

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

BIANCA GOMES BATISTA MUÑOZ

**MELHORAMENTO GENÉTICO DE PALMEIRAS: VALIDAÇÃO
METODOLÓGICA DE TÉCNICAS DE DESCONTAMINAÇÃO EM CULTURAS
DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE
MORFOGENÉTICA SOB EFEITO DE INDUTORES AUXÍNICOS**

**ALEGRE - ES
2023**

BIANCA GOMES BATISTA MUÑOZ

**MELHORAMENTO GENÉTICO DE PALMEIRAS: VALIDAÇÃO
METODOLÓGICA DE TÉCNICAS DE DESCONTAMINAÇÃO EM CULTURAS
DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE
MORFOGENÉTICA SOB EFEITO DE INDUTORES AUXÍNICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

Coorientadores: Prof. Dr. José Carlos Lopes

Dra. Tamyris de Mello

ALEGRE – ES
2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

G633
m
Gomes Batista Muñoz, Bianca, 1994-
MELHORAMENTO GENÉTICO DE PALMEIRAS:
VALIDAÇÃO METODOLÓGICA DE TÉCNICAS DE
DESCONTAMINAÇÃO EM CULTURAS DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE
MORFOGENÉTICA SOB EFEITO DE INDUTORES
AUXÍNICOS / Bianca Gomes Batista Muñoz. - 2023.
54 f. : il.

Orientador: Rodrigo Ssobreira Alexandre.
Coorientadores: José Carlos Lopes, Tamyris de Mello.
Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramentos) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. Melhoramento genético. 2. Tecidos vegetais - Cultura e meio de cultura. 3. Esterilização. 4. Plantas - Propagação. 5. Embriogênese. I. Ssobreira Alexandre, Rodrigo. II. Carlos Lopes, José. III. de Mello, Tamyris. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 631.523


**MELHORAMENTO GENÉTICO DE PALMEIRAS: VALIDAÇÃO
METODOLÓGICA DE TÉCNICAS DE DESCONTAMINAÇÃO EM CULTURAS
DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE
MORFOGENÉTICA SOB EFEITO DE INDUTORES AUXÍNICOS**

BIANCA GOMES BATISTA MUÑOZ


Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 28 de Julho de 2023


COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO SOBREIRA ALEXANDRE**
Data: 31/08/2023 09:12:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre (Orientador)
Universidade Federal do Espírito Santo

Documento assinado digitalmente
 **ADESIO FERREIRA**
Data: 04/09/2023 07:45:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Adésio Ferreira (Examinador interno)
Universidade Federal do Espírito Santo

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANO BESTETE OLIVEIRA**
Data: 04/09/2023 09:14:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Luciano Bestete Oliveira (Examinador externo)
Instituto Federal do Espírito Santo

*Dedico este trabalho a Deus,
fonte de amor e sabedoria
divina; e ao meu esposo Carlos
Alejandro meu companheiro de
jornada.*

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiro a Deus pela vida e oportunidade de trilhar esse longo caminho que foi repleto de desafios, nessa jornada, Deus foi fonte de amor e sabedoria divina, agradeço por guiar meus passos e iluminar meu caminho com sua presença constante.

Ao meu esposo Carlos Alejandro, meu companheiro de jornada, dedico esse trabalho e todo o meu amor e gratidão por ser o meu porto seguro e a razão de tantas alegrias em minha vida. Te amo infinitamente.

Aos meus familiares e amigos por terem me dado suporte nos momentos de adversidades, nos desafios que surgiram, pude contar com o ombro amigo de cada um, com palavras de conforto, gestos de solidariedade que aqueceram meu coração. Vocês foram luz em meio à escuridão, verdadeiros pilares que me sustentaram e fortaleceram minha fé na superação.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr Rodrigo Sobreira Alexandre, agradeço por ter sido um farol em minha jornada acadêmica, sempre presente com seu apoio, compreensão e humanidade. Sua dedicação e persistência em me ajudar a superar desafios foram fundamentais para o meu crescimento e aprendizado. Você não apenas me ensinou conhecimentos profissionais, mas também mostrou um exemplo de bondade e empatia. Mesmo diante das dificuldades, você nunca desistiu de mim, acreditou em meu potencial e me incentivou a seguir em frente.

À minha querida coorientadora Dra. Tamyris de Mello, sou profundamente grata por sua generosidade em compartilhar seu tempo e conhecimento comigo. Seu compromisso com o meu desenvolvimento como pesquisadora é um verdadeiro exemplo de dedicação e profissionalismo.

Às talentosas Calorine Palacio, Débora Pellanda, Ingridh Medeiros, Joana Silva e Mariana Ribeiro, quero expressar minha profunda gratidão por terem sido peças fundamentais no desenvolvimento deste projeto. Sem o comprometimento, dedicação e talento de vocês, essa conquista não seria possível. Através de desafios e momentos de superação, nossa equipe se fortaleceu e aprendemos juntos a enfrentar obstáculos com coragem e determinação. O trabalho em conjunto foi uma experiência enriquecedora e inspiradora.

A Universidade Federal do Espírito Santo – UFES e ao programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realizar o mestrado.

A FAPES e CNPq pelo financiamento do trabalho e a CAPES pela concessão de bolsa.

GRATIDÃO!

Sumário

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Métodos de descontaminação.....	12
2.2 Descontaminação por radiação UV.....	13
2.3 Descontaminação de materiais reutilizados.....	14
2.4 Meio de Cultura.....	15
2.5 Palmeiras do gênero <i>Euterpe</i>	16
2.5.1 <i>Euterpe edulis Martius</i>	16
2.5.2 <i>Euterpe edulis Martius</i> ecótipo Santa Marta.....	17
2.5.3 <i>Euterpe oleracea Martius</i>	19
2.6 Embriogênese somática no gênero <i>Euterpe</i>	20
3. OBJETIVO.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	46

RESUMO

MUÑOZ, Bianca Gomes Batista. **Melhoramento genético de palmeiras: Validação metodológica de técnicas de descontaminação em culturas de embriões zigóticos e sua Influência na atividade morfogenética sob efeito de indutores auxínicos**, 2023. Dissertação (Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre. Coorientadores: José Carlos Lopes e Tamyris de Mello.

As condições assépticas são necessárias para evitar as contaminações que ocorrem *in vitro*, sejam estas nas instrumentações, recipientes e meios de culturas puras, para isso são utilizados agentes desinfetantes químicos e físicos na eliminação dos microrganismos. As placas de Petri de polietileno são descartáveis que geram resíduos sólidos e, conseqüentemente, lixo. Portanto, é necessário criar protocolos eficazes para descontaminação desse material, visando a reutilização e diminuição de resíduos. Os meios de cultura normalmente são esterilizados com o uso de autoclavagens, entretanto, determinados reguladores de crescimento (RC), do grupo das auxínicas, degradam na presença de altas temperaturas, o que gera uma dúvida sobre a estabilidade química dos demais RC pertencente a este grupo. Objetivou-se com esse trabalho criar métodos de esterilização de placas de Petri de polietileno e meio de cultura com diferentes indutores auxínicos, tendo como plantas teste embriões zigóticos das palmeiras *Euterpe edulis*, *Euterpe edulis* ecótipo Santa Marta e *Euterpe oleracea*. O experimento 1, foi conduzido em um fatorial 4x4 (Hipoclorito de sódio (NaOCl): 0; 6; 12; 24h x Luz ultravioleta (UV): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 h), com quatro repetições de 10 placas cada. O experimento 2, foi conduzido com três tratamentos de luz UV (4; 6; 10 h), com quatro repetições de oito placas cada. O experimento 3, foi conduzido em um fatorial 2x5 (Dicloroisosianurato de sódio (NaDCC): 0; 24 h x UV: 6; 12; 18; 24; 36 h), com quatro repetições de oito placas cada. O experimento 4, foi conduzido em um fatorial 2x3 (MS: sem autoclavar; autoclavado x Distância da luz UV: 10; 30; 50 cm), com quatro repetições de cinco placas cada. O experimento 5, foi conduzido com cinco tratamentos de luz UV (1; 2; 3; 4; 5 h), com quatro repetições de oito placas cada. O experimento 6, foi conduzido em um fatorial

3x4 (palmeiras: *Euterpe edulis*; *Euterpe edulis* ecótipo Santa Marta; *Euterpe oleracea* x picloram filtrado; triclopir filtrado; picloram autoclavado; triclopir autoclavado). A combinação de NaDCC (24 horas) e UV (3 horas) de exposição são ideais para alcançar uma eficaz eliminação de microrganismos em placas de Petri descartáveis. O uso de placas de Petri desinfestadas com NaDCC (1%) por 24 horas, contendo meio autoclavado e não autoclavado mostraram que a distância de 50 cm resultou em ausência ou baixa taxa de contaminações. O protocolo de esterilização do meio de cultura e das placas de Petri usando NaDCC e luz UV resultou em ausência ou baixa incidência de contaminações. As espécies demonstraram comportamentos distintos sob influência das mesmas concentrações de reguladores de crescimento, o estudo revelou que o *E. edulis* e *E. edulis* ecótipo Santa Marta apresentou uma maior responsividade à indução de embriogênese somática em comparação com a espécie *E. oleracea*.

ABSTRACT

MUÑOZ, Bianca Gomes Batista. **Genetic Improvement of palm trees: Methodological validation of decontamination techniques in cultures of zygotic embryos and their influence on morphogenetic activity under the effect of auxin inducers**, 2023. Dissertation (Genetics and Breeding). Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES, Brazil. Advisor: Rodrigo Sobreira Alexandre. Co-advisors: José Carlos Lopes and Tamyrís de Mello.

Aseptic conditions are necessary to prevent contaminations that occur in vitro, whether in instruments, containers, or pure culture media. For this purpose, chemical and physical disinfectant agents are used to eliminate microorganisms. Polyethylene Petri dishes are disposable, generating solid waste and, consequently, trash. Therefore, it is necessary to create effective protocols for decontaminating this material, aiming at reuse and waste reduction. Culture media are typically sterilized using autoclaving. However, certain growth regulators (GR) from the auxin group degrade in the presence of high temperatures, raising doubts about the chemical stability of other GR belonging to this group. The objective of this work was to create sterilization methods for polyethylene Petri dishes and culture media with different auxin inducers, using zygotic embryos from the palm trees *Euterpe edulis*, *Euterpe edulis* Santa Marta ecotype, and *Euterpe oleracea* as test plants. Experimento 1 was conducted in a 4x4 factorial design (Sodium hypochlorite (NaOCl): 0, 6, 12, 24 hours x Ultraviolet light (UV): 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 hours), with four replicates of 10 Petri dishes each. Experiment 2 was carried out with three UV light treatments (4, 6, 10 hours), with four replicates of eight Petri dishes each. Experiment 3 was conducted in a 2x5 factorial design (Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC): 0, 24 hours x UV: 6, 12, 18, 24, 36 hours), with four replicates of eight Petri dishes each. Experiment 4 was conducted in a 2x3 factorial design (MS: non-autoclaved, autoclaved x UV light distance: 10, 30, 50 cm), with four replicates of five Petri dishes each. Experiment 5 was carried out with five UV light treatments (1, 2, 3, 4, 5 hours), with four replicates of eight Petri dishes each. Experiment 6 was conducted in a 3x4 factorial design (Palms: *Euterpe edulis*; *Euterpe edulis* Santa Marta ecotype; *Euterpe oleracea* x filtered picloram; filtered triclopyr; autoclaved picloram; autoclaved triclopyr). The combination of NaDCC (24 hours) and UV (3 hours) exposure is ideal for achieving effective elimination of microorganisms in disposable Petri dishes.

The combination of NaDCC (24 hours) and UV (3 hours) exposure is ideal for achieving effective elimination of microorganisms in disposable Petri dishes. The use of Petri dishes disinfected with NaDCC (1%) for 24 hours, containing both autoclaved and non-autoclaved medium, showed that a distance of 50 cm resulted in absence or low rates of contaminations. The sterilization protocol for culture media and Petri dishes using NaDCC and UV light resulted in the absence or low incidence of contaminations. The species exhibited different behaviors under the influence of the same concentrations of growth regulators; the study revealed that *E. edulis* and *E. edulis* Santa Marta ecotype showed a higher responsiveness to somatic embryogenesis induction compared to the species *E. oleracea*.

1. INTRODUÇÃO

As condições assépticas são necessárias para evitar a contaminação de objetos esterilizados e de culturas *in vitro*, para isso são utilizados agentes químicos e físicos desinfestantes para eliminar os microrganismos.

A contaminação está presente no ar, superfícies e em quaisquer objetos não esterilizados, dessa forma, para obter-se um meio de cultivo asséptico existem inúmeros processos que são utilizadas para prevenir a contaminação. As placas de Petri de polietileno são descartáveis, que geram resíduos sólidos e contribuem na geração de lixo. Portanto, é necessário criar protocolos eficazes para descontaminação desse material, visando a reutilização e diminuição desses resíduos.

