos bastante

acentuados dos 180 aos 270 dias de cultivo. O aumento das doses de nitrogênio exerceram aumentos nos teores de AR e praticamente não interferiram nos teores de ATS.

O raciocínio estabelecido, relacionando teores de proteínas e estádios fisiológicos de crescimento ao longo dos 270 dias de cultivo, auxilia entender o comportamento dos teores de AR e ATS que aumentaram mais acentuadamente dos 180 aos 270 dias de cultivo. Considerando que o gênero *Aloe* é grande armazenador de polissacarídeos específicos em células parenquimáticas especializadas, que formam um tecido aquífero não fotossintetizante com funções de armazenamento de reservas, que a formação de polissacarídeos depende da síntese e exportação cloroplastidial de açúcares monoméricos para serem polimerizados no tecido aquífero e que, a maior síntese e acúmulo de polissacarídeos ocorre mais acentuadamente em torno dos 270 dias de cultivo, é natural que tanto os teores de AR como ATS aumentem também nesse período. Essas características de armazenamento de polissacarídeos específicos do gênero *Aloe* são bem conhecidas e muito bem caracterizadas (FEMENIA et al., 1999; JING-YUAN et al., 2003; NI et al., 2004 e TALMADGE et al., 2004).

Os teores máximos de AR e ATS aos 270 dias de cultivo, na dose de 210 ppm de nitrogênio, foram de 18 mgAR.g⁻¹ de MMS para AR e de 504 mgATS.g⁻¹ de MMS para ATS.

Esses teores máximos de açúcares observados aos 270 dias de cultivo poderiam continuar aumentando com o tempo de cultivo mais prolongado, entretanto, cabe observar que logo depois desse período as plantas entram na fase reprodutiva que consumiria parte dessa reserva. Para ratificar essa premissa seriam necessárias avaliações no período posterior ao florescimento, o qual não foi possível realizar no presente trabalho.

4.6 Efeito das doses de nitrogênio e tempo de cultivo sobre o crescimento das plantas

Os fatores doses de nitrogênio (105; 210 e 315 ppm) e tempo (90; 180 e 270 dias de cultivo) foram significativos ($P < 0,05$) para as variáveis índice de área foliar (IAF), taxa de crescimento relativo (TCR) expresso em gMMS.g⁻¹.dia⁻¹, incremento de massa de matéria fresca (IMMF) em gramas, e para o incremento de massa de matéria seca (IMMS) em gramas. Para a variável taxa de assimilação líquida (TAL) expressa em mgMMS.cm⁻².dia⁻¹, apenas o fator tempo foi significativo ($P < 0,05$) e para a taxa de crescimento absoluto (TCA), expresso em gMMS.dia⁻¹, ambos os fatores não foram significativos ($P > 0,05$) (Anexos 21; 22; 23; 24; 25; e 26). Os valores

médios de cada variável em cada dose de nitrogênio e em cada tempo de cultivo são mostrados na tabela 7 e nas Figuras 21A; B; C; D; E e F.

Tabela 7 – Índice de área foliar (IAF); Taxa de assimilação líquida (TAL); Taxa de crescimento relativo (TCR); Taxa de crescimento absoluto (TCA); Incremento de massa de matéria fresca (IMMF) e Incremento de massa de matéria seca (IMMS) em *Aloe vera*, cultivadas em doses de nitrogênio expressas em ppm e tempos expressos em dias de cultivo (DDC)

Doses N (ppm)	Tempo (DDC)	IAF	TAL	TCR	TCA	IMMF	IMMS
105	90	0,61	0,39	0,02	0,08	266,86	8,16
	180	1,60	0,17	0,01	0,12	1036,26	19,11
	270	3,51	0,38	0,02	0,63	2610,11	76,12
210	90	0,60	0,40	0,02	0,08	262,88	8,27
	180	1,79	0,13	0,01	0,10	1094,08	17,29
	270	3,48	0,35	0,02	0,61	2402,60	71,74
315	90	0,63	0,42	0,02	0,08	257,60	8,70
	180	1,44	0,20	0,01	0,13	828,58	20,70
	270	3,04	0,30	0,01	0,44	1981,91	60,49

Conceitualmente, segundo Benicasa (2003), o índice de área foliar (IAF) é a relação entre área foliar total e a área de solo sombreada pelas folhas e conseqüentemente, um índice adimensional. Segundo o autor, o aumento do IAF deve ocorrer mais acentuadamente na fase inicial do crescimento até atingir um valor de IAF ótimo que a partir do qual, passa a ser prejudicado pelo auto-sombreamento, diminuindo a evapotranspiração e a eficiência fotossintética. O IAF ótimo é portanto, aquele que permite o máximo de fotossíntese e conseqüentemente, taxa de crescimento relativo (TCR) elevada.

No caso específico deste trabalho, as plantas de *Aloe vera* mostraram um aumento de IAF contínuo ao longo dos 270 dias de cultivo, um aumento médio em torno de 100% a cada 90 dias. As doses de 105 e 210 ppm mostraram-se mais efetivas no aumento do IAF em relação às doses de 315 ppm de nitrogênio.

A

$$\hat{Y} = -0,4462 + 0,0072(N) + 0,0016(T) - 0,00001(N^2) - 0,00001(N*T) + 0,00004(T^2)$$

$$R^2 = 0,9707$$

$$\hat{Y} = 1,0113 - 0,00009(N) - 0,0089(T) + 0,000001(N^2) - 0,000003(N*T) + 0,00002(T^2)$$

$$R^2 = 0,8182$$

$$\hat{Y} = 0,0351 + 0,00009(N) - 0,0003(T) - 0,0000001(N^2) - 0,0000002(N*T) + 0,0000009(T^2)$$

$$R^2 = 0,6676$$

$$\hat{Y} = 0,0911 - 0,0111(N) + 0,0178(T) + 0,00002(N^2) - 0,000005(N*T) - 0,00004(T^2)$$

$$R^2 = 0,0961$$

$$\hat{Y} = -476,0547 + 5,0205(N) + 1,1252(T) - 0,0081(N^2) - 0,0163(N*T) + 0,0383(T^2)$$

$$R^2 = 0,9623$$

$$\hat{Y} = 25,0840 + 0,0639(N) - 0,4544(T) - 0,00002(N^2) - 0,0004(N*T) + 0,0024(T^2)$$

$$R^2 = 0,9749$$

Figura 21 – Efeito de doses de nitrogênio (N) em ppm e tempo em dias de cultivo sobre o crescimento de plantas de *Aloe vera*. A: Índice de área foliar (IAF); B: Taxa de assimilação líquida (TAL) em $\text{mgMMS} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dia}^{-1}$; C: Taxa de crescimento relativo (TCR) em $\text{gMMS} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$; D: Taxa de crescimento absoluto (TCA) em $\text{gMMS} \cdot \text{dia}^{-1}$; E: Incremento de massa de matéria fresca (IMMF) em gramas e F: Incremento de massa de matéria seca (IMMS) em gramas

Correlacionando o IAF e a TCR pode-se inferir que o IAF ótimo pode ter ocorrido antes dos 90 dias de cultivo pelo fato da TCR e da taxa de assimilação líquida (TAL) decrescerem a partir desse tempo de cultivo.

