

## Produção de mudas de carobinha (*Jacaranda decurrens* Cham.) em sistema de imersão temporária com biorreatores do tipo R.I.T.A.

NASCIMENTO, M.M.; FERREIRA, M.A.C.\*; MALOSSO, M.G.

Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Saúde e Biotecnologia, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Estrada Coari-Mamiá, 305, Bairro Espírito Santo, CEP: 69.460-000, Coari-Brasil \*marciocout@yahoo.com.br

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi averiguar a melhor densidade de explantes e o melhor tipo de sistema de cultivo visando desenvolver um protocolo de micropropagação de baixo custo para a Carobinha. Foram realizados experimentos de multiplicação *in vitro* com quatro tipos de frascos: R.I.T.A. (50 explantes/frasco), erlenmayer, (50 explantes/frasco), potes tipo maionese (6 explantes/frasco) e cubetas (1 explante/frasco). O co-cultivo de explantes, tanto em meio sólido quanto em meio líquido (R.I.T.A.), promoveu maiores taxas de explantes com brotação e de sobrevivência. O sistema de imersão temporária proporcionou melhores índices de desenvolvimento, brotação, sobrevivência e altura dos explantes. Concluímos que biorreatores podem ser utilizados eficientemente para a micropropagação de carobinha.

**Palavras-chave:** multiplicação *in vitro*, otimização de protocolo, *Jacaranda decurrens*, planta medicinal

**ABSTRACT: “Carobinha” seedling production in a temporary immersion system with R.I.T.A. bioreactors.** The aim of this study was to identify the best explant density and the best cultivation system with the goal of developing a micropropagation protocol of low cost for “carobinha” (*Jacaranda decurrens* CHAM.). Experiments of *in vitro* multiplication were carried out using four flask types: R.I.T.A. (50 explants/flask), Erlenmeyer (50 explants/flask), mayonnaise pots (6 explants/flask) and cuvettes (1 explant/flask). The co-cultivation of explants, in both solid and liquid medium (R.I.T.A.), led explants to show higher sprouting and survival rates. The temporary immersion system provided better rates of development, sprouting, survival and height of explants. We concluded that bioreactors may be efficiently used for the micropropagation of “carobinha”.

**Key words:** *In vitro* multiplication, protocol optimization, *Jacaranda decurrens*, medicinal plant

### INTRODUÇÃO

A *Jacaranda decurrens* Cham. (Bignoniaceae) é popularmente conhecida como carobinha e produz derivados de 6-hidroxiluteolina (Blatt et al., 1998) sendo muito procurada no Cerrado, uma vez que as raízes são indicadas contra inflamações e como depurativo, tônico e utilizadas para curar feridas internas e externas (Pereira et al., 2007). Embora não haja até o momento ensaios fitoquímicos e farmacológicos sistematizados, foi detectado o ácido ursólico em *J. decurrens* (Guerreiro et al., 2006). Vários estudos têm mostrado que esse triterpeno tem atividade antiinflamatória (Mauro et al., 2007), de inibição da HIV1-protease (Min et al., 1999), anti-malária (Traore-Keita et al., 2000) e também apresenta atividade antitumoral (Subbaramaiah et al., 2000; Li et al., 2002). Tanto a casca como as folhas

são consideradas depurativas (Vieira & Martins, 2000). Por estas razões, diversas indústrias têm coletado estes indivíduos de maneira indiscriminada acarretando erosão genética.

No que se refere à produção de plantas, a adoção de metodologias biotecnológicas como a micropropagação é de extrema importância uma vez que esta técnica pode produzir grande número de plantas em curto espaço de tempo e com garantia fitossanitária e de estabilidade genética das mudas (Guerra et al., 1999), possibilitando a reinserção dessas espécies em seu habitat natural, visto que este está sendo incessantemente devastado pela ação antrópica (Pereira et al., 2007).

A micropropagação é uma técnica relativamente recente e com grande potencial, mas

que depende do desenvolvimento de novas técnicas de automação dos processos e do melhoramento dos sistemas de cultivo (Pérez et al., 1998). A técnica visa a produção de plantas em larga escala para satisfazer as necessidades industriais e a alta demanda no mercado (Cid et al., 2002).