A descontaminação para eliminação de microrganismos pode ser obtida através de reagentes químicos (álcool, hipocloritos, fungicidas, bactericidas, peróxido de hidrogênio, cloreto de mercúrio etc.) ou físicos (calor, pressão, luz ultravioleta etc.) (MURACA,1987). A câmara de fluxo laminar é um equipamento utilizado na prevenção de contaminação. Feita de material não poroso, com superfície de metal e vidros nas laterais, e até mesmo inclinada para frente. Na parte interna pode ser instalada lâmpadas de luz ultravioleta (UV), utilizadas para minimizar a contaminação.

A esterilização visa a eliminação total de microrganismos, quando realizada utilizando radiação, tem o princípio do aproveitamento da energia emitida na forma de radiação eletromagnética (EISBERG; RESNICK, 1979). Utiliza-se lâmpadas padronizadas em equipamentos de desinfestação por radiação com comprimentos de ondas de 254 nm. Tais comprimentos, age de forma eficiente por emitir ondas eletromagnéticas que coincidem com os comprimentos de onda de máxima absorbância do DNA, esse método de esterilização é denominado de irradiação germicida ultravioleta – UVGI (CHATTERLEY; LINDEN, 2010).

Leveduras foram submetidas a ação de radiação não-ionizante, luz UV por 15 minutos, de modo que isolados de *Cryptococcus gattii* e cepa de *Candida albicans* tiveram seu crescimento inibido, contudo, quando *Rhodotorula* sp. foi exposta a radiação UV não houve inibição total, mostrando

assim que é necessário mais estudo para outros microrganismos (SILVA et al., 2017).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Métodos de descontaminação

A eliminação de microrganismos pode ser obtida através de meios químicos (álcool, hipoclorito de sódio) ou físicos (calor, luz ultravioleta). O etanol (70-95%) e o hipoclorito de sódio (10%), são utilizados na desinfestação de vidrarias e instrumentos. Os instrumentos são mergulhados no álcool 70% e flambados no fogo com lamparina.

O álcool é muito utilizado nos processos de descontaminação, em que o etanol (álcool etílico) é utilizado com maior frequência. A concentração de 70% é a mais recomendada para eliminar os microrganismos, por ser mais hidratado, o que confere uma maior absorção do produto.

O efeito do etanol para desnaturação e rompimento da membrana plasmática requer água (etanol misturado com água), por esse motivo o etanol puro não é tão eficaz na descontaminação (ANDRADE et al., 2007; TORTORA et al., 2017; ARAUJO et al., 2019). O álcool reage quebrando a tensão superficial da célula para que o hipoclorito penetre na célula e a ação germicida seja eficiente. Zito et al. (1995) verificaram que, na esterilização superficial de sementes de soja a solução alcoólica seguida da lavagem em água mostrou-se eficaz, isso pode ser devido ao fato que o efeito desse tratamento tenha reagido na retirada de esporos ou micélios que estavam aderidos ao tegumento da semente.

O cloro em sua forma mais efetiva germicida conhecida é o ácido hipocloroso (HOCl) que se dissocia em OCl^- e H^+ , isso ocorre devido o valor do pH ser menor ou igual a 5,0. Quanto menor o pH da solução, maior efeito desinfetante do cloro. O efeito bactericida do cloro é resultado da reação química que ocorre entre o ácido hipocloroso (HOCl) e a estrutura celular da bactéria, o que leva a inativação dos processos essenciais à vida. O cloro reage nos microorganismos em suas enzimas e inativa-as (ZITO et al., 1995).

O dicloroisocianurato de sódio, também conhecido como dicloro-s-triazinatriona de sódio ou NaDCC (do inglês, sodium dichloroisocyanurate), é

um composto químico amplamente utilizado como desinfetante de água, e agente de saneamento. É eficaz contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos, tornando-o uma opção popular em aplicações de limpeza e desinfecção. Em estudo realizado utilizando dicloroisocianurato de sódio, mostrou que esse sanitizante foi o mais eficaz, recomendado a uma concentração de 25 mg L⁻¹ para uso na água de resfriamento e lavagem de maçãs, com o objetivo de destruir esporos de *P. expansum* e reduzir o risco de produção de patulina no produto final (SALOMÃO,2011).

A luz ultravioleta (UV) é utilizada de forma ampla na descontaminação de materiais em laboratório, por possuir ação germicida. A radiação promove alterações fotobioquímicas que acarretam a morte dos microrganismos (SERRA et al., 2017). A luz ultravioleta é considerada um processo físico de esterilização (PIGATTO, 2008). O Comitê Internacional de Iluminação (“Commission Internacional de l’Eclairage”), classifica os tipos de irradiação por incidência ultravioleta em UV-A (400-320 nm), UV-B (320-280 nm) e UV-C (280-200 nm) (GUERRERO-BELTRÁN; BARBOSA-CÁNOVAS, 2004). A irradiação ultravioleta reage com radicais hidroxilas induzindo a geração de elétrons na superfície dos fotocatalisadores (ZHAO; YANG, 2003).

2.2 Descontaminação por radiação UV

Quando expostas a radiação UV as purinas e pirimidinas, constituintes dos nucleotídeos, podem sofrer alterações espontâneas estruturais nas ligações covalente, essas alterações podem apresentar velocidade reduzida, no entanto são fisiologicamente significantes, pois são pouco tolerantes para alterações no DNA. Quando o DNA sofre alguma alteração estrutural, isso pode acarretar alterações permanentes na informação genética codificada, o que pode ser transferidas aos descendentes, essas alterações são denominadas mutações (NELSON; COX, 2002; BATISTA, 2008).

Quando utilizada com intensidade e período de exposição suficiente, quando aplicada para esterilizar superfícies e equipamentos, a luz ultravioleta possui ação microbiocida. Os comprimentos de ondas eficiente estão na faixa de 210 a 330 nm por serem capazes de ser absorvidas por proteínas e ácidos

nucléicos, o que promove o rompimento de cromossomos, mutações genéticas e a inativação de enzimas, acarretando a morte celular (BATISTA, 2009; SILVA, 2018). A luz ultravioleta é uma forma rápida, efetiva e econômica na esterilização de equipamentos e superfícies. Além disso, a utilização da luz ultravioleta combinado com desinfetantes químicos se apresenta como efeito sinérgico no combate de microrganismos (ABREU; FARIA, 2004).

2.3 Descontaminação de materiais reutilizados

O Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, exige que o ambiente e materiais utilizados sejam livres de contaminação por microrganismos, dessa forma as vidrarias, instrumentações e superfície estejam livres de contaminação, afim de que as culturas microbiológicas não se estabeleçam e crie o risco de contaminar as culturas vegetais estabelecidas.

As placas de Petri de polietileno são estéreis logo após sua fabricação, são consideradas descartáveis, pois são facilmente recontaminadas após a utilização, isso ocorre pela deposição de partículas e microrganismos presentes no ar. O descarte dessas placas de polietileno gera resíduos sólidos, o que contribui com a geração de lixo, tendo em vista, é necessário criar protocolos eficazes para descontaminação desse material visando a reutilização e diminuição desses resíduos.

Existem diversas formas comprovadas para esterilização do ambiente e de superfícies, dentre essas tem-se a utilização de agente químicos e físicos ou a combinação de ambos (SEQUINEL et al., 2020). Pesquisas realizadas por Abreu e Faria (2004) comprovaram que o índice de esterilização obtido vai depender do nível de contaminação, área da embalagem e da eficiência no processo de descontaminação.

A utilização da radiação ultravioleta tem sido cada vez mais frequente no tratamento e controle de microrganismos em hospitais e Laboratórios de Culturas de Tecidos Vegetais, especialmente em resposta à pandemia da COVID-19 (LONGHINI et al., 2022). No entanto, é importante ressaltar que o efeito microbicida proporcionado pela luz ultravioleta só se mostra eficaz quando aplicado corretamente, ou seja, seguindo as recomendações

adequadas de duração e distância de aplicação (ALEXANDE; FARIA; CARDOSO, 2008).

2.4 Meio de Cultura

O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é uma formulação de meio de cultura amplamente utilizada em pesquisas e experimentos de cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*. Foi desenvolvido por Murashige e Skoog em 1962 e se tornou uma das formulações padrão mais populares para o crescimento de plantas em laboratório.

O meio MS é composto por macro e micronutrientes, vitaminas, fontes de carbono e podem ser acrescidos de reguladores de crescimento, como auxinas e citocininas, que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de tecidos vegetais. Tem sido usado para micropropagação de mais espécies do que qualquer outro meio, ele é frequentemente utilizado para a germinação de sementes, o cultivo de plântulas, a proliferação de explantes e a indução de calos e raízes em cultura de tecidos vegetais (GEORGE et al., 2008; ADELBERG et al., 2010).

Quando se trata de meio MS autoclavado e não autoclavado, a principal diferença está na esterilização. O meio MS autoclavado é submetido a um processo de autoclavagem a alta temperatura e pressão para eliminar qualquer contaminação microbiana e garantir que o meio esteja estéril antes do uso. Por outro lado, o meio MS não autoclavado não passa por esse processo de esterilização e pode conter microrganismos que estavam originalmente presentes nos componentes do meio.

Dependendo do tempo de exposição à luz UV, é possível reduzir significativamente a contaminação microbiana presente no meio não autoclavado, tornando-o mais adequado para uso em culturas de tecidos vegetais, onde a contaminação pode prejudicar os resultados e comprometer a integridade das amostras.

No entanto, é importante realizar estudos e experimentos controlados para determinar o tempo de exposição ideal e garantir que a luz UV não afete negativamente os componentes essenciais do meio MS, como nutrientes e reguladores de crescimento. Além disso, é crucial seguir boas práticas de

esterilização e assegurar que os procedimentos sejam conduzidos em condições assépticas para evitar a contaminação durante o manuseio do meio.

Em resumo, o meio MS é uma formulação essencial para cultivo de tecidos vegetais. A exposição à luz UV pode ser uma abordagem para descontaminar o meio não autoclavado, mas deve ser cuidadosamente avaliada para garantir que não afete negativamente sua eficácia e que as condições de esterilização sejam rigorosamente seguidas para evitar a contaminação cruzada.

2.5 Palmeiras do gênero *Euterpe*

2.5.1 *Euterpe edulis Martius*

Euterpe edulis Martius é uma espécie de palmeira pertencente à família Arecaceae, popularmente conhecida como juçara, encontrada na Floresta Atlântica (GUERGOLETTO et al., 2016), abrangendo regiões dos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (LORENZI, 2006; GUIMARAES et al., 2017).

A juçara é uma palmeira de médio porte, que pode atingir cerca de 10 a 15 metros de altura. Suas folhas são longas e arqueadas, formando uma coroa densa na parte superior do tronco. Os frutos da juçara são pequenos, arredondados e de cor negro-arroxeadado quando maduros. Eles são agrupados em cachos que podem conter dezenas de frutos (FISCH et al., 2000; BICUDO et al., 2014).

Essa espécie é muito importante na Floresta Atlântica como uma planta chave, desempenhando um papel ecológico significativo na manutenção da biodiversidade. Os frutos da juçara são fonte de alimento para várias espécies de animais (SILVA, 2011).

Essa espécie possui muito valor econômico, pois o palmito que é extraído dele, é um dos alimentos consumidos, sendo um dos produtos mais exportado da Floresta Atlântica (BARROSO et al., 2019).

Além disso, a juçara possui frutos que são utilizados na culinária brasileira, na produção de geleias, sucos, licores e até mesmo sorvetes. A polpa dos frutos é rica em antioxidantes e nutrientes, como vitamina A, vitamina C e ferro (SANTOS, 2012).

No entanto, a juçara enfrenta ameaças significativas devido à exploração descontrolada de suas palmeiras para a extração do palmito, uma iguaria culinária muito apreciada. A extração ilegal de palmito tem causado a diminuição da população de juçaras, levando a espécie ao risco de extinção em algumas áreas (BRASIL, 2008, BRASIL, 2014; SCHULZ et al., 2016).

Para a conservação da espécie, diversas ações vêm sendo realizadas, incluindo a criação de áreas protegidas, o cultivo sustentável de juçaras em sistemas agroflorestais e a conscientização sobre a importância da preservação da Floresta Atlântica. Esses esforços são essenciais para garantir a sobrevivência dessa palmeira e a manutenção do ecossistema em que ela está inserida (GUIMARÃES; SOUZA, 2017; CONAB, 2020).

Outra ação que recompôs a vulnerabilidade da juçara é o uso do fruto para fins comerciais, durante o pico de safra, que ocorre entre setembro e outubro, os preços ultrapassaram a marca de R\$ 3,00 por quilo, sendo um dos valores mais elevados já registrados segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (CONAB, 2022).

2.5.2 *Euterpe edulis* Martius ecótipo Santa Marta

O surgimento de um ecótipo de *Euterpe edulis* Martius, também conhecida como palmito-juçara ou palmito-doce, pode ser resultado de um processo de adaptação genética e ambiental que ocorre naturalmente ao longo do tempo. Ecótipos são subpopulações de uma mesma espécie que se diferenciam em características morfológicas, fisiológicas e/ou genéticas em resposta a condições ambientais específicas em diferentes regiões geográficas.