A taxa de assimilação líquida (TAL), expressa em $\text{mgMMS.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$, nas condições de experimentação, decresceu e aumentou acentuadamente dos 90 aos 180 dias e dos 180 aos 270 dias de cultivo, respectivamente. O aumento das doses de nitrogênio de 105; 210 e 315 ppm não interferiu sobre a TAL.

Considerando que a TAL expressa a matéria seca produzida por unidade de área e unidade de tempo (BENICASA, 2003), o fato dos resultados mostrarem que a maior taxa de assimilação líquida ocorreu antes dos 90 dias, voltando a aumentar depois dos 180 dias e, possivelmente, continuaria aumentando depois dos 270 dias de cultivo, talvez seja uma característica particular de crescimento, em termos de produtividade de reservas de polissacarídeos específicos em *Aloe vera*.

O comportamento da taxa de crescimento relativo (TCR) foi bastante semelhante ao IAF. A TCR decresceu e aumentou acentuadamente dos 90 aos 180 dias e dos 180 aos 270 dias de cultivo, respectivamente. O aumento da TCR dos 180 aos 270 dias de cultivo foi menos acentuado em relação ao IAF. Da mesma forma que no IAF, o aumento das doses de nitrogênio de 105; 210 e 315 ppm pouco interferiu na TCR.

Esse comportamento não poderia ser diferente visto que a TCR oscila ao longo de um ciclo de crescimento. Segundo Benicasa (2006), essas oscilações ocorrem porque a TCR depende de outros parâmetros de crescimento, da razão de área foliar (RAF) e da TAL. Como a RAF não foi analisada neste trabalho, o comportamento da TCR, como verificado, foi semelhante a TAL.

A taxa de crescimento absoluto (TCA) que mede a velocidade de crescimento por meio do incremento de massa de matéria fresca em função do tempo, aumentou discretamente dos 90 aos 180 dias e mais acentuadamente dos 180 aos 270 dias de cultivo. As velocidades médias de crescimento foram diferentes para cada período de cultivo e para cada dose de nitrogênio testada. Na dose de 105 ppm de nitrogênio, a velocidade média de crescimento foi de $0,04 \text{ gMMS.dia}^{-1}$ dos 90 aos 180 dias e de $0,51 \text{ gMMS.dia}^{-1}$ dos 180 aos 270 dias de cultivo. Na dose de 210 ppm foi de $0,02 \text{ gMMS.dia}^{-1}$ dos 90 aos 180 dias e de $0,51 \text{ gMMS.dia}^{-1}$ dos 180 aos 270 dias e, na dose de 315 ppm, a velocidade média de crescimento foi de $0,05 \text{ gMMS.dia}^{-1}$ dos 90 aos 180 dias e de $0,31 \text{ gMMS.dia}^{-1}$ dos 180 aos 270 dias de cultivo.

Portanto, as doses de 105 e 210 ppm de nitrogênio apresentaram maiores efeitos na velocidade de crescimento quando comparadas as doses de 315ppm. Esse comportamento da TCA correlacionou-se de maneira inversa ao comportamento dos teores de PTS que aumentaram dos 90 aos 180 dias e decresceram dos 180 aos 270 dias de cultivo. Esses comportamentos podem ser justificados pela maior alocação de proteínas ao incremento de massa de matéria seca. Por outro lado, evidencia-se que a velocidade de incremento de massa de matéria seca em *Aloe vera* é relativamente baixa se comparada a outras culturas como observado por Benicasa (2003) em sorgo granífero, cultivados sob alta e baixa luminosidade, apresentando velocidades de 1,02 e 0,34 gMMS.dia⁻¹, respectivamente.

Os resultados observados para os comportamentos do IAF, da TCA e dos teores de PTS, são claramente ratificados pela evolução do IMMF e o IMMS que aumentaram continuamente ao longo dos 270 dias de cultivo e, semelhantemente a TCA, as doses de nitrogênio de 105 e 210 ppm foram mais efetivas sobre as duas variáveis do que a dose de 315 ppm.

5 CONCLUSÕES

A eficiência na desinfestação de ápices caulinares de filhotes de *Aloe vera* coletados a campo foi aumentada por meio de imersões alternadas em hipoclorito de sódio e dicloroisocianurato de sódio. Os melhores resultados foram observados quando os filhotes foram previamente desinfestados por lavagem com quaisquer dos dois produtos utilizados.

O rendimento de multiplicação de brotos de 1:5,3 a cada intervalo de 30 dias de cultivo foi obtido utilizando-se o meio de cultura basal de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 2 mg.L⁻¹ de 6-BAP.

No final da fase de multiplicação, a ausência de 6-BAP no meio MS mostrou-se altamente eficiente para o alongamento e enraizamento dos brotos *in vitro*. Ao final de cinco meses de cultivo, a partir de 136 ápices caulinares, foram obtidas 40.495 microplantas

Bandejas de 64 células com 40 cm³ de substrato, em casa-de-vegetação com microaspersão e sistema de refrigeração tipo “pad-house”, mostraram economia em torno de 50% na quantidade de substrato e em espaço físico na casa-de-vegetação, durante o processo de aclimação e no transporte das microplantas aclimatadas.

No desenvolvimento das plantas de *Aloe vera* em casa de vegetação, os teores mais elevados de nitrogênio foram observados em presença de 315 ppm de nitrogênio, aos 270 dias de cultivo. A dose de 105 ppm de nitrogênio favoreceu teores mais altos de potássio, cálcio, e enxofre aos 180 dias de cultivo. Os teores mais altos de fósforo e de magnésio foram observados em presença de 210 ppm de nitrogênio, aos 180 dias para o fósforo que se manteve elevado até o final do experimento e, para o magnésio, aos 90 dias de cultivo.

