

Desenvolvimento de um protocolo pioneiro para micropropagação da macaúba *Acrocomia totai*: prospecção de novos explantes e métodos de desinfestação

Palavras-Chave: Cultura de tecidos, Bioenergia, Macaúba

Autores(as):

LAURA DINIZ, IB - UNICAMP

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (orientador), IB- UNICAMP, Dr Marcelo Falsarella Carazzole, IB- UNICAMP, , Dr^a Pollyana Silva, IB- UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bocaiúva como uma alternativa para a energia renovável

O uso intensivo de combustíveis fósseis tem acelerado as mudanças climáticas e comprometido a segurança energética global, tornando essencial a procura por alternativas energéticas renováveis, eficientes e sustentáveis - tais como os biocombustíveis. No Brasil, esta indústria é bem consolidada, entretanto, as mudanças climáticas, o aumento das temperaturas globais e a escassez hídrica representam desafios significativos para culturas tradicionalmente utilizadas na produção de biodiesel, como a soja e a palma, prejudicando sua comercialização¹⁻³. Essas adversidades comprometem a produtividade e a viabilidade econômica dessas culturas, evidenciando a necessidade de explorar novas fontes de biomassa que sejam resilientes às mudanças climáticas e ao cultivo em regiões secas, como o Cerrado.

Diante desse contexto, as palmeiras do gênero *Acrocomia*, conhecidas popularmente por macaúba ou bocaiúva, despontam como uma alternativa promissora para a produção sustentável de biomassa e biodiesel devido a sua elevada produtividade oleaginosa e sua resistência a ambientes secos e degradados⁴ [Figura 1]. Além de serem culturas perenes, com menores custos de manutenção e plantio do que espécies, as macaúbas se destacam por sua grande produtividade, maior do que qualquer outra oleaginosa granífera. Por exemplo, enquanto o dendezeiro (*Elaeis guineensis*), internacionalmente conhecido como Palma, produz em torno de 2 a 5 toneladas de óleo ha.ano^{-1,5}, estima-se que algumas espécies de macaúba podem atingir até 8 toneladas de óleo ha.ano^{-1,6}. Além disso, já se observa uma produtividade 2,5 toneladas ha.ano⁻¹ sob extrativismo⁷, evidenciando seu potencial superior para produção de biocombustíveis em larga escala.

Dentre as espécies do gênero *Acrocomia*, *A. totai* destaca-se por possuir menos espinhos, epicarpo mais fino e polpa mais doce, tornando-se historicamente mais utilizada por comunidades locais em comparação à *A. aculeata*⁹. Assim, embora *A. aculeata* esteja mais estabelecida no mercado, *A. totai* apresenta características morfológicas e produtivas semelhantes e tem sido amplamente explorada em países como Paraguai e Bolívia. No Brasil, apesar da presença de populações nativas expressivas desta espécie, especialmente no Mato Grosso do Sul e oeste do Paraná, seu potencial permanece subutilizado. À vista disso, este projeto propõe a utilização de *A. totai* como objeto de estudo, visando explorar seu potencial para a produção de biodiesel e coprodutos de alto valor agregado.

Todavia, existem diversos entraves para a produção em larga escala dessa palmeira e as técnicas tradicionais de propagação apresentam obstáculos consideráveis. Por exemplo, a germinação de sementes dessa espécie é limitada devido a uma elevada taxa de dormência, limitando sua propagação em escala comercial¹⁰. Além disso, há uma alta taxa de polinização cruzada, tornando as técnicas de propagação por sementes inadequadas para a obtenção

de populações homogêneas e geneticamente interessantes. Outros desafios da propagação tradicional incluem alta heteroziguidade nas populações, períodos juvenis prolongados e ausência de meristemas axilares vegetativos, dificultando a aplicação de métodos convencionais para melhorar a produção e a qualidade do óleo de bociáúva.