A automação do sistema de micropropagação em biorreatores pode diminuir os custos laboratoriais evitando a transferência constante dos explantes para meio de cultura fresco e a repicagem das plantas, minimizando assim a necessidade de mão-de-obra especializada. Além disso, o cultivo de espécies em meio de cultura líquido apresenta algumas vantagens como a estimulação da taxa de crescimento e a multiplicação de explantes, já que aumenta a absorção uniforme de gradientes nutricionais (Lemos et al., 2001). No entanto, explantes mantidos permanentemente imersos em meio de cultura líquido, mesmo sob condições de agitação e aeração constante dos biorreatores, podem sofrer estresse hídrico e/ou necrose por asfixia (Oliveira et al., 2007). Para reduzir as desvantagens do cultivo em meio de cultura líquido, vários trabalhos foram desenvolvidos com base no sistema de imersão temporária dos explantes no meio de cultura (Batistini et al., 2002; Rodrigues et al., 2006).

O Recipiente de Imersão Temporária Automatizado (R.I.T.A.) evita que os explantes permaneçam em contato constante com o meio de cultura líquido, o que otimiza as vantagens e elimina as desvantagens dos meios líquidos, além de diminuir o espaço utilizado em salas de crescimento e/ou de banco de germoplasma, visto que grande número de mudas podem ser cultivadas simultaneamente em um único frasco (Silva et al., 2007). Dessa forma, esta técnica de cultivo torna-se ferramenta importante para otimizar o protocolo de micropropagação de *J. decurrens*, já que é capaz de produzir alta taxa de biomassa vegetal desta espécie que apresenta uso potencial como fitoterápico, utilizando quantia muito pequena de meio de cultura.

O objetivo deste trabalho é utilizar biorreatores do tipo R.I.T.A. para produzir grande número de mudas em pequeno espaço laboratorial e minimizar os custos com reagentes e mão-de-obra especializada, uma vez que este sistema é automatizado e possibilita o crescimento de muitas mudas em um único pote (Paek et al., 2001).

## MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado com *Jacaranda decurrens* CHAM, que pertence à família Bignoniaceae e foi identificada pelo Prof. Dr. Carlos Ferreira Damião Filho, da UNESP de Jaboticabal. A exsicata encontra-se depositada no Herbário de Plantas Medicinais da UNAERP com o número

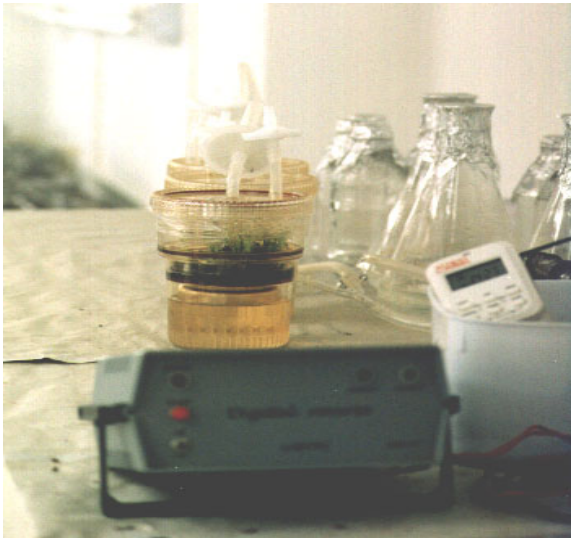
HPMU-SP 570. O material vegetal utilizado para a pesquisa foi coletado em Itirapina-SP (latitude 22°15'52,2", longitude 47°53'54,0", altitude 751m). Os segmentos nodais utilizados como fonte de explantes foram oriundos de plantas mantidas *in vitro* por dois anos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas/claro através de lâmpadas brancas frias da GE, na umidade de 65% e temperatura de 18 ± 2°C (Malosso et al., 2008).

Para a avaliação do Sistema de Imersão Temporária Automatizado foi montado um experimento amplo, subdividido em três ensaios, todos realizados com o meio de cultura WP basal (556,0 mg L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 400,0 mg L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 2,5 g L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>; 96,0 mg L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O; 300,0 mg L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 170,0 mg L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 990,0 mg L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O; 22,3 mg L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 8,6 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7.H<sub>2</sub>O; 6,2 mg L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,83 mg L<sup>-1</sup> KI; 0,025 mg L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 37,7 mg L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O; 27,8 mg L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 mg L<sup>-1</sup> Ácido nicotínico; 0,5 mg L<sup>-1</sup> Piridoxina HCl; 1,0 mg L<sup>-1</sup> Tiamina HCl; 2,0 mg L<sup>-1</sup> Glicina e 100,0 mg L<sup>-1</sup> Mio-inositol), suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina e 20,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com pH ajustado para 6,0, conforme protocolo de micropropagação desta espécie (Pereira et al., 2007).