Em relação aos micronutrientes avaliados, a dose de 105 ppm de nitrogênio favoreceu teores mais elevados de boro, manganês e zinco aos 180 dias de cultivo. Os teores mais altos de cobre e ferro foram observados em presença de 210 ppm de nitrogênio, aos 90 dias para o cobre e aos 180 dias para o ferro.

Os teores mais elevados de proteínas totais solúveis (PTS) e açúcares redutores (AR) foram observados em presença de 315 ppm de nitrogênio, aos 180 dias para PTS e aos 270 dias para AR. A dose de 210 ppm de nitrogênio favoreceu teores mais elevados de açúcares totais solúveis aos 270 dias de cultivo.

O índice de área foliar (IAF), a taxa de crescimento absoluto (TCA), os incrementos de massas de matérias fresca (IMMF) e seca (IMMS), pela própria natureza dessas variáveis, aumentaram ao longo do período experimental e apresentaram valores mais altos aos 270 dias de cultivo em presença das doses de 105 ou 210 ppm de nitrogênio cujas diferenças não foram significativas para essas variáveis.

A taxa de assimilação líquida (TAL) e a taxa de crescimento relativo (TCR) apresentaram comportamentos peculiares. A TAL apresentou valores mais elevados até os 90 dias de cultivo e os valores da TCR oscilaram ao longo do período experimental. As doses crescentes de nitrogênio também não apresentaram diferenças significativas sobre essas variáveis.

Apesar de algumas variáveis responderem melhor à dose de 315 ppm e outras à dose de 105 ppm, a dose de 210 ppm de nitrogênio favoreceu as melhores respostas para os teores de açúcares totais solúveis (504,21 mgATS.g⁻¹ de MMS), que são diretamente relacionados ao conteúdo de polissacarídeos de interesse comercial da cultura de *Aloe vera*. Esses teores, por sua vez, foram propiciados pelos melhores valores de IAF, TCA, IMMF e IMMS, todos observados aos 270 dias de cultivo, ratificando a significância do fator tempo e da dose de 210 ppm de nitrogênio no cultivo dessa espécie vegetal.

REFERÊNCIAS

ABURJAI, T.; NATSHEH, F. M. Plants Used in Cosmetics. **Phytotherapy Research**, London, v. 17, p. 987-1000, 2003.

ARAÚJO, P. S.; SILVA, J. M. O. D.; NECKEL, C. A.; IANSSEN, C.; OLTRAMARI, A. C.; PASSOS, R.; TIEPO, E.; BACH, D. B.; MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* - *Liliaceae*). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, – n. 25, p. 54-57 2002.

AZGHANI, A. O.; WILLIAMS, I.; HOLIDAY, D. B.; JOHNSON, A. R. A beta-linked mannan inhibits adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human lung epithelial cells. **Glycobiology**, Oxford, v. 5, p. 39-44, 1995.

BENINCASA, M. M. P. **Ánalyse de Crescimento de Plantas (Noções Básicas)**. 2. ed., Jaboticabal: Funep, 2003. 41 p.

BLACKMAN, V.H. The compound interest law and plant growth. **Annals of Botany**, London v.33, p.353-360, 1919.

BLACKMAN, G. E.; WILSON, G. L. Physiological and Ecological studies en the Analysis of Plant Environmete. **Annals of Botany**, London , v. 15, n. 59, p.374-408, 1951.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the priciple of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1956.

CASTRO, P. R. C. Análise de crescimento do amendoineiro (*Arachis hypogaea* L.) **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 31, p. 207-215, 1974

CORRÊA, M. P. Babosa. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional 1984. v.1, 747 p.

CROCOMO, O. J.; OLIVEIRA, E. T. Biotecnologia de plantas como um programa de produção vegetal. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica: Produção Industrial de Plantas “in Vitro”** Araras:Universidade Federal de São Carlos, 1995. p 18-21.

CRONAUER, S. S.; KRIKORIAN, A. D. Multiplication of *Musa* from excised stem tips. **Annals of Botany**, London. v.53: p. 321 – 328. . 1984.

DAVIES, O.L.; KU, J.Y. A re-examination of the fitting of the Richards growth function. **Biometrics**, Washington v.33, p.546-547, 1977.

DEBERGH, P.; MAENE, L. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia horticultrae**, Amsterdam, v. 14. p. 335-345. 1981.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, New York, v. 28, p. 350-356, 1956.

EGGER, S.; BROWN, G. S.; KELSEY, L. S.; YATES, K. M.; ROSENBERG, L. J.; TALMADGE, J. E. Studies on optimal dose and administration schedule of a hematopoietic stimulatory β -(1,4)-linked mannan. **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v. 18, p. 113-126, 1996a.

EPSTEIN, E.; BLOMM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina: Planta, 2004. 85 p.

EVANS, G.C. **The Quantitative Analysis of Plant Growth**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. 607p.

FEMENIA, A.; SÁNCHEZ, E. S.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Compositional features of polysaccharides from Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 39, n. 2, p. 109-117, 1999.

FUENTES-CARVAJAL, A.; VÉLIZ, J. A.; BUIZA, J. I. Efecto la deficiencia de macronutrientes em el desarrollo vegetativo de *aloe vera*. **Interciência**. Caracas, v. 31 n. 2, p. 116-122, 2006.

FOGLEMEN, R. W.; SHELLENBERGER, T. E.; BALMER, M. F.; CARPENTER, R. H.; McANALLEY, B. H. Subchronic oral administration of acemannan in the rat and dog. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 34, p. 144-147, 1992a.

FOGLEMEN, R. W.; CHAPDELAINE, J. M.; CARPENTER, R. H.; McANALLEY, B. H. Toxicologic evaluation of injectable acemannan in the mouse, rat and dog. **Veterinary and Human Toxicology**. Manhattan, v. 34, p. 201-205, 1992b.

GARCIA-HERNÁNDEZ, J. L.; VALDEZ-CEPADA, R. D.; MURILLO-AMADOR, B.; BELTRÁN-MORALES, F. A.; RUIZ-ESPINOZA, F. H.; ORONA-CASTILHO, I.; FLORES-HERNÁNDEZ, A.; TROYO-DIÉGUEZ, E. Preliminary compositional nutrient diagnosis norms in Aloe vera L. grow on calcareous soil in na arid environment. **Environmental and Experimental botany**. Elmsford, v.58, p. 244 – 252, 2006.

GERALD, L. T. S.; PICOLLO, L. T.; MENEGHIN, S. P.; ARAUJO, S. M. S. S. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica: Produção Industrial de Plantas “in Vitro”**. Araras: Universidade Federal de São Carlos, 1995. p 9-17.