No caso da *Euterpe edulis*, esse fenômeno pode acontecer devido à sua ampla distribuição geográfica em diferentes ecossistemas, como a Floresta Atlântica (PEREIRA, 2018; PEREIRA, 2019). À medida que indivíduos dessa espécie se dispersam e colonizam novas áreas, eles podem se deparar com variações climáticas, disponibilidade de recursos e pressões seletivas únicas. Esses fatores podem acarretar mudanças genéticas, resultando na adaptação de certos grupos de indivíduos a condições específicas de habitat.

Essa adaptação pode se manifestar de várias formas, como diferenças na altura das palmeiras, no tamanho das folhas, na resistência a pragas ou doenças, ou na capacidade de tolerar diferentes níveis de luz, umidade e temperatura. Essas características adaptativas são passadas para as gerações seguintes por meio da reprodução e hereditariedade.

Os ecótipos consistem em agrupamentos de táxons (ou unidades taxonômicas) onde as relações evolutivas são investigadas no contexto da diversidade genética, são importantes para a conservação da biodiversidade, pois representam a capacidade intrínseca das espécies de se adaptarem a ambientes variados. Em certos casos, essas subpopulações adaptadas podem ser cruciais para a sobrevivência da espécie em face das mudanças ambientais e das pressões humanas (CRUZ, 2011).

No entanto, é essencial monitorar e preservar a diversidade genética dos ecótipos, especialmente em espécies ameaçadas, como a *Euterpe edulis*, que é considerada vulnerável devido à degradação do seu habitat natural e à exploração descontrolada do palmito. Através do estudo e preservação dessas variações adaptativas, podemos melhor compreender a ecologia da espécie e contribuir para sua conservação a longo prazo. Trabalho realizado por Senra, (2017) demonstrou que as marcantes disparidades observadas resultam da presença de variabilidade genética nas populações da palmeira juçara.

Estudos elaborados por Carvalho (2015) realizaram análises de variância molecular (AMOVA) para avaliar a diferenciação das populações em dois e três níveis hierárquicos, considerando 20 populações. Além disso, foram calculadas AMOVAs adicionais, considerando as sub-regiões Sul e Caparaó como grupos distintos. A AMOVA indicou que tanto a sub-região Caparaó quanto a Sul apresentaram alta variação dentro das populações (82,16% e 74,93%, respectivamente). Porém, a maior variação entre as populações foi observada na sub-região Sul (25,0%), que possui seis populações, enquanto a sub-região Caparaó, com 14 populações, apresentou 17,84% da variação interpopulacional.

Pela primeira vez na literatura é relatado a descoberta do novo ecótipo denominado "*Euterpe edulis* Martius ecótipo Santa Marta". Esta revelação é um marco histórico na pesquisa botânica, pois é a primeira vez que tal variante da espécie é identificada e documentada.

A *Euterpe edulis* Martius ecótipo Santa Marta se destaca por suas características únicas, que o distinguem de outros ecótipos conhecidos da espécie. Suas folhas, frutos ou flores podem apresentar padrões, tamanhos ou cores específicas, ainda não descritas na literatura científica. Além disso, suas adaptações ao ambiente local podem revelar segredos sobre como as plantas respondem às condições únicas encontradas na região de Santa Marta.

2.5.3 *Euterpe oleracea* Martius

A *Euterpe oleracea* Martius, conhecida popularmente como açaí, trata-se de uma palmeira que pode alcançar até 25 metros de altura, com um tronco fino e reto, o açaí produz frutos arredondados de cor roxa ou preta, de aproximadamente 1 cm de diâmetro (FURLANETO et al., 2020).

A polpa do açaí é macia e suculenta, apresentando um sabor característico que é descrito como uma mistura de frutas vermelhas com notas de chocolate. A fruta é rica em compostos bioativos, como antocianinas, flavonoides e ácidos graxos ômega-3, conferindo-lhe propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (SANTOS et al., 2012).

As polpas de açaí são amplamente consumidas pela população brasileira, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país. Recentemente, a demanda por essa fruta aumentou significativamente tanto no mercado nacional quanto internacional, despertando o interesse de investidores e pesquisadores (YAMAGUCHI et al., 2015). Essa tendência se deve principalmente à elevada capacidade antioxidante do açaí, resultante de seu teor elevado de antocianinas e tocoferóis (BICHARA; ROGEZ, 2011).

No açaí, os polifenóis são os principais constituintes químicos, destacando-se especialmente as antocianinas e os flavonoides (PACHECO-PALENCIA et al., 2009). A presença desses polifenóis no açaí justifica sua classificação como um alimento funcional, conhecido por auxiliar na prevenção de diversas doenças degenerativas (PACHECO-PALENCIA; TALCOTT, 2010; YUYAMA et al., 2011).

O consumo da polpa do açaí era uma parte significativa da dieta dos povos da Amazônia (OLIVEIRA; SCHWARTZ, 2018). No entanto, recentemente, a palmeira do açaí tem atraído interesse econômico e científico

devido à presença de diversos compostos bioativos no pericarpo do fruto. As sementes do açaí são o principal subproduto após a extração da polpa e demonstram potencial para uso na produção de etanol (PEREIRA et al., 2021).

Em 2021, a produção brasileira de açaí ultrapassou 1 milhão de toneladas (BRASIL, 2021). O açaí amazônico é obtido de uma palmeira nativa da região, com 92,1% de sua extração concentrada nos estados da Região Norte. Em 2019, a produção atingiu a marca de 1,6 milhões de toneladas (CONAB, 2019).

Esse aumento da demanda está sendo suprido por novas plantações comerciais e produtores familiares independentes ao longo do estuário do rio Amazonas. Acredita-se que essa fruta se torne uma significativa fonte de renda para pequenos e grandes produtores.

2.6 Embriogênese somática no gênero *Euterpe*

Ao longo das últimas décadas, a embriogênese somática (ES) foi aprimorada com o objetivo de permitir a rápida multiplicação de diversas espécies vegetais. Essa técnica não se limitou apenas à pesquisa, mas também ganhou relevância no âmbito industrial. Nesse contexto, a ES desponta como uma das técnicas mais promissoras na cultura de tecidos vegetais, consistindo em um conjunto de etapas nas quais células somáticas se diferenciam em embriões (PINTO et al., 2011).

A ES é aplicada de várias maneiras, atuando como modelo em estudos de desenvolvimento embriogênico, contribuindo na formação de bancos de germoplasma por meio da criopreservação, permitindo a propagação clonal em larga escala e desempenhando um papel significativo na transformação genética (VON ARNOLD et al., 2002).

A utilização da ES é altamente apropriada para a investigação do mecanismo de diferenciação em plantas e a expressão da totipotência das células vegetais. Ele abrange abordagens diferenciais que analisam a competência celular, ou seja, a capacidade de reprogramação de uma célula em resposta a sinais específicos, por meio de processos de desdiferenciação e rediferenciação (Féher et al., 2003).

A família das palmeiras (Arecaceae), é uma das maiores no mundo, reconhecida por sua forma e aparência, é uma das marcas distintivas da flora tropical. As palmeiras são divididas em seis subfamílias, compreendendo 200 gêneros e cerca de 1500 espécies. O gênero *Euterpe* é composto por aproximadamente 28 espécies, sendo que as três mais frequentes são *E. oleracea*, *E. edulis* e *E. precatória*, somente três estão sob investigação para o desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática (GALOTTA; BOAVENTURA, 2005).

No estudo inicial envolvendo *E. oleracea*, foi constatada a expressão de um modelo de embriogênese somática direto, repetitivo e assíncrono em embriões zigóticos maduros cultivados em meio MS, os embriões somáticos foram suplementados com 339,36 μM de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e transferidos para meio MS contendo 0,537 μM de ácido 1-naftalenoacético (ANA) e 12,30 μM de 2-isopenteniladenina (2-iP). Após 210 dias da transferência das culturas para um terceiro meio, ocorreu a conversão desses embriões em plântulas. (LEDO et al., 2002).

Em estudos realizados foram obtidos calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos imaturos de *E. oleracea*. Esses embriões de *E. oleracea* foram cultivados em meio MS modificado, contendo 2,4-D e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012). A concentração ótima de picloram para induzir uma alta frequência de calos embriogênicos (72%) foi de 225 μM . Os calos embriogênicos foram subcultivados em um meio de diferenciação e maturação que consistia em meio MS modificado com 2-iP e ANA, realizando subculturas a cada quatro semanas. Posteriormente, os embriões somáticos foram transformados em plantas utilizando meio MS/2. Os embriões somáticos apresentaram assincronia, e estudos ontogenéticos confirmaram que as primeiras divisões celulares ocorrem nas regiões epidérmicas e subepidérmicas dos embriões zigóticos (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).

Em *E. precatória*, foram utilizados embriões zigóticos maduros como fonte de explantes, cultivados em meio MS ou Eeuwens (Y3) suplementado com 2,4-D ou picloram em diferentes concentrações (0, 6,79, 13,57, 20,36, 27,15 μM) (FERREIRA et al., 2022). Segundo estes autores, para a fase de multiplicação, foram utilizados 4,14 μM de 2,4-D ou picloram, combinados com

2,46 μM de 2-iP. Na histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos, utilizou-se meio Y3 com meia força, ou acrescido de 0,54 μM de ANA e 12,3 μM de 2-iP. Os resultados mais significativos foram alcançados utilizando o meio de cultura Y3 com a adição de 13,57 e 20,36 μM de picloram. Foram encontrados vários tipos de calos embriogênicos, bem como embriões somáticos com estruturas semelhantes ao suspensor, sugerindo uma origem unicelular, além de embriogênese secundária identificada.

A espécie *E. edulis* teve seu primeiro protocolo de embriogênese somática estabelecido por Guerra e Handro (1988), utilizando um método direto que envolveu altas concentrações de 2,4-D (50-100 mg L^{-1}) para observar a expressão. Os tecidos com aglomerados de embriões foram transferidos para meios contendo 2-iP (5 mg L^{-1}) e ANA (0,5 mg L^{-1}) ou sem reguladores de crescimento, resultando em desenvolvimento embrionário em plântulas.

Em um estudo recente, Oliveira et al. (2022) estabeleceram um novo protocolo de embriogênese somática para *E. edulis*, onde empregaram embriões zigóticos como explantes e avaliaram os efeitos de diferentes concentrações dos indutores 2,4-D e picloram (25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 275; 300 μM). Durante a etapa de maturação, foram utilizados 2-iP (12,3 μM), ANA (0,6 μM), polivinilpirrolidona (PVP) (1 g L^{-1}) e/ou carvão ativo (3 g L^{-1}).

Estes resultados evidenciam o potencial da embriogênese somática para estabelecer programas de conservação e melhoramento, uma vez que alcançaram a conversão completa em plântulas. No entanto, é importante desenvolver protocolos mais concisos e eficientes.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Objetivou-se com esse trabalho criar métodos de esterilização de placas de Petri de polietileno e meio de cultura com diferentes indutores auxínicos, tendo como objetivo melhoramento de palmeiras utilizando embriões zigóticos *Euterpe edulis*, *Euterpe edulis* ecótipo Santa Marta e *Euterpe oleracea*.

3.2 Objetivos específicos

- i) Investigar diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e dicloroisocianurato de sódio e tempo de exposição, na descontaminação de placas de polietileno;
- ii) Analisar diferentes tempos de exposição de placas de polietileno a luz ultravioleta;
- iii) Analisar a embriogênese somática das palmeiras *Euterpe edulis*, *Euterpe edulis* ecótipo Santa Marta e *Euterpe oleracea* em indutores auxínicos autoclavados e filtrados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais LCTV, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES). Foram utilizadas placas de Petri de polietileno 90 x 15 mm (Global Trade Technology, Brasil®) descartadas de experimentos anteriores.

Experimento 1 e 2: Diferentes tempos de exposição a hipoclorito de sódio e luz ultravioleta na descontaminação de placas de Petri de polietileno.

As placas de Petri descartáveis foram lavadas com água corrente e detergente neutro, e imersas em hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (Qboa®) por diferentes tempos (0; 6; 12; 24 h), seguidos de tríplice lavagem em água destilada (Figura 1). As placas de Petri descartáveis foram transferidas para a câmara de fluxo laminar com duas lâmpadas de irradiação ultravioleta 30W em diferentes tempos de exposição (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 h).