Figura 1: Visão geral de *Acrocomia aculeata* (A) e *A. totai* (B)⁸.

1.2. Cultura de tecidos como estratégia de micropropagação

Nesse cenário, a micropropagação *in vitro* surge como uma ferramenta essencial para permitir a produção em larga escala de mudas com qualidade genética e sanitária controlada de *A. totai*¹¹. A cultura de tecidos vegetais, nesse contexto, representa uma abordagem promissora para superar os desafios associados à propagação convencional. Trata-se de uma técnica baseada no cultivo asséptico de células, tecidos ou órgãos vegetais sob condições controladas de laboratório, amplamente empregada em espécies de interesse agrícola, medicinal e ornamental¹².

O protocolo de cultura de tecidos é composto por etapas sucessivas: coleta do explante, desinfestação, introdução em meio de cultura, multiplicação, enraizamento e aclimação. Não somente, o sucesso do protocolo depende de variáveis como a origem do explante, os agentes de assepsia e os reguladores de crescimento utilizados. Assim, considerando as limitações reprodutivas de *A. totai*, se torna fundamental desenvolver protocolos eficientes que viabilizem o uso de explantes viáveis, preferencialmente não destrutivos, capazes de promover a multiplicação rápida e sustentável da espécie para que ela se torne uma alternativa viável na produção nacional de biocombustíveis.

Desse modo, apesar de existirem alguns protocolos de cultura de tecidos já estabelecidos para *A. aculeata*^{26, 27}, não há relatos específicos sobre sua aplicação em *A. totai*. Além disso, sabe-se que as respostas aos protocolos de micropropagação são genótipo-dependentes, o que impede a simples adaptação de metodologias entre espécies distintas. Dessa forma, este projeto apresenta um caráter pioneiro ao propor o desenvolvimento de um método de micropropagação especificamente para *A. totai*, concentrando-se nas etapas iniciais do protocolo - coleta do explante e desinfestação -, como base para futuros avanços na regeneração e multiplicação da espécie por via biotecnológica.

1.3. Seleção de novos explantes

Nesse sentido, antes da definição das concentrações ideais de reguladores de crescimento vegetal - como auxinas e citocininas - bem como da formulação do meio de cultura, ajuste de pH e tempo de cultivo adequados para a cultura de tecidos de *Acrocomia totai*, é fundamental determinar quais explantes apresentam maior potencial para esse processo. Por esses motivos, um dos desafios da micropropagação dessa espécie está relacionado à sua limitada capacidade de formação de rebentos e meristemas axilares, restringindo as opções de explantes principalmente aos meristemas apicais radiculares e caulinares.

Tradicionalmente, a obtenção de tecidos meristemáticos utilizados na indução da embriogênese somática em *A. aculeata* e outras palmeiras ocorre por meio da extração do meristema apical, conhecido popularmente como palmito¹³. Esse processo exige cortes profundos no estipe, expondo a região meristemática interna da planta. No entanto, essa abordagem é altamente destrutiva e frequentemente resulta na morte da planta matriz, tornando-se uma prática inviável para a propagação em larga escala e conservação da espécie. Portanto, diante dos desafios apresentados pela obtenção convencional de explantes em palmeiras, este projeto propõe a utilização do meristema apical radicular como alternativa para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação *in vitro* de *A. totai*. Vale ressaltar que até o momento, não há relatos na literatura sobre o uso desse tipo de explante para tal fim, seja em *A. aculeata* ou *A. totai*. A expectativa é que essa abordagem permita a obtenção de material meristemático de forma menos invasiva, rápida e sustentável, viabilizando a propagação da espécie sem comprometer a planta matriz.