GOWDA, D. C.; NEELISIDDAIAH, B.; ANJANEYALU, Y. V. Structural studies of polysaccharides from *Aloe vera*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 72, p. 201-205, 1979.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMPRAPA CNPH, 1990. Parte II, p. 99 – 169.

GREEN, P. Aloe vera extracts in equine clinical practice. **Veterinary Times**, Peterborough, v. 26, p. 16-18, 1996.

GRINDLAY, D.; REYNOLDS, T. The *Aloe vera* Phenomenon: A review of properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 16, p. 117-151, 1986.

GROUT, B. W.; ASTON, M. J. Transplantig of cauliflower plants regenerate from meristem culture. I. Water loss and water tranfer related to changes in leaf wall and to xylem regeneration. **Horticultural Reviews**, New York, 17: 1-7, 1977.

HAMILL, S. D.; SHARROCK, S. L; SMITH. Comparison of decontamination methods used in initiation of banaa issue cultures from field-collected suckers. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, v. 33: p. 343 – 346, 1993.

HARDING, T. B. Aloes of the world: A checklist, index and code. **Excelsa**, Causeway, v. 9, p. 57-94, 1979.

HARRIS, C.; PIERCE, K.; KING, G.; YATES, K. M.; HALL, J.; TIZZARD, I. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. **Molecular Biotherapy**, Pittsburg, v. 3, p. 207-213, 1991.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, H. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. California Experimental Agriculture Station.. Berkeley: 32p, 1950. (Circular. 347).

HUGHES, A.P.; FREEMAN, P.R. Growth analysis using frequent small harvests. **Journal of Applied Ecology**. Oxford, v.4, p.553-560, 1967.

HUNT, R. **Basic growth analysis**. London: Unwin Hyman, 1990. 112p.

HUNT, R. Plant growth analysis. The rationale behind the use of the fitted mathematical functions. **Annals of Botany**, London, v.43, p.245-249, 1979.

JAMIESON, G. I. Aloe vera (*Aloe barbadensis* Mill.). **Queensland Agricultural Journal**, Brisbane, p. 220-224, 1984.

JING-YUAN, L.; WANG, T. X.; SHIEN, Z. G.; HU, Z. H. Relationship between leaf structure and aloin content in six species of *Aloe vera* L. **Acta Botanica Sinica**, Peiping, v. 45 n. 5, p. 594-600, 2003.

KAHLON, J.; KEMP, M. C. X.; CARPENTER, R. H.; McANALLEY, B. H.; McDANIEL, H. R.; SHANNON, W. M. Inhibition of AIDS virus replication by Acemannan in vitro. **Molecular Biotherapy**, Pittsburg, v. 3, p. 127-135, 1991a.

KAHLON, J.; KEMP, M. C. X.; YAWEL, N.; CARPENTER, R. H.; SHANNON, W. M.; McANALLEY, B. H. In vitro evaluation of the synergistic antiviral effects of acemannan in combination with azidothymidine and acyclovir. **Molecular Biotherapy**, Pittsburg, v.3, p. 214-223, 1991b.

KEMP, M. C.; KAHLON, J. B.; CHINNAH, A. D.; CARPENTER, R. H.; McANALLEY, B. H.; McDANIEL, H. R.; SHANNON, W. M. *In vitro* evaluation of the antiviral effects of acemannan on the replication and pathogenesis of HIV-1 and other enveloped viruses: modification of the processing of glycoprotein precursors. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 13, p83, 1990.

KODYM, A. The main chemical components contained in fresh leaves and in a dry extract from three years old *Aloe arborescens* Mill. Grown in hothouses. **Pharmazie**, Stuttgart, v. 46, p. 217-219, 1991.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K. P. Chemical and biological characterization of a polysaccharide response modifier from *Aloe vera* L. Var. *Chinensis* (Haw) Berg. **Glycobiology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 501-510, 2004.

LIAO, Z.; CHEN, M.; TAN, F.; SUN, X.; TANG, K. Micropropagation of endangered Chinese aloe. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 76, p. 83-86, 2004.

LUND, D. G.; PETRINI, L. A.; ALEIXO, J. A. G.; ROMBALDI, C. V. Uso de sanitizantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada. **Ciência Rural**, Santa Maria v. 35 n. 6, p. 1431-1435, 2005

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 631p.

MANDAL, G.; DAS, A. Structure of the D-Galactan isolated from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 86, p. 247-257, 1980a.

MANDAL, G.; DAS, A. Structure of the glucomannan isolated from the leaves of *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 87, p. 249-256, 1980b.

MANDAL, G.; GHOSH, R.; DAS, A. Characterization of polysaccharides of *Aloe barbadensis* Miller: Part III-Structure of an acidic oligosaccharide. **Indian Journal of Chemistry**, New Delhi, v. 22B, p. 890-893, 1983.

MAPP, R. K.; MCCARTHY, T. J. The Assessment of Purgative Principles in Aloes. **Planta Medica**, New York, v. 18, p. 361-365, 1970.

MARFORI, E. C.; MALASA A.B. Tissue Culture for Rapid Clonal Propagation of *Aloe barbadensis* Miller. **Philippine Agricultural Scientist**, Laguna, v. 88, n. 1, p. 167-170, 2005.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1990. 674 p.

MARSHALL, G. D.; DRUCK, J. P. *In vitro* stimulation of N K activity by acemannan. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 150, p.241A, 1993.

McDANIEL, H. R. A clinical pilot study using Carnyn (*Aloe vera* concetrate) treatment of AIDS patients. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 88, p. 68, 1987.

McDANIEL, H. R.; McANALLEY, B. H. Evaluation of poymannoacetate (Carrisyn) in the treatment of AIDS. **Clinical Research**, Thorofare, v. 35, p. 483A, 1987.

MORTON, J. F. Folk Uses and Commercial Exploitation of Aloe Leaf Pulp. **Economic Botany**, Bronx, v.15, p. 311-319, 1961.

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

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somohgy method for etermination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 153, p. 375 – 380, 1944

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K. M.; TIZARD, I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. Leaf pulp. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 4, n.14, p. 1745-1755, 2004.