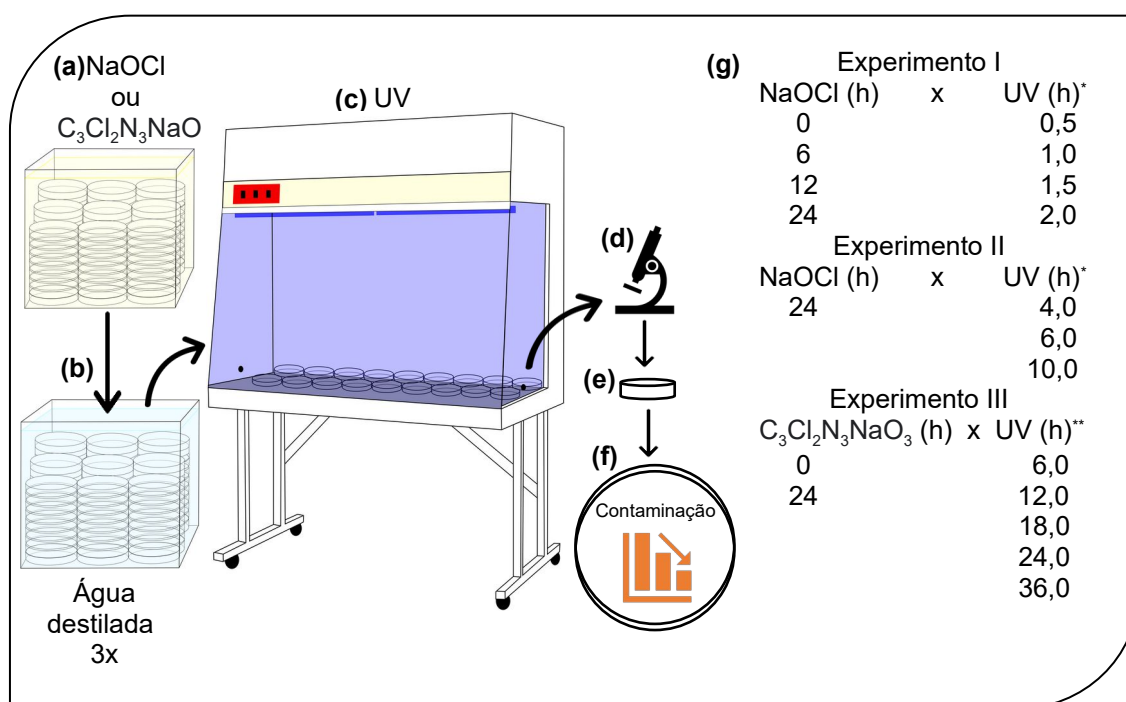


Figura 1. Ilustração do desenvolvimento metodológico para a desinfestação de placas de Petri e meio de cultivo em diferentes tempos de exposição à

hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl), dicloroisocianurato de sódio 0,42% ($C_3Cl_2N_3NaO_3$) e luz ultravioleta (UV). Legenda: *Duas lâmpadas UV e NaOCl e **Quatro lâmpadas UV e $C_3Cl_2N_3NaO_3$.

Após o primeiro experimento, as placas de Petri descartáveis desprovidas de contaminação foram lavadas com água corrente e detergente neutro, e imersas em hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (Qboa[®]) por 24 h, seguidos de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. As placas de Petri descartáveis foram transferidas para a câmara de fluxo laminar com duas lâmpadas de irradiação ultravioleta 30W em diferentes tempos de exposição (4, 6, 10 h).

Experimento 3: Diferentes tempos de exposição dicloroisocianurato de sódio aliado a luz ultravioleta na descontaminação de placas de Petri descartáveis.

As placas de Petri foram lavadas com água corrente e detergente neutro, e imersas em dicloroisocianurato de sódio 0,42% (Hidroazul[®]) em tempos de 0 e 24 h, seguidos de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. As placas de Petri descartáveis foram transferidas para a câmara de fluxo laminar com quatro lâmpadas de irradiação ultravioleta 30W em diferentes tempos de exposição (6, 12, 18, 24, 36 h).

Em todos os experimentos, nas placas de Petri descartáveis após tratamento de esterilização foram vertidos 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma[®]), suplementado com 1 g L⁻¹ polivinilpirrolidona (Synth[®]), 30 g L⁻¹ de sacarose (Dinâmica[®]), 0,1 g L⁻¹ de mioinositol (Sigma[®]), e 6 g L⁻¹ de ágar (Kasvi[®]). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ com hidróxido de potássio (KOH) (Alphatec[®]) e/ou ácido clorídrico (HCl) (Vetec[®]) a 1,0 N, antes da autoclavagem (Lufenco[®]). As placas de Petri descartáveis foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 8/16 horas, $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 21 dias.

Após 21 dias, determinou-se os melhores tratamentos de cada experimento analisando a porcentagem de contaminação e, em seguida foram introduzidos os embriões zigóticos para avaliação da viabilidade do meio de cultura nas placas de Petri descartáveis esterilizadas.

Experimento 4: Placas de Petri com meio autoclavado e não autoclavado expostas à luz UV em diferentes alturas.

As placas de Petri de polietileno descartáveis foram reutilizadas, na qual foram lavadas com água corrente e detergente neutro, e na sequência imersas em dicloroisocianurato de sódio 1% (Hidroazul®) por 24 h, seguidos de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Uma determinada quantidade de placas de Petri foram transferidas para a câmara de fluxo laminar, contendo meio de cultura sem autoclavar que foram expostas à quatro lâmpadas de irradiação ultravioleta 30W, em diferentes alturas (10, 30 e 50 cm), por 6h. Este procedimento, repetiu-se, em outra quantidade de placas de Petri, entretanto, com a exposição das placas de Petri a luz UV vazias e depois receberam meio de cultura autoclavado.

Experimento 5: Diferentes tempos de exposição à exposição a luz ultravioleta na descontaminação de placas de Petri descartáveis e meio de cultura.

As placas de Petri foram lavadas com água corrente e detergente neutro, e imersas em dicloroisocianurato de sódio 1% (Hidroazul®) por 24 h, seguidos de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. As placas de Petri descartáveis foram transferidas para a câmara de fluxo laminar com quatro lâmpadas de irradiação ultravioleta 30W em diferentes tempos de exposição a radiação UV (0, 1, 2, 3, 4, 5 h), com meio de cultura MS sem autoclavagem.

Experimento 6: Embriogênese somática das palmeiras açai, juçara e Santa Marta em meio de cultura suplementado com picloram e triclopir filtrado e autoclavado.

Para a validação metodológica de descontaminação com o uso de agentes desinfestantes líquidos e físicos, foi selecionado o melhor tratamento do experimento 5. Portanto, as placas de Petri foram lavadas com água corrente e detergente neutro, e imersas em dicloroisocianurato de sódio 1% (Hidroazul®) por 24 h, seguidos de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. As placas de Petri descartáveis foram transferidas para a câmara

de fluxo laminar com quatro lâmpadas de irradiação ultravioleta 30W em diferentes tempos de exposição à radiação UV por 3 h, com meio de cultura que consiste em sais MS suplementados com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de PVP e 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,7±0,1 antes da adição de ágar (5,5 g L⁻¹). No meio foi suplementado com picloram (4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinacarboxílico - Sigma®) filtrado ou autoclavado, em concentrações de 150 µM (MELLO et al., 2023). E meio MS sais MS suplementados com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de PVP e 30 g L⁻¹ de sacarose com o pH ajustado para 5,7±0,1 antes da adição de ágar (5,5 g L⁻¹), contendo triclopir filtrados ou autoclavados utilizando triclopir (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético – Sigma®) na concentração de 100 µM (MELLO, 2022).

Os embriões zigóticos foram extraídos das sementes imaturas de *E. edulis*, *E. edulis* ecótipo Santa Marta e *E. oleracea* e dispostos sobre o meio de cultura. O experimento foi mantido em sala de crescimento a 27 ± 2 °C no escuro, por 90 dias. E analisados: oxidação (%), calejamento (%), número de calo embriogênico, número de clusters, número de embriões.

Potencialidade celular

Porções de 50 mg de calo fresco de cada tratamento foram macerados com auxílio de bastão de vidro e adicionado três gotas de corante Azul de Evans 0,1%, o qual permaneceu em reação por cinco minutos. Após esse período, foi retirado o excesso de corante e adicionado três gotas de corante Carmim-acético 2%, o qual permaneceu em reação pelo mesmo tempo do anterior. Por fim, o excesso de corante foi retirado, e foi adicionado cinco gotas de glicerina e homogeneizado. A amostra foi distribuída sob a superfície da lâmina e analisada em microscopia de luz (DURZAN, 1988).

Análises

Foram feitas análises e as variáveis analisadas foram número de clusters, número de embriões, número de calos embriogênicos, porcentagem de calos embriogênicos. O delineamento utilizado foi o inteiramente

casualizado, os dados foram submetidos ao ANOVA e submetidos ao teste de média.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 e 2: *Diferentes tempos de exposição a hipoclorito de sódio e luz ultravioleta na descontaminação de placas de Petri de polietileno.*

A interação entre os fatores tempo de exposição ao NaOCl (h) e UV (h) foram significativos para a variável contaminação (%), obtendo-se uma relação positiva, pois à medida que aumenta os tempos de exposição de NaOCl e UV, diminui a porcentagem de contaminação. O ponto mínimo observado de contaminação foi de 27,5% no tratamento com 24 h de NaOCl, seguido de 1,5 h de UV (Figura 2).

Quanto a eficácia do NaOCl nessa pesquisa os resultados são semelhantes aos obtidos por Freire et al. (2017), onde a eficácia do NaOCl a 2,5% na descontaminação de cones de guta-percha (são materiais utilizados na odontologia endodôntica, especificamente em tratamentos de canal), contaminados com *Enterococcus faecalis* foi comprovada em apenas 15 segundos de exposição. Em contraste, os outros compostos utilizados na pesquisa mostraram eficácia em tempos maiores de exposição ou não foram eficazes.

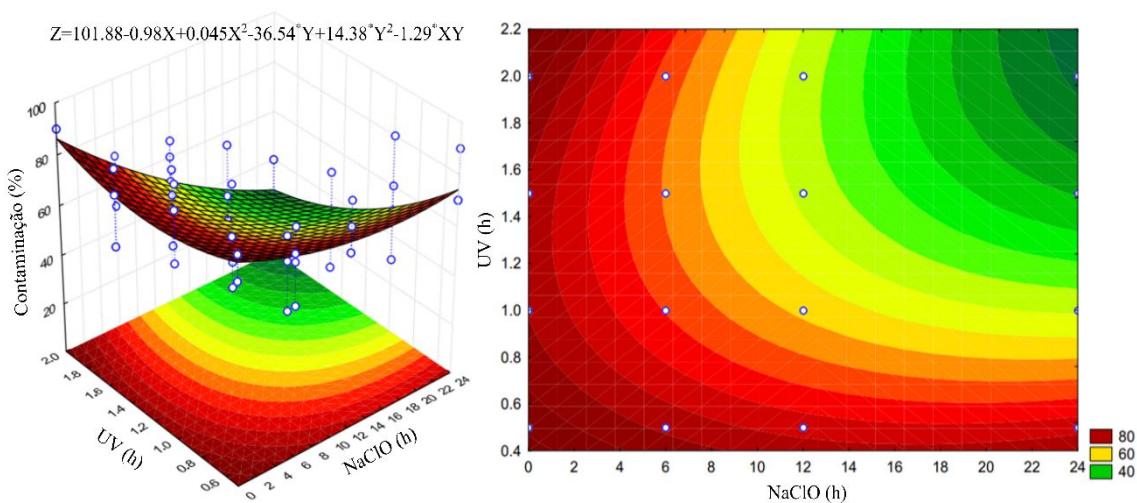


Figura 2. Superfície de resposta da porcentagem de contaminação de meio de cultura MS, em placas de Petri de polietileno reutilizada após tratamentos com

a combinação entre NaOCl (0; 6; 12; 24 h) e UV (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 h). * $p < 0.01$. Pontos em azul: dados observados.

As placas imersas em hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (Qboa[®]) por 24 h e que receberam irradiação ultravioleta 30W em tempos de exposição (4, 6, 10 h) apresentaram diferenças estatísticas. Sob irradiação de duas lâmpadas UV o tempo de exposição de 6h e 10h foram os que apresentaram as menores contaminações (Figura 3). Portanto, recomenda-se o uso de luz UV (6 h), pela economicidade de energia.

Resultados semelhantes foram obtidos por Mori et al. (2007), onde foi demonstrado que a descontaminação utilizando luz UV é eficaz. Eles constataram que a irradiação com um UVA-LED 365 nm por aproximadamente 30 minutos é capaz de esterilizar quase completamente, tanto bactérias patogênicas quanto não patogênicas. É difícil esterilizar instantaneamente com lâmpadas UV. Um esterilizador UVA-LED conseguiu eliminar totalmente as bactérias após certo período de exposição. Esse sistema de esterilização utilizando UVA-LED mostrou-se capaz de inativar diversas bactérias, incluindo *Escherichia coli* DH5 α , Enteropathogenic *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.

O resultado da exposição de placas de polietileno a 2,5% de NaOCl, seguida da exposição à luz UV, apresentou uma eficácia significativa na descontaminação das placas. O tratamento inicial com NaOCl, que é uma solução de hipoclorito de sódio, é amplamente conhecido por suas propriedades desinfetantes e é frequentemente utilizado para eliminar bactérias, vírus e outros patógenos. A concentração de 2,5% de NaOCl utilizada foi eficaz na inativação dos microrganismos presentes na superfície das placas de polietileno. O tempo de exposição recomendado de 24 horas garantiu que houvesse descontaminação por microrganismos.

Em seguida, a exposição à luz UV foi realizada para complementar o processo de descontaminação. A luz ultravioleta, especialmente na faixa de comprimento de onda germicida 254 nm, tem a capacidade de danificar o material genético dos microrganismos, tornando-os incapazes de se reproduzir.