O primeiro ensaio foi realizado em frascos plásticos do tipo R.I.T.A. (Sigma Chemical Company), apropriados para o cultivo em sistema de imersão temporária, com capacidade de 900 mL, onde foram inoculados segmentos nodais coletados de plantas cultivadas *in vitro* por dois anos, mantidas em sala de crescimento. Três frascos do tipo R.I.T.A. contendo 300 mL de meio de cultura e 50 explantes por frasco, foram ligados entre si com vidros em forma de Y através de mangueiras de silicone. Estas mangueiras foram conectadas a bomba de vácuo, diretamente ligada a aparelho digital reverso que acionava a bomba de vácuo de modo que, de 12 em 12 horas, o meio de cultura líquido era impulsionado para a parte superior do frasco onde se localizavam os explantes que ficaram totalmente submersos durante 5 minutos, como mostra a Figura 1.

No segundo ensaio foi realizado o cultivo em meio líquido desta planta. Para isto foram utilizados 3 frascos do tipo Erlenmeyers de 1.000 mL contendo 300 mL de meio de cultura onde foram inoculados 50 explantes por frasco. Os explantes foram mantidos sob agitação orbital constante a 100 rpm.

No terceiro ensaio o cultivo foi realizado em meio de cultura semi-sólido em dois tipos de frascos: potes de vidro com 8,5 cm de altura por 5,5 cm de diâmetro contendo 6 explantes em co-cultivo, e tubo de ensaio de vidro transparente com 8,5 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, vedada com tampa de polipropileno branco com as extremidades vedadas com parafilme transparente, contendo 1 explante em cultivo isolado. Foram



**FIGURA 1.** Sistema de imersão temporária automatizado contendo seguimentos nodais de *Jacaranda decurrens* CHAM.

utilizados 150 frascos por tratamento.

Aos meios de cultura semi-sólidos foi adicionado  $4,0 \text{ g L}^{-1}$  de Phytigel®. Estes três ensaios foram conduzidos por período de 90 dias em condições de sala de crescimento e, então, avaliados quanto ao número e altura do broto, taxa de sobrevivência e presença e ausência de calos e raízes.

Em todos os ensaios supracitados foram utilizados 50 explantes por tratamento e em triplicata. O delineamento experimental adotado em todos os ensaios foi o inteiramente casualizado e, para a comparação das médias dos tratamentos, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5%.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

A eficiência do sistema R.I.T.A. foi avaliada em comparação com o cultivo isolado ou em co-cultivo de explantes em meio semi-sólido, como também em meio líquido sob agitação.

Os explantes inoculados em meio líquido que ficaram permanentemente em contato como o meio de cultura oxidaram e necrosaram totalmente após 20 dias de cultivo, o que pode ser explicado pelo

estresse hidrodinâmico que tornou os explantes entumescidos e enegrecidos levando-os à morte (Pereira & Fortes, 2003). Esse estresse consiste no contato contínuo entre o explante e o meio de cultura. Embora os frascos tenham sido colocados com agitação orbital constante, o que permite boa aeração, os explantes de *J. decurrens*, com características xeromórficas adaptadas à ambientes secos, possivelmente não resistiram ao ambiente de extrema e permanente umidade.

O cultivo de vários explantes juntos num mesmo frasco, por 90 dias, seja em meio sólido ou líquido (R.I.T.A.) promoveu maior porcentagem de explantes com brotação e também maior sobrevivência destes explantes quando comparados aos explantes cultivados isoladamente em cubetas (Tabela 1).

O sistema de imersão temporária promoveu excelente desenvolvimento dos explantes, com índice de brotação de 100%. Explantes cultivados nesse sistema apresentaram maior crescimento em altura (1,93 cm) e o maior índice de sobrevivência (100%) em relação aos explantes mantidos em meio sólido, tanto em cubeta quanto em frasco. Contudo, nenhum destes tipos de cultivo induziu a formação de raízes nos explantes, pois, para que isso ocorra é necessário a adição de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de espermidina e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de IBA ao meio de cultura (Pereira et al., 2007).

O sistema R.I.T.A. foi tão eficiente quanto o co-cultivo em meio de cultura sólido do ponto de vista do desenvolvimento dos explantes. Entretanto, a vantagem do sistema de imersão temporária é que ele permite automação e é mais econômico uma vez que não utiliza agentes solidificantes, o que representa redução do custo do meio de cultura.

Os explantes nos três sistemas avaliados (R.I.T.A., em cultivo isolado ou em co-cultivo) conservaram-se verdes e vigorosos apesar de permanecerem por 90 dias no mesmo meio de cultura. Isso demonstra a baixa exigência nutricional da *J. decurrens*, característica comum das plantas endêmicas do cerrado.