- NOVAK, F. J.; AFZA, R.; PHADVIBULYA, V.; HERMELIN, T.; BUNNER, H.; DONINI, M. B. micropropagation and radiation sensitivity in shoot tip cultures of banana and plantain In: Nuclear techniques and *In Vitro* culture for plant improvement. **International Atomic Energy Agency**, Vienna, p. 167 – 174. 1986.
- OKAMURA, N.; ASAI, M.; HINE, N.; YAGI, A. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in *Aloe* species. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.746, p. 225-231, 1996.
- OKAMURA, N.; HINE, N.; HARADA, S.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K.; YAGI, A. Three chromone components from *Aloe vera* leaves. **Phytochemistry**, New York, v. 43, n.2, p.495-498, 1996.
- PAEZ, A.; GEBRE, G. M.; GONZALEZ, M. E.; TSCHAPLINSKI, T. J. Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to three irradiance levels. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 44, p. 133-139, 2000.
- PARK, M. K.; PARK, J. H.; KIM, N. Y.; SHIN, Y. G.; CHOI, Y. S.; LEE, J. G.; KIM, K. H.; LEE, S. K. Analysis of 13 Phenolic Compounds in *Aloe* species by High Performance Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 9, p.186-191, 1998.
- PEREIRA, C. R. Análise do crescimento e desenvolvimento da cultura soja sob diferentes condições ambientais. 2002. 436 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – UFV, Viçosa, 2002.
- PLEMONS, J. N.; REES, T. D.; BINNIE, W. H.; WRIGHT, J. M.; GUO, I.; HALL, J. E. Evaluation of acemannan in the treatment of recurrent aphthous stomatitis. **Wounds**, Hanover, v. 6, p. 40-45, 1994.
- RADFORD, P.J. Growth analysis formulae. Their use and abuse. **Crop Science**, Madison, v.7, p.171-175, 1967.
- REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. Aloe vera leaf gel: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 68, p. 3-37, 1999.
- RICHARDS, F.J. A flexible growth function for empirical use. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v.10, p.290-300, 1959.
- ROBERTS, D. B.; TRAVIS, E. L. Acemannan containing wound dressing gel reduces radiation induced skin reactions in C3H mice. **International journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, New York, v. 32, p. 1047-1052, 1995.

ROY, S. C.; SARKAR, A. In vitro regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 47, p. 107-113, 1991.

SAITO, H. Purification of active substances of *Aloe arborescens* Miller. And their biological and pharmacological activity. **Phytotherapy Research**, London, v. 7, p. S14-S19, 1993.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56 p.

SAS Institute Inc. SAS/STAT. **User's guide**, version 8.0. Cary: SAS Institute, 2000.

SCHAIK, A. H.; STRUIK, P. C.; DAMIAN, T. G. Effects of irrigation and N on the vegetative growth of *Aloe barbadensis* Mill. in Aruba. **Tropical Agriculture**. Trinidad, v. 74, n. 2 p. 104-109, 1997.

SCHEFFER, V. S. **Influência da natureza do substrato na fisiologia de plantas de morango (*Fragaria x ananassa*, Duch) micropropagadas, na fase de adaptação pré-campo**. 1993. 130 p. Dissertação (M. S.em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

SHAO, J.; ZHENG, Q. S.; LIU, Z. P.; NING, J. F. Effects of phosphorus application on ion distribution in aloe seedlings under seawater stress. **Acta Ecologica Sinica**. Beijing, v. 25, p. 3167-3171, 2005.

SOUZA, V.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005, p. 640.

SUZUKI, I.; SAITO, H.; INOUE, S. A study of cell agglutination and cap formation on various cells of *Alotia*. **Cell Structure and Function**, Okayama, v. 3, p. 163-171, 1979.

TALMADGE, J.; CHAVEZ, J.; JACOBS, L.; MUNGER, C.; CHINNAH, T.; CHOW, J. T.; WILLIAMSON, D.; YATES, K. Fractionation of *Aloe vera* L. Inner gel, purification and molecular profiling of activity. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 4, n.14, p. 1757-1773, 2004.

TIZARD, I.; BUSBEE, D.; MAXWELL, B.; KEMP, M. C. Effects of Acemannan, a complex carbohydrate, on wound healing in young and aged rats. **Wounds**, Hanover, v. 6, p. 201-209, 1994.

TIZARD, I.; CARPENTER, R. H.; KEMP, M. Immunoregulatory effects of a cytokine release enhancer (Acemannan). **International Congress of Phytotherapy**, Seoul, v. p. 68, 1991.

VITTI, G. C. **Avaliação e interpretação do enxofre no solo e na planta**. Jaboticabal: Funep, 1988. 37p.

VERNON, A.J.; ALLISON, J.C.S. A method of calculating net assimilation rate. **Nature**. London, v.200, p.814-819, 1963.

WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K.C. In Vitro Acclimation of Aseptically Cultured Plantlets to Humidity. **Journal of the american Society for Horticultural Science**. St. Joseph, v.108, n. 3,; p 386 – 389. 1983.

WATSON, D. J. Comparative Physiological studies on the Growth of Field Crops. **Annals of Botany**, London. v. 11, n. 41, p 41-76, 1947.

WINTERS, W. D. Immunoreactive lectins in leaf gel from *Aloe barbadensis* Miller. **Phytotherapy Research**, London, v. 7, p.S23-S25, 1993.

WINTERS, W. D.; YANG, P. B. Polypeptides of the three major medicinal aloes. **Phytotherapy Research**, London, v. 10, p. 573-576, 1996.

WONG, W. C. In vitro propagation of banana (*Musa* spp.) initiation, proliferation and development of shoot tip cultures on defined media. **Plant Cell Tissue and. Organ Culture**. Dordrecht, v. 6, p. 159 – 166. 1986

YAGI, A.; MAKINO, K.; NISHIOKA, I.; KUCHINO, Y. Aloe manann, polisaccharide from *Aloe arborescens* var. *natalensis*. **Planta Medica**, New York, v. 31, p. 17-20, 1977.

YAGI, A.; NISHIMURA, H.; SHIDA, T.; NISHIOKA, I. Structure determination of polysaccharides in *Aloe arborescens* var. *natalensis*. **Planta Medica**, New York, v. 52, p. 213-217, 1986.

ZONTA, F.; BAGONI, P.; MASOTTI, P.; MICALI, G. High-performance liquid chromatographic profiles of aloe constituents and determination of aloin in beverages, with reference to the EEC regulation for flavouring substances. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 718, p. 99-106, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1 – Análise de variância do porcentual de explantes contaminados de *A. vera* submetidos a três tratamentos de desinfestação

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M	F
Bloco	3	14,9740	4,9913	
Tratamento	2	944,5312	472,2656	34,764*
Resíduo	6	81,5104	13,5851	
Total	11			

CV = 18,145; * Significativo a 5% de probabilidade.