A exposição de 6 horas à luz UV após o tratamento com NaOCl demonstrou ser um período adequado para garantir a inativação adicional dos microrganismos remanescentes. Essa combinação de tratamentos ofereceu uma abordagem abrangente para descontaminar efetivamente as placas de polietileno, reduzindo significativamente o risco de contaminação cruzada e assegurando um ambiente seguro para o manuseio e utilização posterior das placas.

Portanto, a exposição das placas de polietileno a 2,5% de NaOCl, seguida pela luz UV com o tempo recomendado de 24 horas de exposição ao NaOCl e 6 horas de exposição à luz ultravioleta, resultou em um processo de desinfecção eficaz e confiável (Figura 3).

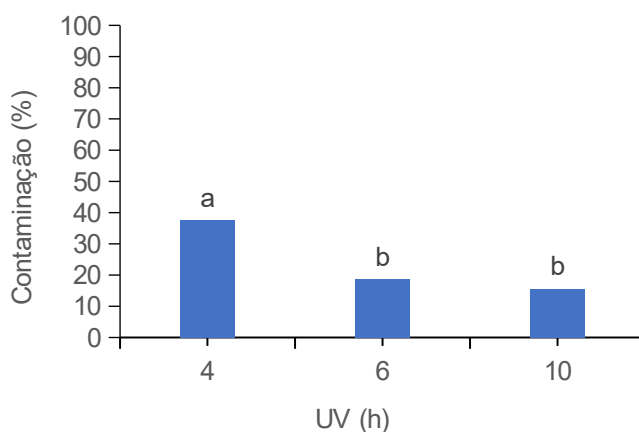


Figura 3. Porcentagem de contaminação de meio de cultura MS, em placas de Petri de polietileno reutilizadas e desinfestadas com o uso de NaOCl (24 h), expostas à diferentes tempos de luz UV (4, 6, 10 h).

Experimento 3: *Diferentes tempos de exposição dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) aliado a luz ultravioleta na descontaminação de placas de Petri descartáveis.*

As menores contaminações foram observadas com o uso do dicloroisocianurato de sódio (NaDCC, 1%) por 24 h, independente das horas de exposição das placas de Petri de polietileno à luz ultravioleta (UV) (Figura 4).

Estudo realizado por Proto et al. (2016), investigou a viabilidade de utilizar pastilhas sólidas de NaDCC para avaliar sua eficácia na fase gasosa,

acompanhando a liberação de cloro por hidrólise. Os resultados evidenciam de forma clara que, na presença do NaDCC, ocorreu uma completa inativação de bactérias e fungos ao longo de quatro semanas. Durante esse período de observação, a concentração de cloro manteve-se constante em $2,0 \text{ g dm}^{-3}$, o que indica que essa abordagem pode ser considerada uma solução eficaz e de longa duração para a inativação de microrganismos. A atividade antimicrobiana do NaDCC hidrolisado foi avaliada contra bactérias e fungos, resultando na inibição da proliferação desses microrganismos por até quatro semanas.

Foi desenvolvida também uma pesquisa por Urtiga et al. (2019) envolvendo uma otimização para um método de esterilização de meio MS que pode substituir a autoclavagem, utilizando baixas concentrações de isocianurato de sódio (ISO) como esterilizador. O isocianurato de sódio foi empregado na forma de dicloro (dicloroisocianurato de sódio) com concentrações variando de $0,04$ a $0,005 \text{ g L}^{-1}$ no meio de cultura. As taxas de contaminação para as concentrações de $0,04 \text{ g L}^{-1}$, $0,02 \text{ g L}^{-1}$ e $0,01 \text{ g L}^{-1}$ permaneceram abaixo de 5%. Em resumo, a esterilização de meio utilizando baixas concentrações de ISO se mostrou uma alternativa viável e vantajosa em relação à autoclavagem tradicional, proporcionando resultados satisfatórios na esterilização eficiente de meios de cultura para o cultivo de *Dianthus caryophyllus* e, potencialmente, para outras espécies vegetais.

Os resultados demonstraram que a esterilização com ISO superou a autoclavagem em diversos aspectos, tais como o tempo necessário para o processo, os recursos utilizados e a capacidade de esterilização alcançada. A utilização de baixas concentrações de ISO mostrou-se eficaz para eliminar a contaminação microbiana, tornando o meio de cultura estéril e adequado para o cultivo de *Dianthus caryophyllus*.

Essa otimização oferece vantagens significativas, tornando o processo de esterilização mais eficiente, econômico e acessível em comparação com a autoclavagem convencional. Além disso, a utilização de ISO como esterilizador de meio pode ser aplicada em diferentes tipos de meios de cultura, abrindo possibilidades para a esterilização de meios específicos para outras espécies vegetais.

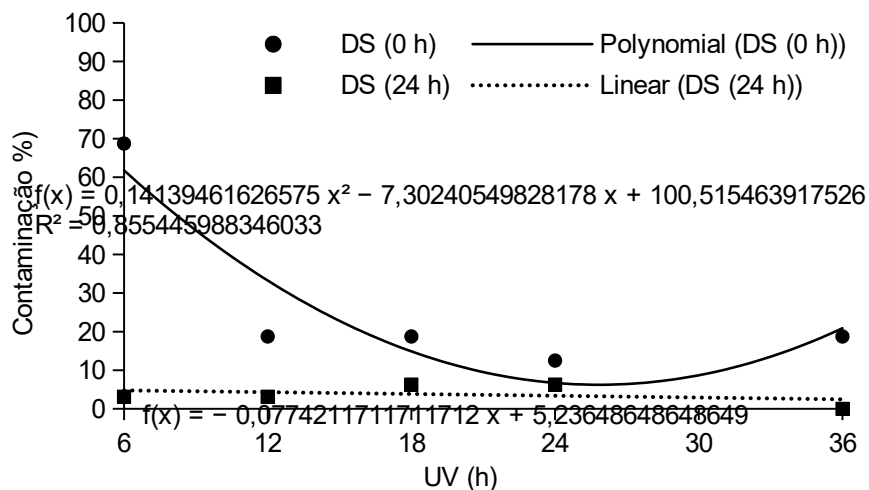


Figura 4. Contaminação (%) após tratamentos com dicloroisocianurato de sódio (DS: 0; 24 h) e luz ultravioleta (UV: 6, 12, 18, 24, 36 h).

¹Médias seguidas pela mesma letra nas barras dentro de cada variável, entre os diferentes tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na comparação entre a presença e ausência do dicloroisocianurato de sódio, verifica-se a necessidade do uso deste produto e, na sequência a exposição à luz UV no menor tempo (6 h), já foi suficiente na descontaminação das placas de Petri (Tabela 1).

O resultado obtido com essa abordagem mostrou-se promissor, demonstrando que a combinação de DS e luz ultravioleta é efetiva na eliminação microrganismos. O NaDCC atua como um agente desinfetante, liberando cloro quando dissolvido em água e inativando os microrganismos presentes.

No estudo conduzido por Salomão et al. (2011), foi avaliada a eficácia do sanitizante clorado orgânico NaDCC em relação a esporos de *Penicillium expansum*, *Byssochlamys fulva* e *Alicyclobacillus acidoterrestris*, tanto na superfície de maçãs como em solução aquosa. Os resultados demonstraram que os tratamentos com NaDCC foram eficazes na redução dos esporos de *P. expansum* presentes na superfície das maçãs, em relação aos microrganismos testados.

O NaDCC mostrou-se como uma alternativa promissora ao hipoclorito, pois foi capaz de reduzir de forma efetiva as populações de *P. expansum*. No

entanto, nenhum dos sanitizantes testados nos estudos foi eficaz contra os esporos de *A. acidoterrestris* e *B. fulva*.

Esses resultados sugerem que é necessário utilizar outras formas de descontaminação, como a luz UV, para complementar o processo de sanitização e garantir a eliminação desses esporos resistentes aos sanitizantes utilizados no estudo. Dessa forma, o uso combinado de NaDCC e luz UV mostrou ser uma abordagem mais abrangente para a desinfestação, abordando diferentes tipos de microrganismos de forma mais completa.

Quando expostos à luz ultravioleta, os microrganismos foram submetidos a danos no DNA, o que impediu sua replicação e tornou-os incapazes de causar infecções ou contaminações. A combinação desses dois métodos de esterilização tem a vantagem de ser mais abrangente na eliminação de diferentes tipos de microrganismos e pode ser especialmente útil para alvos resistentes a outros métodos de desinfestação.

Os resultados de estudos mostram que a esterilização com NaDCC e luz ultravioleta pode ser aplicada em placas de polietileno. Em conclusão, os resultados obtidos com a esterilização utilizando NaDCC e luz ultravioleta são encorajadores, demonstrando ser uma abordagem promissora para a desinfestação eficaz de ambientes e superfícies. A combinação desses métodos oferece uma opção versátil e segura para eliminar uma variedade de microrganismos patogênicos, tornando-se uma alternativa valiosa para aplicações de esterilização em diversas áreas tanto da pesquisa como da saúde e indústria.

Tabela 1. Contaminação (%) após tratamentos com dicloroisocianurato de sódio (NaDCC: 0; 24 h) e luz ultravioleta (UV: 6, 12, 18, 24, 36 h)

NaDCC (h)	UV (h)				
	6	12	18	24	36
0	68,75*	18,75*	18,75*	12,50*	18,75*
24	3,125	3,125	6,25	6,25	0,00

*Significativo ($p < 0,05$)

Experimento 4: *Placas de Petri com meio autoclavado e não autoclavado expostas à luz UV em diferentes alturas.*

Placas de Petri de polietileno reutilizáveis desinfestadas em dicloroisocianurato de sódio (1%) por 24 h e, a exposição destas placas com meio MS autoclavado e não autoclavado à altura de 10 cm da luz UV por 6 h, resultou em ausência de contaminações (Figura 5). Entretanto, a praticidade de apoiar as placas de Petri na base do fluxo laminar (50 cm), sem necessitar da elevação das placas de Petri mais próximo da luz UV (10 cm) e, pela baixa taxa de contaminação (5%), recomenda-se a altura de 50 cm (Figura 5). Portanto, é validado este protocolo de esterilização do meio de cultura e placas de Petri, já que as contaminações foram nulas ou muito baixas.

Ao expor as placas de Petri e o meio de cultura não autoclavado à luz UV em diferentes alturas, foi possível avaliar o efeito da radiação ultravioleta na esterilização e na viabilidade do meio MS e das placas de Petri. A luz UV é conhecida por sua capacidade de inativar microrganismos, e com a exposição foi possível ser usada como uma forma de descontaminação do meio e das placas não autoclavado.

O resultado deste estudo revelou que a porcentagem de esterilização é a principal diferença entre o meio MS autoclavado e não autoclavado. O meio MS autoclavado passou por um processo de autoclavagem a alta temperatura e pressão, o que resultou na completa eliminação de qualquer contaminação microbiana, assegurando que o meio estivesse estéril antes de ser utilizado. Em contraste, o meio MS não autoclavado não foi submetido a esse processo de esterilização, contudo, foi esterilizado com irradiação UV e mostrou ser uma abordagem alternativa para a esterilização desse meio de cultura utilizado em pesquisas de cultura de tecidos vegetais e células vegetais. Em vez de utilizar o tradicional processo de autoclavagem, que envolve alta temperatura e pressão para eliminar a contaminação microbiana, a irradiação UV é empregada para alcançar a esterilização.

Ao utilizar a irradiação UV como método de esterilização, é possível evitar os riscos associados ao calor e pressão elevados do processo de autoclavagem, que podem danificar substâncias termosensíveis presentes no meio. Além disso, a irradiação UV pode ser uma opção preferível quando a autoclavagem não é viável ou não é recomendada para determinadas formulações de meio MS ou aplicações específicas.

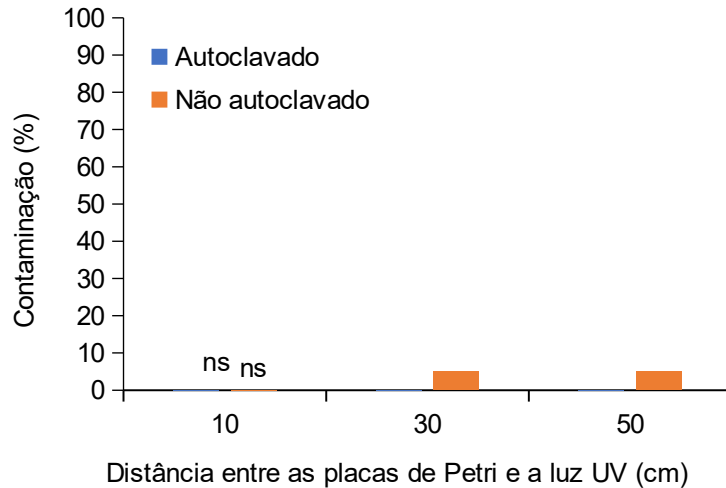


Figura 5. Contaminação (%) após exposição de placas de Petri com meio autoclavado e não autoclavado à luz UV em diferentes alturas.

Experimento 5: Diferentes tempos de exposição à exposição a luz ultravioleta na descontaminação de placas de Petri descartáveis e meio de cultura.

Os tempos de UV não foram significativos, entretanto, em valores médios o tempo de 3 h na luz UV não possibilitou contaminação das placas de Petri e meio de cultura MS (Figura 6).