Com os dados obtidos neste trabalho, conclui-se que o sistema de imersão temporário R.I.T.A. é indicado para produzir mudas *in vitro* de *J. decurrens* em larga escala e que a otimização do protocolo de micropropagação para carobinha aqui

**TABELA 1.** Efeito de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* sobre os explantes de *J. decurrens*.

Tipo de frasco	Explantes com brotação (%)	Número de brotos por gema	Número de gemas por haste	Altura do broto (cm)	Presença de calos (%)	Presença de raiz (%)	Sobrevivência de explantes (%)
Frasco	96,77 a	1,37 a	3,73 a	1,63 b	100,00 a	0 a	79,35 b
Cubeta	59,68 b	1,97 a	3,77 a	1,03 b	85,48 a	0 a	58,10 c
RITA	100,00 a	1,77 a	5,43 a	1,93 a	100,0 a	0 a	100,00 a

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

apresentado viabiliza a produção em larga escala desta espécie medicinal do cerrado exposta à erosão genética.

A partir da metodologia aqui desenvolvida, centenas ou milhares de indivíduos poderão retornar às áreas de ocorrência natural ou seguir para campos de cultivo viabilizando a produção de fitoterápicos e atendendo a demanda da indústria farmacêutica brasileira sem comprometer a biodiversidade nacional.

#### AGRADECIMENTO

À CAPES e à Biota/FAPESP pelo apoio financeiro e ao Dr. Carlos Ferreira Damiano Filho pela identificação da espécie vegetal.

#### REFERÊNCIA

BATISTINI, A.P. et al. Avaliação de diferentes sistemas de cultivo "in vitro" para a micropropagação de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, n.1, p.27-35, 2002.

BLATT, C.T.T. et al. Flavonoides of Bignoniaceae from the "cerrado" and their possible taxonomic significance. **Austria Plant Systematics and Evolution**, v.210, p.289-92, 1998.

CID, P.B. et al. Biorreatores de imersão permanente. **Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento**, v.25, p.50-3, 2002.

GUERRA, M.P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Agropecuária Brasileira**, v.34, n.9, p.1557-63, 1999.

GUERREIRO, C.P.V. et al. Production of aerial and underground biomass of Carobinha (*Jacaranda decurrens* CHAM. - Bignoniaceae) at different harvest times. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.esp., p.80-2, 2006.

LEMO, E.E.P. et al. Micropropagação de clones de banana cv. terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.3, p.182-7, 2001.

LI, J. et al. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. **World Journal Gastroenterol**, v.3, n.8, p.493-5, 2002.

LLOYD, E.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society**, v.30, p.421-7,

1980.

MALOSSO, M.G. et al. Micropropagação de jambu [*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.3, p.91-5, 2008.

MAURO, C. et al. Estudo anatômico das espécies de cerrado *Anemopaegma arvense* (Vell.), Steff. ex de Souza (Catuba), *Zeyheria montana* Mart. (Bolsa-de-pastor) e *Jacaranda decurrens* Chamisso (Caroba) - Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.262-5, 2007.

MIN, B.S. Inhibitory effect of triterpenes from *Crataegus pinatifida* on H protease. **Planta Médica**, v.65, n.4, p.374-5, 1999.

OLIVEIRA, F.F.M. et al. Micropropagação de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. a partir de segmentos nodais e ápices caulinares. **Revista Caatinga**, v.20, n.3, p.151-9, 2007.

PAEK, K.Y. et al. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. **In vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v.37, p.149-57, 2001.

PEREIRA, A.M.S. (Coord.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Co-Edição: Biota/Reserva Ecocerrado do Brasil, 2007. 356p.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Protocolo para a produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.9, p.1035-43, 2003.

PÉREZ, P.A.O. et al. Aumento de la eficiencia en la micropropagación. In: PÉREZ PRONCE, J.N. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Cuba: Instituto de Biotecnología de Plantas, 1998, p.179-91.

RODRIGUES, P.H.V. et al. Propagação de mudas de Helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, v.65, n.1, p.29-35, 2006.

SILVA, A.B. et al. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.9, p.1257-60, 2007.

SUBBARAMAIAH, K. et al. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. **Cancer Resources**, v.9, n.60, p.2399-404, 2000.

TRAORE-KEITA, F. et al. Antimalarial activity of four plants used in traditional medicine in Mali. **Phytotherapy Resources**, v.1, n.14, p.45-7, 2000.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.1, n.3, p.13-36, 2000.