ANEXO 2 – Análise de variância do porcentual de explantes necrosados de *A. vera* submetidos a três tratamentos de desinfestação

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M	F
Bloco	3	74,3490	24,7830	
Tratamento	2	54,9480	27,4740	0,659*
Resíduo	6	250,2604	41,7101	
Total	11			

CV = 12,58; * Significativo a 5% de probabilidade.

ANEXO 3 – Análise de variância do porcentual de explantes verdes em início de brotação (VIB) de *A. vera* submetidos a três tratamentos de desinfestação

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M	F
Bloco	3	52,0833	17,3611	
Tratamento	2	716,6667	358,3333	32,250*
Resíduo	6	66,6667	11,1111	
Total	11			

CV = 11,76; * Significativo a 5% de probabilidade.

ANEXO 4 - Análise de variância do porcentual de sobrevivência em diferentes condições de aclimação de microplantas de *Aloe vera*. M: tamanho de microplantas, CV: tipos de casa-de-vegetação, BD: tipos de bandejas

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M	F
Blocos	9	384,2634	42,6959	
M	2	3150,1495	1575,0747	37,20*
CV	1	99,9188	99,9187	2,36 ^{ns}
BD	1	0,0182	0,0182	0,00 ^{ns}
M*CV	2	106,9930	53,4965	1,26 ^{ns}
M*BD	2	47,5585	23,7792	0,56 ^{ns}
CV*BD	1	0,3121	0,3121	0,01 ^{ns}
M*CV*BD	2	196,6982	98,3491	2,32 ^{ns}
Resíduo	99	4191,2634	42,3362	
Total	119	8177,1966		

CV = 7,11; * Significativo a 1% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 5 - Análise de variância do porcentual de IMMF em diferentes condições de aclimação de microplantas de *Aloe vera*. M: tamanho de microplantas, CV: tipos de casa-de-vegetação, BD: tipos de bandejas

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M	F
Blocos	9	113,7121	12,6346	
M	2	4586,4697	2293,2348	126,72*
CV	1	293,0000	293,0000	16,19*
BD	1	621,1205	621,1205	34,32*
M*CV	2	148,5463	74,2732	4,10*
M*BD	2	167,2782	83,6391	4,62*
CV*BD	1	46,9876	46,9876	2,60 ^{ns}
M*CV*BD	2	173,2489	86,6245	4,79*
Resíduo	99	1791,6048	18,0970	
Total	119	7941,9682		

CV = 28,23; * Significativo a 1% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 6 - Análise de variância do porcentual de IMMS em diferentes condições de aclimação de microplantas de *Aloe vera*. M: tamanho de microplantas, CV: tipos de casa-de-vegetação, BD: tipos de bandejas

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M	F
Blocos	9	0,1189	0,01322	
M	2	1,7094	0,8547	91,92*
CV	1	0,0117	0,0117	1,26 ^{ns}
BD	1	0,2460	0,2460	26,45*
M*CV	2	0,0241	0,0120	1,30 ^{ns}
M*BD	2	0,0718	0,0359	3,86*
CV*BD	1	0,0015	0,0015	0,16 ^{ns}
M*CV*BD	2	0,0666	0,0333	3,58*
Resíduo	99	0,9205	0,0093	
Total	119	3,1707		

CV = 31,66; * Significativo a 1% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 7 – Análise de superfície de resposta para o teor de nitrogênio na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	159,3535	0,1719	6,35*
Quadrática	2	276,333	0,2981	11,02*
Interação	1	2,2849	0,0025	0,18 ^{ns}
Total	5	437,9714	0,4724	

Parâmetros	G.L.	Estimativa dos parâmetros	Erro Padrão	F
Interseção	1	0,8429	6,4444	0,13
N	1	0,0244	0,0457	0,53 ^{ns}
Tempo	1	0,2227	0,0533	4,18*
N*N	1	-0,00002	0,0001	-0,21 ^{ns}
Tempo*N	1	0,0003	0,00008	0,43 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	-0,0006	0,0001	-4,69*

Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	159,7640	53,2546	4,25*
Tempo	3	280,4923	93,50	7,45*
Total	39	489,1649	12,5427	

CV = 16,25; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 8 – Análise de superfície de resposta para o teor de fósforo na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	30,7290	0,4839	34,64*
Quadrática	2	14,0955	0,2220	15,89*
Interação	1	1,3834	0,0218	3,12 ^{ns}
Total	5	46,2079	0,7276	

Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	-0,40571	1,2119	-3,35*
N	1	0,0263	0,0086	3,07*
Tempo	1	0,0623	0,0100	6,22*
N*N	1	-0,00005	0,00002	-2,87*
Tempo*N	1	-0,00003	0,00001	-1,77 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	-0,0001	0,00003	-4,85*

Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	6,0560	2,0187	4,55*
Tempo	3	41,5352	13,8450	31,21*
Total	39	17,2985	0,4435	

CV = 16,25 ; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 9 – Análise de superfície de resposta para o teor de potássio na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	912,0282	0,1614	17,33*
Quadrática	2	3651,6106	0,6462	69,40*
Interação	1	61,5654	0,0109	2,34 ^{ns}
Total	5	4625,2042	0,8184	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	15,0333	9,3332	1,61 ^{ns}
N	1	0,0333	0,0661	0,50 ^{ns}
Tempo	1	0,7459	0,0772	9,67*
N*N	1	-0,0002	0,00015	-1,29 ^{ns}
Tempo*N	1	0,0002	0,00012	1,53 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	-0,0023	0,0002	-11,71*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	162,2294	54,0765	2,06 ^{ns}
Tempo	3	4524,5402	1508,1800	57,33*
Total	39	1026,0221	26,3083	

CV = 7,90; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 10 – Análise de superfície de resposta para o teor de cálcio na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	1922,0638	0,6400	60,86*
Quadrática	2	422,4535	0,1407	13,38*
Interação	1	42,9538	0,0143	2,72 ^{ns}
Total	5	2387,4711	0,7949	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	17,4002	7,2309	2,41*
N	1	0,1003	0,0512	1,96 ^{ns}
Tempo	1	0,2165	0,0598	3,62*
N*N	1	-0,0003	0,0001	-2,56*
Tempo*N	1	-0,0001	0,00009	-1,65 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	-0,0007	0,0001	-4,50*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	972,9147	324,3049	20,54*
Tempo	3	1457,5102	485,8367	30,77*
Total	39	615,8557	15,7912	