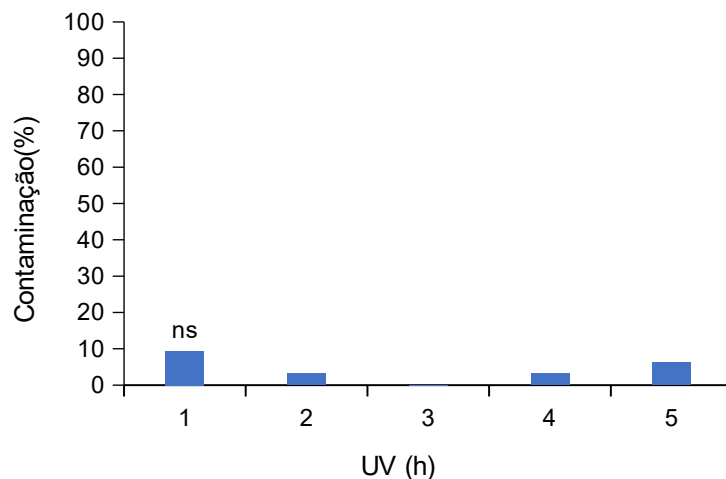


Figura 6. Contaminação (%) de placas de Petri e meio de cultura MS após diferentes tempos de exposição à luz UV.

Um indício de que a contaminação dos experimentos de esterilização de placas de Petri de polietileno foi de microrganismos presentes na placa, e não

do meio de cultura, é o surgimento da contaminação na borda da placa (Figura 7a). Os principais fungos identificados nas contaminações foram *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (Figura 7b, c).

Utilizando um dispositivo que emite radiação UV-C, foram coletadas culturas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538), uma bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 8739) e um fungo leveduriforme (*Candida albicans* ATCC 10231). Os inóculos iniciais dos micro-organismos foram obtidos e cultivados em placas de Petri, em seguida, transferidos para tubos de ensaio estéreis contendo 10 mL de solução salina a 0,95% (ROCHA, 2021). Após a inoculação, todas as placas foram abertas e expostas à radiação UV-C gerada pelo dispositivo, sendo avaliados em diferentes tempos de exposição. O dispositivo desenvolvido neste estudo demonstrou eficácia na redução das populações microbianas de todos os micro-organismos testados (*C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*). O tempo necessário para a desinfecção de todo meio utilizando o dispositivo foi inferior a 20 minutos, quando posicionado a uma distância de 1 metro e com incidência perpendicular dos raios.

No presente trabalho, os resultados obtidos a partir dos experimentos de esterilização utilizando luz ultravioleta (UV) apresentaram achados relevantes. Os diferentes tempos de exposição à luz UV não mostraram significância estatística em relação à contaminação, observou-se que, em valores médios, o tempo de três horas de exposição à luz UV foi suficiente para evitar a contaminação das placas de Petri e do meio de cultura MS (Figura 6).

Uma observação importante nos resultados foi o surgimento de contaminação na borda das placas de Petri de polietileno (Figura 7a), indicando que a origem dessa contaminação provavelmente foi de microrganismos presentes na própria superfície das placas e não do meio de cultura utilizado. Esse indício sugere que a utilização do meio de cultura MS não foi a fonte de contaminação nos experimentos, mas sim a presença de microrganismos na superfície das placas de Petri de polietileno.

Os principais fungos identificados nas contaminações foram *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (Figura 7b, c), o que é relevante para a compreensão dos tipos de microrganismos que podem ser encontrados em experimentos

envolvendo placas de Petri de polietileno e como esses fungos podem interferir nos resultados.

Esses resultados sugerem que, para evitar contaminações em experimentos com placas de Petri de polietileno e meio de cultura MS, é crucial garantir a limpeza e a desinfestação adequada das placas antes do uso, como realizados nos experimentos 1, 2 e 3. Além disso, a utilização de medidas preventivas, como a manutenção de condições assépticas durante o manuseio das placas e a utilização de técnicas adequadas de esterilização, pode ser essencial para minimizar o risco de contaminações por microrganismos presentes na superfície das placas.

Em conclusão, os resultados dos experimentos de esterilização com luz ultravioleta e a identificação dos principais fungos presentes nas contaminações proporcionaram informações valiosas para a melhoria dos procedimentos de esterilização e prevenção de contaminações em experimentos utilizando placas de Petri de polietileno e meio de cultura MS. Esses achados contribuem para aprimorar a qualidade e confiabilidade dos resultados em pesquisas que envolvem o cultivo de microrganismos em laboratórios.

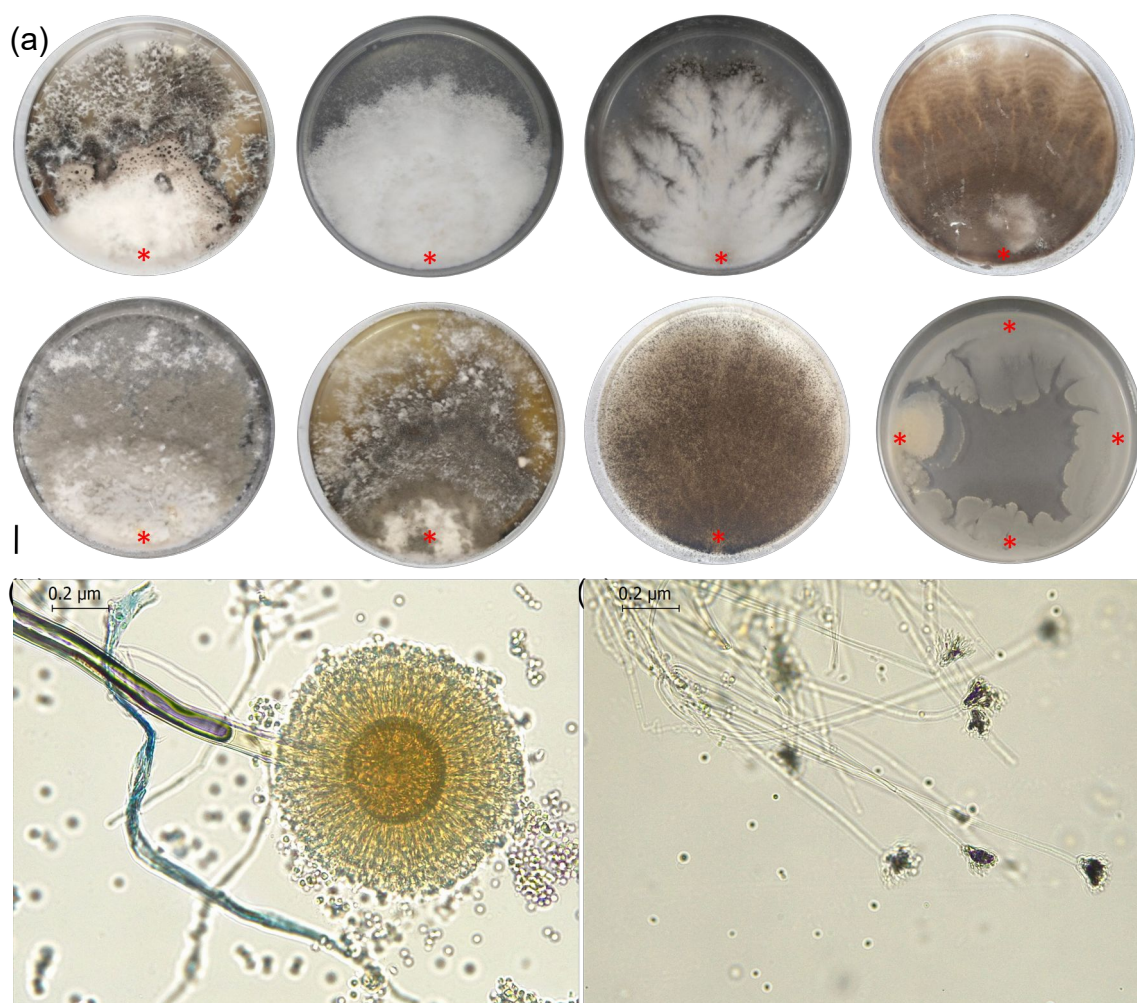


Figura 7. Contaminação por fungos e bactérias dos experimentos de esterilização de placas de Petri de polietileno, com destaque de onde surgiu a contaminação (asterisco vermelho) (a). Fungos identificados nas contaminações: *Aspergillus* spp. (b) e *Penicillium* spp. (c). Barra: 1 cm.

Experimento 6: Embriogênese somática das palmeiras açaí, juçara e Santa Marta em meio de cultura suplementado com picloram e triclopir filtrado e autoclavado.

A embriogênese somática no ecótipo Santa Marta (*E. edulis*) é a primeira vez que é estudada (Tabela 2). A variável número de calos embriogênicos foi a única que apresentou diferença significativa entre todos os tratamentos (Tabela 2). A maior quantidade de embriões por calo foi observada nas palmeiras juçara e Santa Marta (4,3 e 5 embriões, respectivamente), pertencentes a espécie *E. edulis*, quando em meio suplementado com picloram filtrado (Tabela 2). As auxinas filtradas não estão sujeitas a perda de

estabilidade química, a exemplo, do processo de autoclavagem devido a altas temperaturas. Oliveira et al. (2022) também obtiveram sucesso na embriogênese somática com a palmeira juçara, em meio de indução com picloram (300 μM) autoclavado. Assim como Mello (2022), no entanto, usando o picloram filtrado e em uma concentração menor (150 μM). Isto provavelmente, sugere, que o picloram autoclavado degrade com a autoclavagem e necessite de uma concentração maior para obter resposta, comparado com a concentração necessária quando filtrado.

No *E. oleracea* a maior porcentagem de calejamento ocorreu com PIC filtrado 96,66%, enquanto a menor porcentagem de calejamento ocorreu com PIC autoclavado 88,33%. Já no *E. edulis* a maior porcentagem de calejamento ocorreu com PIC filtrado e autoclavado 100,00%, enquanto a menor porcentagem de calejamento ocorreu com Triclopi autoclavado 91,66%. *E. edulis* ecótipo Santa Marta obteve a maior porcentagem de calejamento ocorreu com PIC filtrado 88,33%, enquanto a menor porcentagem de calejamento ocorreu com Triclopi autoclavado 13,33%. (Tabela 2).

O calejamento, ou formação de calos, é um processo importante no cultivo de tecidos vegetais *in vitro*, sendo um estágio inicial fundamental para a regeneração de plantas a partir de explantes. De acordo com as informações obtidas por meio desse estudo, a porcentagem de calejamento foi maior em meio contendo picloram e triclopir filtrado do que em meio contendo picloram e triclopir autoclavado.

É importante destacar que a influência da irradiação UV na composição química do meio MS não pode ser determinada com toda certeza. No entanto, quando esse método é aplicado com cuidado e de acordo com as práticas recomendadas, não foram observados danos significativos nos componentes essenciais do meio, como nutrientes e reguladores de crescimento.

Outro ponto importante, que é válido ressaltar, é que a possibilidade de degradação do composto durante o processo de preparação e armazenamento do meio de cultura contendo picloram. Portanto, é fundamental garantir a integridade e a estabilidade do picloram antes de seu uso na cultura de tecidos vegetais.

Tabela 2. Porcentagem de oxidação, calejamento e número de calos embriogênicos, clusters e embriões, na indução da embriogênese somática das palmeiras açai, juçara e Santa Marta em meio com as auxinas picloram e triclopir filtrado e autoclavado

Genótipos	Oxidação (%)			
	Picloram		Triclopir	
	Filtrado	Autoclavado	Filtrado	Autoclavado
Açaí	13,33 c ¹ NS	11,66 c B	70,00 a A	38,33 b B
Juçara	8,33 ns NS	6,66 ns B	13,33 ns B	8,33 ns C
Santa Marta	16,66 b NS	65,00 a A	18,33 b B	81,66 a A
Genótipos	Calejamento (%)			
Açaí	98,33 ns NS	88,33 ns A	96,66 ns NS	94,99 ns A
Juçara	100,00 ns NS	100,00 ns A	96,66 ns NS	91,66 ns A
Santa Marta	88,33 a NS	28,33 b B	86,66 a NS	13,33 b B
Genótipos	Número de calos embriogênicos			
Açaí	0,384 a C	0,450 a B	0,034 b B	0,034 b B
Juçara	0,967 a A	0,749 b A	0,668 b A	0,483 b A
Santa Marta	0,666 a B	0,000 b C	0,517 a A	0,000 b B
Genótipos	Número de clusters			
Açaí	0,067 ns NS	0,000 ns NS	0,000 ns NS	0,000 ns NS
Juçara	0,667 ns NS	0,134 ns NS	0,017 ns NS	0,000 ns NS
Santa Marta	0,817 ns NS	0,000 ns NS	0,100 ns NS	0,000 ns NS
Genótipos	Número de embriões			
Açaí	2,517 ns NS	0,000 ns NS	0,000 ns NS	0,000 ns NS
Juçara	4,350 ns NS	0,850 ns NS	0,067 ns NS	0,000 ns NS
Santa Marta	5,000 ns NS	0,000 ns NS	0,337 ns NS	0,000 ns NS

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna dentro de cada variável, entre os diferentes tratamentos, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott e Tukey, respectivamente ($p < 0,05$). ^{ns}Não significativo pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

No *E. oleracea* a menor porcentagem de oxidação ocorreu com PIC autoclavado 13,33% enquanto a maior porcentagem de oxidação ocorreu com Triclopi filtrado 70,00%. Já no *E. edulis* a maior porcentagem de oxidação ocorreu com meio contendo Triclopir filtrado 13,33%, enquanto a menor porcentagem de oxidação ocorreu com PIC autoclavado. *E. edulis* ecótipo Santa Marta obteve a maior porcentagem de oxidação com Triclopir autoclavado 81,66% enquanto a menor porcentagem de oxidação ocorreu com PIC filtrado (Tabela 2).