As raízes de palmeiras apresentam uma estrutura anatômica distinta, predominantemente fasciculado ¹⁴. Na extremidade de cada raiz, localiza-se o meristema apical, uma região de intensa atividade mitótica, protegida pela coifa, que é a região de interesse do estudo pois é responsável pelo crescimento contínuo da raiz e pela percepção de estímulos ambientais. Desse modo, a utilização de tal tecido para indução de brotações poderia representar uma alternativa viável à extração destrutiva do meristema caulinar, comumente empregada na micropropagação de palmeiras. Ou seja, explorar o potencial do meristema apical da raiz de *Acrocomia totai* para regeneração *in vitro* pode abrir novas perspectivas para a propagação dessa palmeira, permitindo a obtenção de material meristemático de forma sustentável e eficiente.

1.4. Desinfestação como uma parte essencial da micropropagação

No cultivo *in vitro* de plantas, a desinfestação dos explantes é uma das etapas mais críticas, já que o ambiente controlado favorece o crescimento de microrganismos indesejáveis, como bactérias e fungos. Além disso, a presença de contaminantes pode comprometer todo o processo de propagação e inviabilizar o cultivo das plantas ¹⁵. A desinfestação envolve a aplicação de soluções específicas para a remoção de microrganismos presentes na superfície dos explantes ou sementes ¹⁶. Diante dessa perspectiva, esse procedimento deve ser eficaz para eliminar os contaminantes, ao mesmo tempo que minimize os danos ao material vegetal ¹⁷.

Os desinfetantes mais utilizados incluem etanol e compostos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio e de cálcio ^{18,19}. O protocolo de desinfestação varia conforme a espécie, com ajustes na concentração dos desinfetantes, tempo de exposição dos explantes e combinações dos agentes utilizados, levando em consideração a sensibilidade dos tecidos vegetais. No caso específico da bocaiúva, a escolha do método adequado de desinfestação é crucial para garantir explantes livres de contaminantes e promover o sucesso da regeneração celular, formação de brotos e, conseqüentemente, da sua micropropagação. Pois, apesar da falta de literatura, a desinfestação das raízes apresenta desafios únicos devido à estrutura peculiar das suas raízes e à presença de camadas mais espessas e resistentes à penetração de soluções desinfetantes, conforme observado em laboratório. As técnicas aplicadas a outras plantas podem ser adaptadas, mas é necessário um estudo mais aprofundado para determinar as condições ideais de concentração e tempo de exposição para essa espécie - objetivo deste projeto.

Diversos métodos de desinfestação têm sido empregados na cultura de tecidos vegetais, sendo que os mais utilizados envolvem soluções químicas, comumente acessíveis e eficazes para desinfetar raízes sem causar danos aos explantes. O hipoclorito de sódio (NaOCl) a 10-30% é um dos desinfetantes mais comuns, eficaz contra fungos e bactérias. A aplicação geralmente dura de 10 a 20 minutos, dependendo da espécie e da concentração. Outra solução amplamente utilizada é o etanol 70%, utilizado para a desinfecção superficial das raízes, ajudando a reduzir a carga microbiana sem comprometer a viabilidade do explante. Em adição, o uso de peróxido de hidrogênio e fungicidas específicos tem sido recomendado em algumas situações, principalmente em espécies mais suscetíveis a infecções fúngicas. A escolha do desinfetante deve ser criteriosa, com base nas características de cada espécie, visando balancear eficácia e segurança para o explante.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção do material vegetal:

O material vegetal a ser utilizado como explante, raízes de *Acrocomia totai*, como também sementes, serão coletadas através de expedições exploratórias na região de incidência no Estado do Mato Grosso do Sul e no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

2.2. Desinfestação, estabelecimento e multiplicação *in vitro*

A desinfestação do material vegetal a ser introduzido *in vitro* é de extrema importância para todo o processo subsequente da micropropagação e espécies de palmeiras, é uma etapa desafiadora. A esterilização do material vegetal será realizada em etanol a 70% por 3 minutos seguido por lavagem de hipoclorito de sódio (NaClO) por 20 minutos e posteriormente de uma tripla lavagem com água destilada estéril em uma câmara de fluxo de ar laminar. Serão testados tempos de exposição aos desinfetantes diferentes para obtenção de uma melhor desinfestação. Posteriormente, os explantes serão inoculados em frascos contendo meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1964), com a metade das concentrações dos sais (MS ½), suplementado com 3% de sacarose, solidificado ou não com 0,7%

de ágar e serão adicionados reguladores de crescimento (0,5 a 1,5 μM de 2,4D e 0,5 a 1,5 μM de BAP) para indução de brotos, reguladores a formação de plântulas.