CV = 13,15; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 11 – Análise de superfície de resposta para o teor de magnésio na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	527,2083	0,9131	236,47*
Quadrática	2	6,6498	0,0115	2,98 ^{ns}
Interação	1	0,0289	0,0001	0,03 ^{ns}
Total	5	533,8870	0,9247	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	18,3942	1,9212	9,57*
N	1	0,0164	0,0136	1,21 ^{sn}
Tempo	1	- 0,0541	0,0159	-3,41*
N*N	1	- 0,00007	0,00003	-2,32*
Tempo*N	1	- 0,000004	0,00002	-0,16 ^{sn}
Tempo*Tempo	1	0,00003	0,00004	0,76 ^{sn}
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	69,1153	23,0384	20,67*
Tempo	3	464,8006	154,9335	138,99*
Total	39	43,4744	1,1147	

CV = 11,09; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 12 – Análise de superfície de resposta para o teor de enxofre na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	5,1327	0,1240	11,46*
Quadrática	2	27,4592	0,6635	61,30*
Interação	1	0,0562	0,0014	0,25 ^{ns}
Total	5	32,6480	0,7889	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	- 1,6540	0,8611	-1,92 ^{ns}
N	1	0,0028	0,0061	0,47 ^{ns}
Tempo	1	0,0707	0,0071	9,93*
N*N	1	- 0,000009	0,00001	-0,67 ^{ns}
Tempo*N	1	- 0,000006	0,00001	-0,50 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	- 0,0002	0,00002	-11,05*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	1,4603	0,4867	2,17 ^{ns}
Tempo	3	31,2439	10,4146	46,50*
Total	39	8,7347	0,2239	

CV = 14,44; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 13 – Análise de superfície de resposta para o teor de boro na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	660,1792	0,1892	7,45*
Quadrática	2	1091,7549	0,3129	12,33*
Interação	1	10,2531	0,0029	0,23 ^{ns}
Total	5	1762,1872	0,5050	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	46,9140	12,1099	3,87*
N	1	- 0,1942	0,0858	-2,26*
Tempo	1	0,4505	0,1001	4,50*
N*N	1	0,0003	0,0002	1,84 ^{ns}
Tempo*N	1	0,00007	0,0002	0,48 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	- 0,0011	0,0003	-4,61*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	520,3108	173,4369	3,92*
Tempo	3	1252,1296	417,3765	9,42*
Total	39	1727,32	44,29	

CV = 10,58; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 14 – Análise de superfície de resposta para o teor cobre na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	204,0113	0,4190	15,35*
Quadrática	2	22,5609	0,0463	1,70 ^{ns}
Interação	1	1,0718	0,0022	0,16 ^{ns}
Total	5	227,6441	0,4676	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	4,0369	4,6914	0,86 ^{ns}
N	1	0,0505	0,0332	1,52 ^{ns}
Tempo	1	0,0122	0,0388	0,32 ^{ns}
N*N	1	- 0,0001	0,00007	-1,55 ^{ns}
Tempo*N	1	- 0,00002	0,00006	-0,40 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	- 0,00009	0,0001	-0,99 ^{ns}
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	18,6058	6,2019	0,93 ^{ns}
Tempo	3	210,1102	70,0367	10,54*
Total	9	259,2381	6,6471	

CV = 41,37; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 15 – Análise de superfície de resposta para o teor de ferro na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	12906	0,1951	10,51*
Quadrática	2	28441	0,4300	23,16*
Interação	1	843,5706	0,0128	1,37 ^{ns}
Total	5	42190	0,6379	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	- 80,7515	45,0902	-1,79 ^{ns}
N	1	1,6628	0,3195	5,20*
Tempo	1	1,3217	0,3728	3,55*
N*N	1	- 0,0039	0,0007	-5,59*
Tempo*N	1	- 0,0007	0,0006	-1,17 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	0,0037	0,0010	-3,88*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	25699	8566,2167	13,95*
Tempo	3	17335	5778,4190	9,41*
Total	39	23947	614,0331	

CV = 18,48 * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 16 – Análise de superfície de resposta para o teor de manganês na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	233309	0,3894	22,69*
Quadrática	2	73988	0,1235	7,20*
Interação	1	91364	0,1525	17,77*
Total	5	398661	0,6654	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	90,7813	130,4681	0,70 ^{ns}
N	1	2,5259	0,9246	2,73*
Tempo	1	3,9505	1,0787	3,66*
N*N	1	- 0,0040	0,0020	-1,93 ^{ns}
Tempo*N	1	- 0,0071	0,0017	-4,22*
Tempo*Tempo	1	- 0,0091	0,0028	-3,27*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	171697	57232	11,13*
Tempo	3	318329	106110	20,64*
Total	39	200493	5140,8556	

CV = 14,00; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 17 – Análise de superfície de resposta para o teor de zinco na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	4850,6469	0,2515	15,95*
Quadrática	2	8504,2589	0,4409	27,97*
Interação	1	3,7152	0,0002	0,02 ^{ns}
Total	5	13359	0,6926	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	9,2824	22,4361	0,41 ^{ns}
N	1	- 0,0528	0,1590	-0,33 ^{ns}
Tempo	1	1,1770	0,1855	6,35*
N*N	1	0,00003	0,0003	0,07 ^{ns}
Tempo*N	1	- 0,00005	0,0003	-016 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	- 0,0036	0,0005	-7,48*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	836,4520	278,8173	1,83 ^{ns}
Tempo	3	12526	4175,2948	27,46*
Total	39	7300,9391	187,2036	

CV = 19,01; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 18 – Análise de superfície de resposta para o teor de proteína total solúvel (PTS) na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	213,0201	0,3982	6939*
Quadrática	2	254,0192	0,4749	82,75*
Interação	1	8,0264	0,0150	5,23*
Total	5	475,0658	0,8881	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	- 13,6787	2,2544	-6,07*
N	1	- 0,0138	0,0159	-0,87 ^{ns}
Tempo	1	0,2339	0,0186	12,55*
N*N	1	0,00004	0,00003	1,06 ^{ns}
Tempo*N	1	0,00007	0,00003	2,29*
Tempo*Tempo	1	- 0,0006	0,00005	-12,82*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	74,5086	24,8362	16,18*
Tempo	3	408,5836	136,1945	88,73*
Total	39	59,8603	1,5348	