É importante ressaltar que a oxidação celular é um fenômeno complexo e pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a composição do meio

de cultura, as condições de cultivo, a sensibilidade das células e a presença de agentes indutores de estresse oxidativo. Portanto, mais estudos seriam necessários para entender completamente os mecanismos pelos quais o meio filtrado e o meio autoclavado podem influenciar o número de oxidação em embriões zigóticos e como isso pode afetar o desenvolvimento e a qualidade dos mesmos durante o cultivo *in vitro*.

O comportamento das espécies *E. edulis*, *E. edulis* ecótipo Santa Marta e *E. oleracea* sob a aplicação das mesmas concentrações e indutores de crescimento pode revelar informações importantes sobre a influência da genética nesse processo.

Quando submetidas as mesmas concentrações e mesmos indutores de crescimento, essas espécies apresentaram respostas diferentes em relação à indução embriogênica e formação de embriões somáticos. A resposta genética de cada espécie e ecótipo é determinante nesse comportamento, pois influencia a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário e à regeneração de tecidos.

Esse estudo demonstrou que *E. edulis* ou o ecótipo Santa Marta de *Euterpe edulis* foram mais eficientes na indução de embriogênica do que *E. oleracea*. Isso pode estar associado a variações genéticas entre as plantas, que influenciam a expressão de genes importantes para o processo de diferenciação celular e formação de embriões.

Estudo realizado por Freitas et al. (2016), para *E. oleracea* a concentração de 450 μM de picloram resultou em uma média de 84,7% na formação de calos embriogênicos, enquanto em estudos realizados por Scherwinski-Pereira et al. (2012) a concentração ótima de picloram foi de 225 μM , com 72% dos explantes em cultivo apresentando formação de calos embriogênicos.

Nos estudos realizados por Mello et al. (2023) em *E. edulis*, foi observado que a aplicação de 150 μM de picloram resultaram em mais centros embriogênicos (95%), enquanto que, Oliveira et al. (2022) obtiveram maior eficiência na produção de embriões com picloram (300 μM), na qual todos os calos formados a partir de embriões zigóticos apresentaram características

embriogênicas, com uma região central compacta e uma região periférica com células isoladas.

Mello (2022) também testou os efeitos do triclopir (100 μM) o que resultou no maior número de embriões se comparado ao picloram. Observando esses resultados podemos considerar a plasticidade fenotípica de cada espécie, que também pode ter influenciado o comportamento sob a aplicação dos mesmos indutores de crescimento. A plasticidade fenotípica é a capacidade de uma planta responder a estímulos ambientais por meio de mudanças na expressão gênica, o que pode levar a respostas distintas mesmo sob condições semelhantes.

As variáveis canônicas explicam cerca de 90% da variabilidade dos tratamentos (Figura 8). Verifica-se que quando aumenta a oxidação diminui o calejamento em função da orientação oposta das setas das variáveis formando praticamente um ângulo de 180° (Figura 8). As variáveis número de clusters e número de embriões contribuem mais fortemente para explicar a variação entre os tratamentos e, que essas variáveis se correlacionam altamente (Figura 8). E que ainda, Juçara e Santa Marta apresentam maior número de embriões e Santa Marta o maior número de clusters (Figura 8).

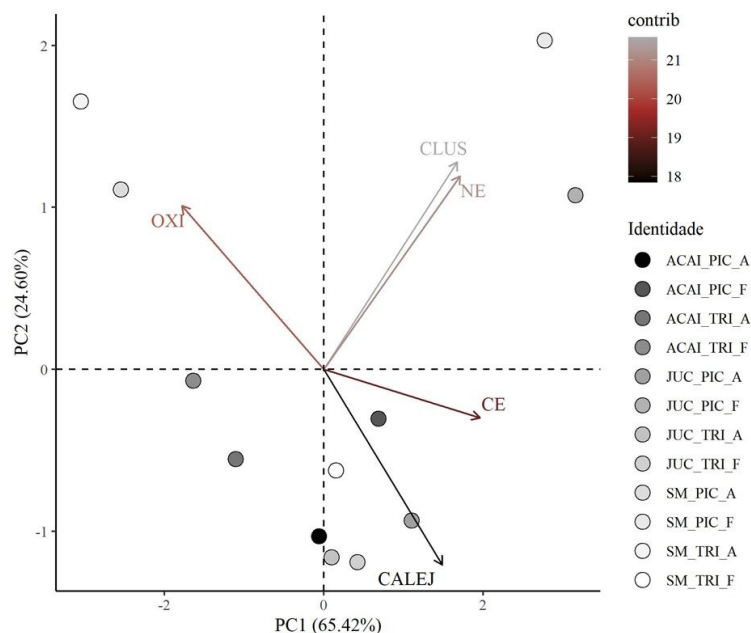


Figura 8. Análise de componentes principais das palmeiras (açai, juçara e Santa Marta) dentro dos tratamentos com auxinas (picloram e triclopir) filtradas e autoclavadas.

A análise de potencialidade celular possibilitou observar quais espécie e tratamentos possuíam maiores potenciais embriogênicos. O açai apresentou menor potencial embriogênico comparado a Juçara e Santa Marta, com áreas maiores de coloração azul, e poucas áreas avermelhadas em todos os tratamentos (Figura 9e-h). Enquanto a juçara, foi possível observar áreas completamente avermelhadas nos tratamentos com auxinas filtradas (Figura 9m, n), com destaque ao tratamento com picloram filtrado, em que o calo já possuía embriões somáticos (Figura 9i); e pequenas áreas azuis nos tratamentos com auxinas autoclavadas (Figura 9o, p).

Já o Santa Marta, foi possível visualizar a potencialidade celular somente nos tratamentos com auxinas filtradas, já que, nos tratamentos com auxinas autoclavadas não houve a formação de calos embriogênicos. No entanto, nos tratamentos com auxinas filtradas, o tecido possuía intensas áreas com coloração avermelhada (Figura 9s, t), comprovando a presença de tecido embriogênico, também comprovado pela presença de embriões somáticos (Figura 9q, r).

A análise de potencialidade celular é uma ferramenta poderosa para avaliar a capacidade de diferentes espécies vegetais e tratamentos de desenvolver embriões somáticos. Nesse contexto, ao analisar os resultados, foi possível observar que os tratamentos que utilizaram o picloram filtrado e submetidos à autoclavagem, apresentaram os maiores potenciais embriogênicos.

A filtragem do picloram pareceu ser um fator relevante na indução da embriogênese somática, possivelmente preservando componentes importantes do regulador de crescimento, que poderiam ser afetados pela autoclavagem. A manutenção da eficácia embriogênica após a filtragem sugere que o composto manteve sua integridade bioquímica e capacidade de sinalização celular necessária para a formação de embriões somáticos. O que explica Oliveira et al. (2022) ter usado uma concentração mais elevada de picloram (300 μM -

autoclavado), sendo esse autoclavado, do que Mello (2022) (150 μM - filtrado) na indução de embriogênica em embriões zigóticos de *E. edulis*.

Por outro lado, os tratamentos que foram submetidos à autoclavagem podem ter sofrido alguma degradação do picloram, resultando em uma redução do potencial embriogênico. A autoclavagem, como processo de esterilização, envolve altas temperaturas e pressão, o que pode afetar a estabilidade e a atividade de compostos biológicos, como reguladores de crescimento.

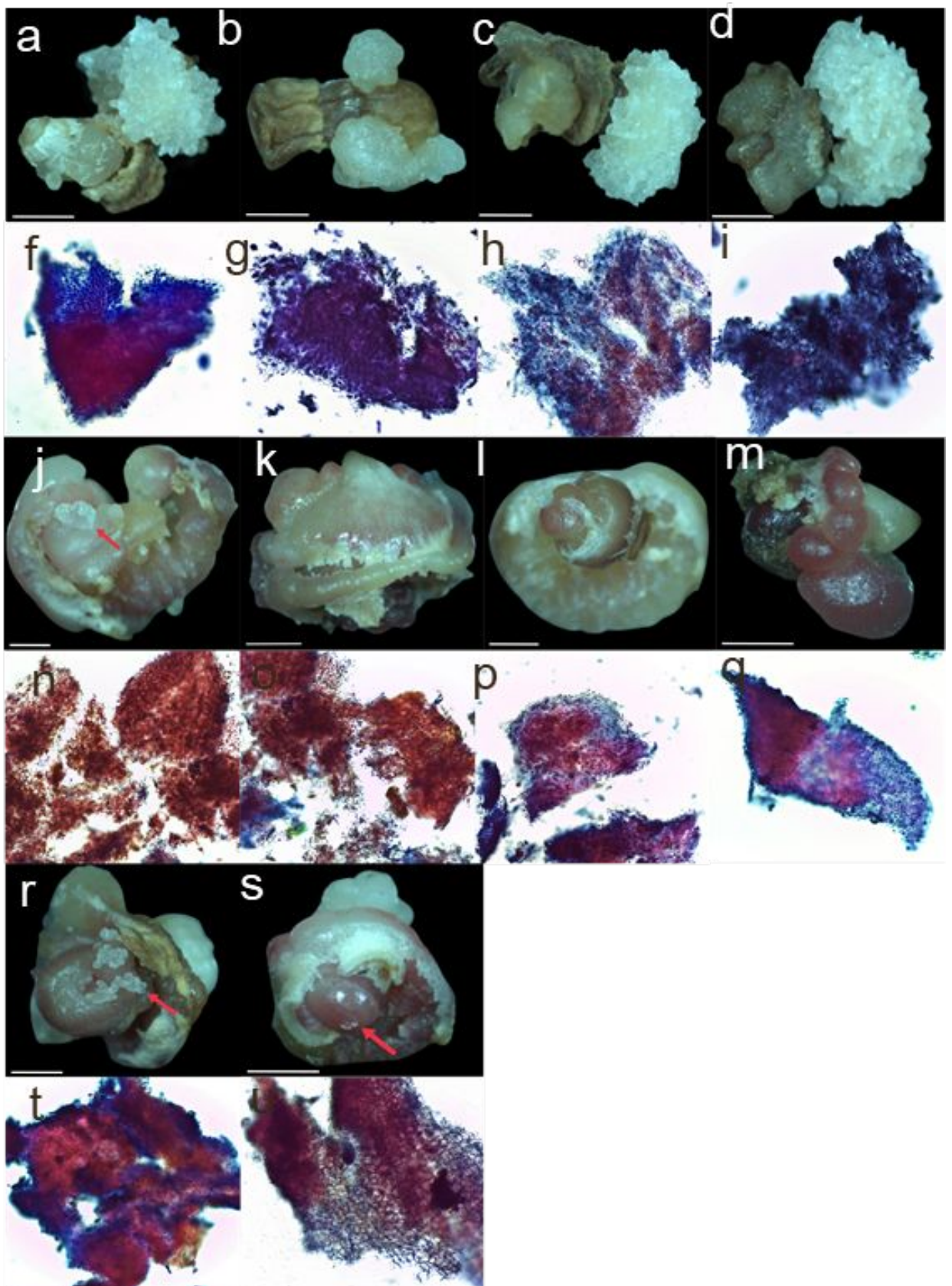


Figura 9. Calos de *E. oleracea* induzidos com picloram e triclopir filtrados e autoclavados (a-d, respectivamente), e suas respectivas potencialidades

celulares (e-h, respectivamente). Calos de *E. edulis* induzidos com picloram e triclopir filtrados e autoclavados (i-l, respectivamente), e suas respectivas potencialidades celulares (m-p, respectivamente). E calos de *E. edulis* ecótipo Santa Marta induzidos com picloram e triclopir filtrados (q, r, respectivamente), e suas respectivas potencialidades celulares (s, t, respectivamente). Seta vermelha: embriões somáticos. Barra: 1000 µm.

6. CONCLUSÃO

Os diferentes comportamentos das espécies podem ter sido devido a plasticidade fenotípica das espécies, ou seja, a capacidade de um genótipo ou semelhantes expressarem diferentes fenótipos em resposta às condições ambientais, e também devido a utilização de protocolos com meio e reguladores de crescimento autoclavado ou filtrado, dessa forma faz-se necessário utilizar protocolos diferentes para cada uma das espécies.

E. edulis ou *E. edulis* ecótipo Santa Marta apresentam maior responsividade à indução de embriogênese somática em comparação com *E. oleracea*.

A combinação de dicloroisocianurato de sódio (24 horas) e luz ultravioleta (3 horas) de exposição são ideais para alcançar uma eficaz eliminação de microrganismos em placas de Petri descartáveis.

As placas de Petri desinfestadas em dicloroisocianurato de sódio (1%) por 24 horas, contendo meio autoclavado e não autoclavado, onde o meio não autoclavado foram expostos à luz UV a uma altura de 10 cm ou 50 cm, resultaram em ausência ou baixa taxa de contaminações, sendo indicado, portanto a distância de 50 cm, pela baixa contaminação obtida.

A ausência da autoclavagem no picloram filtrado parece ter preservado componentes ou atividades bioquímicas cruciais para a indução de embriogênese somática de *E. edulis* e *E. edulis* ecótipo Santa Marta.

Com base nesses resultados, o protocolo de esterilização do meio de cultura e das placas de Petri usando dicloroisocianurato de sódio e luz UV é validado como eficiente, uma vez que resultou em ausência ou baixa incidência de contaminações. Esse método pode ser adotado em pesquisas e trabalhos

que envolvam a cultura de microrganismos, garantindo a integridade e a pureza dos experimentos.

7. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

ABREU, L. F.; FARIA, J. A. F. Evaluation of a system for chemical sterilization of packages. **Packaging Technology and Science: An International Journal**, v. 17, n. 1, p. 37-42, 2004.

ADELBERG, J. W.; DELGADO, M. P.; TOMKINS, J. T. Spent medium analysis for liquid culture micropropagation of *Hemerocallis* on Murashige and Skoog medium. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, p. 95-107, 2010.

ALEXANDRE, F. A.; FARIA, J. A. F.; CARDOSO, C. F. Avaliação da eficiência da radiação ultravioleta na esterilização de embalagens plásticas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1524-1530, 2008.

ARAÚJO, L. F.; MELO, T. N. L.; FORTUNA, J. L. Avaliação da eficácia do álcool comercial para desinfecção de superfícies. **Revista Científica do ITPAC**, v. 12, n. 2, p. 66-71, 2019.

ANDRADE, D. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do álcool gel a 70% frente às bactérias hospitalares e da comunidade. **Medicina**, v. 40, n. 2, p. 250-254, 2007.

BATISTA, L. F.; KAINA, B.; MENEGHINI, R.; MENCK, C. F. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 2-3, p. 197-208, 2008.

BATISTA, L. F.; ROOS, W. P.; KAINA, B.; MENCK, C. F. mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 2, p. 237-246, 2009.

BARROSO, M. E. S. et al. Phytochemical profile of genotypes of *Euterpe edulis* Martius—Juçara palm fruits. **Food Research International**, v. 116, p. 985-993, 2019.

BICHARA, C. M. G.; ROGEZ, H. Açaí (*Euterpe oleracea* Martius). In: BICHARA, C. M. G.; ROGEZ, H. Biologia e tecnologia pós-colheita de frutas tropicais e subtropicais. **Woodhead Publishing**, 2011. p. 1-27e.

BICUDO, M. O. P.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 142-147, 2014.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 6. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União de 23 de setembro de 2008**, (Seção 1) 185, p.75-83.

BRASIL. Censo Agropecuário. **IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Rio de Janeiro 2021. Available at <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/acai-cultivo/br>>. Access on 22 julho 2023

BRASIL. **Portaria MMA Nº 443, de 17 de dezembro de 2014**, seção 1, p. 110-121.

CARVALHO, M. S. **Diversidade e estrutura genética de *Euterpe edulis* Mart.** 2015. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES. 58 f. 2015.

CHATTERLEY, C.; LINDEN, K. Demonstration and evaluation of germicidal UV-LEDs for point-of-use water disinfection. **Journal of Water and Health**, v. 8, n. 3, p. 479-486, 2010.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, v. 620, 2011.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim da sociobiodiversidade**. v. 6, n. 3, p. 14, 2022.

CONAB (2020). Companhia Nacional de Abastecimento Açaí – Análise Mensal – Dezembro 2020. Available at <<http://www.conab.gov.br/>>. Access on 22 julho 2023.

DE OLIVERA FREITAS, E.; MONTEIRO, T. R.; NOGUEIRA, G. F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, v. 212, p 126-135, 2016.

DE MELLO, T. **Desenvolvimento, maturação e germinação in vitro de sementes, e embriogênese somática de *Euterpe edulis* Martius**. 2022. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, 2022. p 265.

DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: HALLGREN, J. E. **Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology**. Swedish: University of Agricultural Sciences, v. 8, p. 147-186, 1988.

DE MELLO, T.; CORREIA, L. N. F.; HEGEDUS, C. E. N.; SCHMILDT, E. R.; FERREIRA, A.; LOPES, J. C.; ALEXANDRE, R. S. Cell reprogramming via direct somatic embryogenesis in an Atlantic Forest species vulnerable to extinction: *Euterpe edulis* stem segments induced with picloram. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 154, p. 131-140, 2023.

EISBERG, R. M.; RESNICK, R. **Física Quântica: Átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas**. Rio de Janeiro: Editora Campus, v. 1, p. 928, 1979.

FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, p. 667-686, 2022.

FEHÉR, A., PASTERNAK, T., DUDITS, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 74: 201-228.

FISCH, S. T. V.; NOGUEIRA JR, L. R.; MANTOVANI, W. Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. na Mata Atlântica (Reserva Ecológica do Trabiju, Pindamonhangaba-SP). **Revista Biociências**, v. 6, n. 2, p. 31-37, 2000.

FURLANETO, F. P. B.; SOARES, A. A. V. L.; FURLANETO, L. B. Parâmetros tecnológicos, comerciais e nutracêuticos do açaí (*Euterpe oleracea*). **Revista Internacional de Ciências**, v. 10, n. 1, p. 91-107, 2020.

FREIRA, G. E.; AGUIAR, B. A.; VERAS, M. D. O. V.; FERREIRA, A. C.; DA SILVA MARTINS, C.; DA SILVA COSTA, D. V.; ALMEIDA-GOMES, F. Avaliação in vitro de diferentes agentes de descontaminação de cones de guta-percha. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 6, n. 1, p. 49-58, 2017.

GALOTTA, A. L.Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). **Química Nova**, v. 28, p. 610-613, 2005.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. D. The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**, ed. 3, v. 1, pp. 65-117, 2008.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration 261 in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, v. 7, n. 7, p. 550-552, 1988.

GUERRERO-BELTRÁN, J. A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice

by ultraviolet light. **Journal of Food Process Engineering**, v. 28, n. 5, p. 437-452, 2005.

GUERGOLETTTO, K. B.; COSTABILE, A.; FLORES, G.; GARCIA, S.; GIBSON, G. R. Fermentação *in vitro* da polpa de juçara (*Euterpe edulis*) pela microbiota colônica humana. **Química de Alimentos**, v. 196, p. 251-258, 2016.

GUIMARÃES, L. A. de O. P.; SOUZA, R. G. **Palmeira juçara: patrimônio natural da Mata Atlântica no Espírito Santo**. 2017.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; OLIVEIRA, M. S. P.; MEDEIROS FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002.

LONGHINI, T. M. et al. Protótipos com radiação uv-c para esterilização de máscaras n95/pff2, ambientes e superfícies hospitalares. **ForScience**, v. 10, n. 1, p. e01050, 2022.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Ediciones Omega, 2005. p. 270.

MORI, M.; HAMAMOTO, A.; TAKAHASHI, A.; NAKANO, M.; WAKIKAWA, N.; TACHIBANA, S.; IKEHARA, T.; NAKAYA, Y.; AKUTAGAWA, M.; KINOUCI, Y. Development of a new water sterilization device with a 365 nm UV-LED. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 45, p. 1237-1241, 2007.

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

MURACA, P.; STOUT, J. E.; YU, V. L. Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 447-453, 1987.

OLIVEIRA, L. B.; MELLO, T.; ARAUJO, C. P.; OLIVEIRA, J. P. B.; FERREIRA, A.; ZANARDO, T. E. C.; VIEIRA, L. M.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S.; CARVALHO, V. S. Morphoanatomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. **Scientia Horticulturae**, v. 299, p.111051, 2022.

PINTO, G.; SILVA, S.; LOUREIRO, J.; COSTA, A.; DIAS, M. C.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural approach. **Trees**, v. 25, p. 383–392, 2011.

PROTO, A.; ZARRELLA, I.; CUCCINIELLO, R.; PIRONTI, C.; CARO, F.; MOTTA. Bactericidal and fungicidal activity in the gas phase of sodium dichloroisocyanurate (NaDCC). **Current Microbiology**, v. 73, p. 287-291, 2016.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, E. T. Composição fitoquímica e estabilidade térmica de duas espécies comerciais de açaí, *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*. **Química dos Alimentos**, v. 115, n. 4, p. 1199-1205, 2009.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T. Estabilidade química de antocianinas do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) influenciadas por cofatores polifenólicos naturais e adicionados externamente em sistemas modelo. **Química dos Alimentos**, v. 118, n. 1, p. 17-25, 2010.

PEREIRA, J. A. F.; COUTINHO, Í. A. C.; SOARES, E. L.; SOARES, A. A.; CAETANO, A. P. D. S.; CAMPOS, F. D. A. D. P. Estudos morfoanatômicos e histoquímicos do desenvolvimento da semente de *Euterpe oleracea* (Arecaceae). **Rodriguésia**. v. 72, p. e01832019, 2021.

PEREIRA, A. G. **Distribuição de *Euterpe edulis* Martius na mata atlântica revela diferentes níveis de variabilidade genética: implicações para a conservação.** 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, 2019.

PEREIRA, P. M. **Caracterização da variabilidade genética de *Euterpe edulis* (Arecaceae) para produção de frutos.** 2018. 111 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, 2018.

PIGATTO, G. **Irradiação UV em *Xandomonas campestris* pv. *campestris* visando a produção da goma xantana.** São José do Rio Preto: UNESP, 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2008.

ROCHA, A. S.; DA SILVA, C. A.; DE SOUZA, R. L.; CHOQUE, N. M. S.; SOARES, D. B.; FERREIRA, E. M. S.; PIMENTA, R. S. Verificação da eficiência de um dispositivo de desinfecção por radiação UV-C. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e31310615817-e31310615817, 2021.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO, J. R.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açaí palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 3, p. 501-508, 2012.

SALOMÃO, B. D. C. M.; MULLER, C.; MASSAGUER, P. R. Aplicação de dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético para redução de esporos de *Penicillium expansum*, *Byssosclamyces fulva* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* na

superfície de maçãs e em soluções aquosas. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, p. 219-230, 2011.

SANTOS, J. C.; SENA, A. L. S.; HOMMA, A. K. O. Viabilidade econômica do manejo de açazais no estuário amazônico do Pará. In: GUIDUCCI, R. C. N.; LIMA FILHA, J. R.; MOTA, M. M. (Ed.). **Viabilidade econômica de sistemas de produção agropecuários**. Brasília: Embrapa, p. 351-409, 2012.

SANTOS, G. N. C. et al. Desenvolvimento de um iogurte sabor juçará (*Euterpe edulis* Martius): Avaliação físico-química e sensorial. **Revista Eletrônica TECEN**, v. 5, n. 2, p. 43-58, 2012.

SEQUINEL, R. et al. Soluções a base de álcool para higienização das mãos e superfícies na prevenção da covid-19: compêndio informativo sob o ponto de vista da química envolvida. **Química Nova**, v. 43, p. 679-684, 2020.

SENRA, J. D. B. **Análises biométricas de palmeiras Juçara de fragmentos florestais no Sul do Espírito Santo**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, 2017.

SILVA, A. L.; Serra, E. F.; Ripoll, M. K.; Waller, S. B.; Osório, L. D. G.; Gomes, A. D. R.; Meireles, M. C. A. Luz ultravioleta na inibição do crescimento de leveduras. **Science and Animal Health**, v. 5, n. 2, p. 101-111, 2017.

SILVA, U. N. M. **A radiação UVC como alternativa no tratamento de água**. 2018. 72f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018.

SILVA, J. Z. **Fundamentos da produção e consumo de frutos em populações naturais de *Euterpe edulis* Martius**. Tese, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. - Florianópolis, SC, 2011. 226f.

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 89, p. 14-26, 2016.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12ª Edição. Artmed Editora, 2016.

URTIGA, C. C.; CARDOSO, A. S. I. M.; FIGUEIREDO, A. S. Low sodium isocyanurate concentrations as a substitute to medium autoclaving in plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 139, p. 601-604 2019.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

YAMAGUCHI, K. K. L.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; DA VEIGA-JUNIOR, V. F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137-151, 2015.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA FILHO D. F.; YUYAMA, K., DE JESUS VAREJÃO, M.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.

ZITO, R. K.; SEDIYAMA, C. S.; SEDIYAMA, T.; GOMES, J. L. L.; ROCHA, V. S. Hipoclorito de sódio e álcool na esterilização superficial de sementes de soja. **Ceres**, v. 42, n. 244, p. 637-643, 1995.

ZHAO, J.; YANG, X. Photocatalytic oxidation for indoor air purification: a literature review. **Building and Environment**, v. 38, n. 5, p. 645-654, 2003.