As plantas obtidas após a fase de estabelecimento, serão multiplicadas por três ciclos de subcultivos, o meio de cultura utilizado será o MS (Murashige e Skoog, 1964) com a metade das concentrações dos sais (MS $\frac{1}{2}$), suplementado com o regulador de crescimento vegetal 6-benzilaminopurina (BAP) 53,28 μM , sacarose 87,64 mM e 0,7 % de ágar, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. As inoculações dos explantes serão realizadas em frascos de 252 mm x 329 mm, contendo 40 ml de meio de cultura estéril.

As culturas serão mantidas no escuro por 30 dias e transferidas para luz, sendo que a cada 20 dias serão transferidas para placas com os mesmos meios de cultura dos tratamentos, porém, novos. Após 80 dias de cultivo, as variáveis analisadas serão: porcentagem de explantes oxidados, formação de calo, formação de gema, formando brotações e o número de brotações formadas por explante regenerando.

3. RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÃO

3.1. Preparo do material



Figura 2: Preparo das raízes de *A. totai* coletadas. (A) Raízes coletadas. (B) Retirada da casca. (C) Foco no muco liberado durante a retirada da casca. (D) Explantes após a retirada da casca.

Durante as etapas iniciais de manipulação e de contato com o explante, foi constatada a presença de uma casca externa, rígida e ressecada envolvendo os tecidos radiculares. Essa estrutura foi removida e, então, a raiz foi cortada de modo a expor a região meristemática, a fim de facilitar a divisão celular e reduzir a contaminação. No entanto, a retirada da casca provocou uma rápida oxidação dos tecidos e a liberação abundante de um muco espesso, cuja composição ainda não foi caracterizada. Com o intuito de reduzir os danos oxidativos e preservar a viabilidade fisiológica dos explantes, ajustes metodológicos foram implementados.

A partir de então, as raízes coletadas no IAC passaram a ser transportadas submersas em água Mili-Q para manter a umidade nos explantes, e os procedimentos de preparo foram realizados imediatamente após a coleta, no mesmo dia. Adicionalmente, os cortes passaram a ser efetuados em solução de ácido ascórbico, um agente antioxidante amplamente utilizado em protocolos de cultura de tecidos. Com esses novos procedimentos, notou-se uma melhoria significativa na viabilidade dos explantes, permitindo uma manipulação e preparo do material mais eficiente pois os explantes estavam menos rígidos e menos oxidados.

3.2. Corte e introdução do material

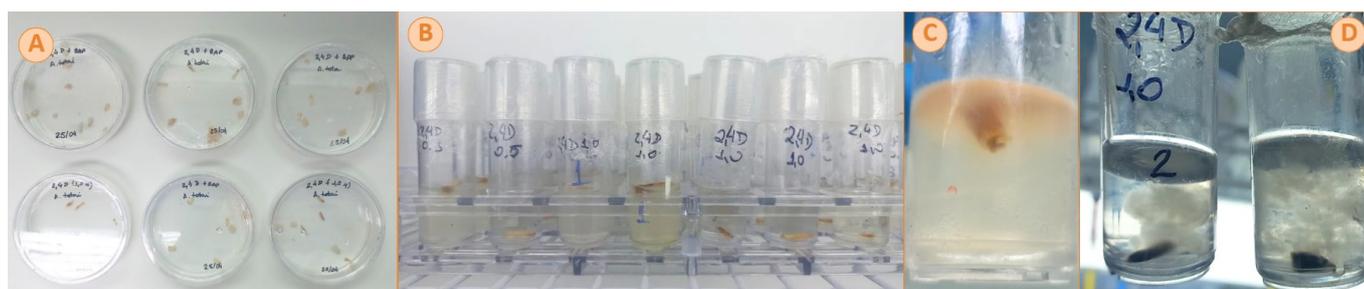


Figura 3: Observações iniciais dos experimentos realizados. (A) Raízes imersas em meio líquido em placa de Petri. (B) Explantes individualizados. (C) Possível resposta de enraizamento apesar de contaminantes. (D) Exemplos de contaminantes.

Devido à escassez de protocolos estabelecidos para *A. totai* e de relatos na literatura sobre o uso de raízes como explante para palmeiras, cada tentativa experimental tem contribuído com informações valiosas sobre as respostas morfológicas da planta. A partir das observações empíricas, foi possível ajustar a estratégia experimental, adotando a individualização dos explantes em tubos de ensaio, o que permitiu um monitoramento mais preciso de suas respostas fisiológicas e reduziu o risco de contaminação cruzada

Entre os principais desafios enfrentados nesta fase inicial do projeto, estão a oxidação do explante e a contaminação dos meios por microrganismos endofíticos. Foi verificado que a manutenção dos explantes em meio líquido, sob condições de escuro, promoveu uma redução significativa da oxidação, quando comparada às condições de luz e meio sólido. Além disso, a adição de ácido ascórbico ao meio de cultura reforçou esse efeito protetor, demonstrando-se eficaz na atenuação das respostas oxidativas imediatas.

Em relação aos protocolos de desinfestação, o tratamento convencional com etanol 70% por 3 minutos, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio por 25 minutos sob agitação, com posterior lavagem quádrupla em água destilada estéril, demonstrou-se inicialmente eficaz na remoção da microbiota superficial. Contudo, após alguns dias de cultivo, foram observadas colonizações fúngicas e bacterianas provenientes do interior dos tecidos - indicando a presença de microrganismos endofíticos não eliminados pelo protocolo. Essa constatação aponta para uma limitação dos métodos convencionais de esterilização quando aplicados a tecidos radiculares, cuja estrutura anatômica pode proteger uma microbiota endógena ainda desconhecida. A função ecológica dessa microbiota para a fisiologia das raízes de *A. totai* ainda é incerta, não sendo possível, no momento, afirmar se tais microrganismos exercem influência benéfica, neutra ou deletéria sobre os processos de micropropagação.

Como próximos passos do projeto, pretende-se avaliar a eficácia de fitormônios, como BAP e 2,4-D, em concentrações elevadas na indução de enraizamento e formação de calos, bem como testar diferentes combinações de agentes antifúngicos e antibióticos no meio de cultura, a fim de reduzir a carga endofítica sem comprometer a viabilidade celular dos explantes.

Por fim, essa estratégia de observação contínua, aliada à experimentação empírica e à constante reformulação das abordagens, tem se mostrado fundamental para o avanço do projeto. Ao observar, investigar e adaptar metodologias para a micropropagação de uma espécie ainda pouco estudada, este projeto contribui diretamente para o desenvolvimento de tecnologias aplicadas não só à produção bioenergética no Cerrado brasileiro mas também à valorização da biodiversidade nativa.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Abubakar, A.; Ishak, M. Y.; Makmom, A. A. **Impacts of and Adaptation to Climate Change on the Oil Palm in Malaysia: A Systematic Review**. Environ. Sci. Pollut. Res. 2021, 28 (39), 54339–54361. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15890-3>.
- (2) Song, X.-P.; Hansen, M. C.; Potapov, P.; Adusei, B.; Pickering, J.; Adami, M.; Lima, A.; Zalles, V.; Stehman, S. V.; Di Bella, C. M.; Conde, M. C.; Copati, E. J.; Fernandes, L. B.; Hernandez-Serna, A.; Jantz, S. M.; Pickens, A. H.; Turubanova, S.; Tyukavina, A. **Massive Soybean Expansion in South America since 2000 and Implications for Conservation**. Nat. Sustain. 2021, 4 (9), 784–792. <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00729-z>.
- (3) Leite-Filho, A. T.; Soares-Filho, B. S.; de Oliveira, U. **Climate Risks to Soy-Maize Double-Cropping Due to Amazon Deforestation**. Int. J. Climatol. 2024, 44 (4), 1245–1261. <https://doi.org/10.1002/joc.8381>.
- (4) Faria, G. D. **CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DA PLANTA, FRUTO, SEMENTE E PLÂNTULA DE MACAÚBA [Acrocomia aculeata (Jacq Lodd. ex Martius)]**. 2012.
- (5) Colombo, C. A.; Berton, L. H. C.; Diaz, B. G.; Ferrari, R. A. **Macauba: A Promising Tropical Palm for the Production of Vegetable Oil**. OCL 2018, 25 (1), D108. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017038>.
- (6) Malaquias, J. V.; Conceição, L. D. H. C. S. D.; Braga, M. F.; Junqueira, N. T. V. **Macauba Production Estimated by Regression Models**. Científica 2019, 47 (4), 419. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2019v47n4p419-425>.
- (7) MUDANÇAS CLIMÁTICAS | **Pesquisadores estudam agave para uso na geração de bioenergia** | SANEAMENTOAMBIENTAL.COM.BR. Saneamento Ambiental. <https://www.saneamentoambiental.com.br/noticias/pesquisadores-estudam-agave-para-uso-na-geracao-de-bioenergia> (accessed 2025-02-18).
- (8) Carvalho, F. D. M. **Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. E A.totai Mart.**
- (9) Lévi-Strauss, C. **The Use of Wild Plants in Tropical South America**. Econ. Bot. 1952, 6 (3), 252–270. <https://doi.org/10.1007/BF02985068>.
- (10) Souza, J. N. e; Mazzottini-dos-Santos, H. C.; Dias, D. S.; Lopes, P. S. N.; Ribeiro, L. M. **Seasonality and the Control of Longevity and Dormancy in Macaúba Palm Diaspores**. Ind. Crops Prod. 2022, 177, 114475. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114475>.
- (11) Zuzarte, M.; Salgueiro, L.; Canhoto, J. **Plant Tissue Culture: Industrial Relevance and Future Directions**. In *Plants as Factories for Bioproduction*; Springer, Cham, 2024; pp 1–15. https://doi.org/10.1007/10_2024_254.
- (12) Thorpe, T. A. **History of Plant Tissue Culture**. Mol. Biotechnol. 2007, 37 (2), 169–180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>.
- (13) Picoli, E. A. T. **PROPAGAÇÃO CLONAL DA PALMEIRA MACAÚBA (Acrocomia aculeata (Jacq.) Lood. ex Mart.) VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS**.
- (14) Tomlinson, P. B.; Horn, J. W.; Fisher, J. B. **The Anatomy of Palms: Arecaceae - Palmae**; Oxford biology; Oxford University Press: Oxford, 2015. <https://doi.org/10.1093/acprof:osobl/9780199558926.001.0001>.
- (15) **Fatores Inerentes à Micropropagação**. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/276578/1/DOC148.pdf> (accessed 2025-03-29).
- (16) Davis, A. C. S. **INDUÇÃO DA ORGANOGÊNESE A PARTIR DE SEGMENTOS DE EPICÓTILO DE JACARANDÁ-DA-BAHIA**.
- (17) Davey, M. R.; Anthony, P. **Plant Cell Culture: Essential Methods**.
- (18) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. <https://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00064610.pdf> (accessed 2025-03-31).
- (19) **Glossário de Biotecnologia Vegetal**.