CV = 18,96; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo

ANEXO 19 – Análise de superfície de resposta para o teor de açúcares redutores (AR) na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	756,0319	0,666	81,80*
Quadrática	2	130,7744	0,1153	14,15*
Interação	1	67,1978	0,0592	14,54*
Total	5	954,0039	0,8411	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	24,1135	3,9116	6,16*
N	1	- 0,0589	0,0277	-2,12*
Tempo	1	- 0,1429	0,0323	-4,42*
N*N	1	0,00006	0,00006	0,98 ^{ns}
Tempo*N	1	0,0002	0,00005	3,81*
Tempo*Tempo	1	0,0004	0,00008	5,23*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	72,2377	24,0792	5,21*
Tempo	3	948,9640	316,3213	68,45*
Total	39	180,2175	4,6209	

CV = 16,48; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 20 – Análise de superfície de resposta para o teor de açúcares totais (ATS) na planta em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	1027548	0,7645	84,14*
Quadrática	2	67458	0,0502	5,52*
Interação	1	11014	0,0082	1,80 ^{ns}
Total	5	1106021	0,8228	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	288,2655	142,1895	2,03*
N	1	- 0,5272	1,0076	-0,520 ^{ns}
Tempo	1	- 2,1145	1,1756	-1,80 ^{ns}
N*N	1	0,0002	0,0022	0,08 ^{ns}
Tempo*N	1	0,0025	0,0018	1,34 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	0,0101	0,0030	3,32*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	11063	3687,5872	0,60 ^{ns}
Tempo	3	1105973	368658	60,38*
Total	39	238136	6106,0602	

CV = 27,60; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 21 – Análise de superfície de resposta para o índice de área foliar (IAF) em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	56,1857	0,9391	624,95*
Quadrática	2	1,5824	0,0265	17,60*
Interação	1	0,3050	0,0051	6,79*
Total	5	58,0731	0,9707	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	- 0,4462	0,3858	-1,16 ^{ns}
N	1	0,0072	0,0027	2,63*
Tempo	1	0,0016	0,0032	0,50 ^{ns}
N*N	1	- 0,00001	0,000006	-2,28*
Tempo*N	1	- 0,00001	0,000005	-2,60*
Tempo*Tempo	1	0,00004	0,000008	5,48*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	0,8543	0,2848	6,34*
Tempo	3	57,5238	19,1746	426,56*
Total	39	1,7531	0,0449	

CV = 11,42; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 22 – Análise de superfície de resposta para a taxa de assimilação líquida (TAL) em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	0,0297	0,0513	5,50*
Quadrática	2	0,4304	0,7436	79,77*
Interação	1	0,0135	0,0234	5,01*
Total	5	0,4736	0,8182	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	1,0113	0,0945	10,77*
N	1	- 0,00009	0,0007	-0,13 ^{ns}
Tempo	1	- 0,0089	0,0009	-11,47*
N*N	1	0,000001	0,000001	0,85 ^{ns}
Tempo*N	1	- 0,000003	0,000001	-2,24*
Tempo*Tempo	1	0,00002	0,000002	12,60*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	0,0163	0,0054	2,02 ^{ns}
Tempo	3	0,4708	0,1569	58,17*
Total	39	0,1052	0,0027	

CV = 16,97; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 23 – Análise de superfície de resposta para taxa decrescimento relativo(TCR) em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	0,0004	0,2404	14,11*
Quadrática	2	0,0006	0,3743	21,96*
Interação	1	0,00008	0,0529	6,21*
Total	5	0,0010	0,6676	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	0,0351	0,0065	5,38*
N	1	0,00009	0,00005	1,99 ^{ns}
Tempo	1	- 0,0003	0,00005	-5,90*
N*N	1	- 0,0000001	0,0000001	-1,47 ^{ns}
Tempo*N	1	- 0,0000002	8,4912	-2,49*
Tempo*Tempo	1	0,0000009	0,0000001	6,46*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	0,0001	0,00004	3,57*
Tempo	3	0,0009	0,0003	24,62*
Total	39	0,0005	0,00001	

CV = 23,07; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 24 – Análise de superfície de resposta para taxa de crescimento absoluto (TCA) em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	4,2142	0,0691	1,49 ^{ns}
Quadrática	2	1,6021	0,0263	0,57 ^{ns}
Interação	1	0,0490	0,0008	0,03 ^{ns}
Total	5	5,8653	0,0961	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	0,0911	2,1640	0,04 ^{ns}
N	1	- 0,0111	0,0153	-0,73 ^{ns}
Tempo	1	0,0178	0,0179	0,9 ^{ns}
N*N	1	0,00002	0,00003	0,65 ^{ns}
Tempo*N	1	- 0,000005	0,00003	-0,19 ^{ns}
Tempo*Tempo	1	- 0,00004	0,00005	-0,84 ^{ns}
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	3,1368	1,0456	0,74 ^{ns}
Tempo	3	2,7774	0,9258	0,65 ^{ns}
Total	39	55,1594	1,4143	

CV = 279,49; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 25 – Análise de superfície de resposta para o incremento de massa de matéria fresca (IMMF) em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	32703781	0,9195	476,22*
Quadrática	2	1045604	0,0294	15,23*
Interação	1	478858	0,0135	13,95*
Total	5	34228243	0,9623	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	- 476,0547	337,1854	-1,41 ^{ns}
N	1	5,0205	2,3895	2,10*
Tempo	1	1,1252	2,7878	0,40 ^{ns}
N*N	1	- 0,0081	0,0053	-1,53 ^{ns}
Tempo*N	1	- 0,0163	0,0044	-3,73*
Tempo*Tempo	1	0,0383	0,0072	5,30*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	1154423	384808	11,21*
Tempo	3	33552679	11184226	325,72*
Total	39	1339148	34337	

CV = 15,53; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.

ANEXO 26 – Análise de superfície de resposta para o incremento de massa de matéria seca (IMMS) em função de doses de nitrogênio e tempo de cultivo

Regressão	G.L.	S.Q.	R ²	F
Linear	2	28127	0,8462	657,26*
Quadrática	2	3952,6280	0,1189	92,36*
Interação	1	326,5936	0,0098	15,26*
Total	5	32406	0,9749	
Parâmetros	G.L.	Estim.Parâmet.	Erro Padrão	F
Interseção	1	25,0840	8,4171	2,98*
N	1	0,0639	0,0596	1,07 ^{ns}
Tempo	1	- 0,4544	0,0696	-6,53*
N*N	1	- 0,00002	0,0001	-0,15 ^{ns}
Tempo*N	1	- 0,0004	0,0001	-3,91*
Tempo*Tempo	1	0,0024	0,0002	13,59*
Fator	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
N	3	478,9526	159,6509	7,46*
Tempo	3	32253	10751	502,46*
Total	39	834,4804	21,3969	

CV =14,33; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo.