UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO E ASSUNTOS ESTUDANTIS CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

Gabriel Lopes Medeiros

Desenvolvimento de sementes sintéticas de milho verde (*Zea mays*)

Sorocaba/SP
2025

Gabriel Lopes Medeiros

Desenvolvimento de sementes sintéticas de milho verde (*Zea mays*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do Diploma de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade de Sorocaba

Orientador: Dr. Marco Vinícius Chaud

Coorientadora: Dra. Thais Jardim Oliveira

Sorocaba/SP
2025

Gabriel Lopes Medeiros

Desenvolvimento de sementes sintéticas de milho verde (*Zea mays*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do Diploma de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade de Sorocaba

Aprovado em: 05 de junho de 2025

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
Universidade de Sorocaba

_____

Profa. Dra. Thais Jardim Oliveira
Universidade de Sorocaba

_____

Profa. Dra. Tatiane Pasquoto Stigliani
Universidade de Sorocaba

Dedico este trabalho a Deus, pela oportunidade, sabedoria e força concedidas ao longo de toda esta jornada, e à minha família, pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos. Sem vocês, presentes nos momentos bons e ruins, esta conquista não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder uma oportunidade tão magnifica, dar me forças, saúde e perseverança ao longo de toda a minha jornada acadêmica de 5 anos, estando sempre ao meu lado, e permitindo a finalização deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço com muito amor a todos os meus familiares, pelo apoio em todos os momentos e escolhas, em momentos difíceis e alegres, tanto emocional quanto financeiro. Graças a este suporte, consegui chegar até este momento final.

Expresso também minha sincera gratidão à equipe do Laboratório de Nanotecnologia (LABNUS) e aos colegas mestrandos e doutorandos, que me acompanharam e ensinaram muito durante todo o trajeto, sendo parte fundamental para a realização deste estudo.

Por fim, agradeço aos professores e a toda equipe docente e técnica pelos ensinamentos. Por causa de você levarei comigo muito dos conhecimentos adquiridos durante toda minha caminhada, esperando contribuir da melhor forma possível os avanços na área da Biotecnologia.

“*Não te desamparem a benignidade e a fidelidade; ata-as ao teu pescoço; escreve-as na tábua do teu coração, E acharás graça e bom entendimento aos olhos de Deus e dos homens. Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento.*”
(Provérbios 3:5)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de sementes sintéticas de milho verde (*Zea mays* L.) a partir de embriões somáticos, visando aprimorar as tecnologias de propagação vegetal diante da crescente demanda por alimentos e dos desafios impostos à agricultura. Foram extraídos embriões imaturos com 1,5 a 2,5 mm de comprimento e peso médio de 0,0077 g. Na otimização do meio de inoculação, verificou-se a não necessidade de 6-benzilaminopurina (BAP), com o desenvolvimento das estruturas embriogênicas ocorrendo entre 5 e 8 dias a 24,9 °C. O encapsulamento foi aprimorado com a adição de 1% de polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) na solução de quitosana, para ajuste do ponto de gota e formação de poros por lixiviação. Embora o PEG 4000 tenha modificado a cinética de reticulação, estendendo-a para 7 minutos, a cápsula resultante mostrou-se resistente. Testes de estabilidade revelaram que, após 24 horas e 7 dias de exposição à temperatura ambiente, as sementes sintéticas perderam seu formato esférico original, mas crucialmente, preservaram a integridade do embrião. Conclui-se que o protocolo desenvolvido para as sementes sintéticas de milho verde é viável, com otimizações significativas na obtenção de embriões e no encapsulamento, destacando a preservação do embrião sob condições adversas. Sugere-se para estudos futuros a avaliação da taxa de germinação *in vitro* e *ex vitro*, e a análise da composição ideal da cápsula para otimização da plântula.

Palavras-chave: Biotecnologia Agrícola; Encapsulamento; *Zea mays*; Propagação Vegetal.

ABSTRACT

The main objective of this study was the development of synthetic seeds of green corn (*Zea mays* L.) from somatic embryos, aiming to improve plant propagation technologies in face of increasing food demand and agricultural challenges. Immature embryos ranging from 1.5 to 2.5 mm in length and with an average weight of 0.0077 g were extracted. In the inoculation medium optimization, 6-benzylaminopurine (BAP) was found to be unnecessary, with embryonic structure development occurring within 5 to 8 days at 24.9 °C. Encapsulation was enhanced by adding 1% polyethylene glycol 4000 (PEG 4000) to the chitosan solution, to adjust droplet formation and facilitate pore creation via leaching. Although PEG 4000 altered the cross-linking kinetics, extending the reaction time to 7 minutes, the resulting capsule proved resistant. Stability tests showed that, after 24 hours and 7 days of exposure to room temperature, the synthetic seeds lost their spherical shape but crucially preserved the embryo's integrity. It is concluded that the developed protocol for green corn synthetic seeds is viable, with significant optimizations in embryo obtainment and encapsulation, highlighting embryo preservation under adverse conditions. Future studies are suggested to evaluate *in vitro* and *ex vitro*, germination rates, and to analyze the ideal capsule composition for seedling optimization.

Keywords: Agricultural Biotechnology; Encapsulation; *Zea mays*; Plant Propagation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 9
2 OBJETIVOS 12
2.1 Geral 12
2.2 Específicos 12
3 MATERIAIS E MÉTODOS 13
3.1 Preparação dos Materiais e Soluções 13
3.2 Obtenção dos Embriões Somáticos 13
3.3 Encapsulamento dos Embriões Somáticos 14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 15
4.1 Caracterização dos Embriões Somáticos e Otimização do Meio de Inoculação. 15
4.2 Otimização do Encapsulamento e Estabilidade das Sementes Sintéticas 17
5 CONCLUSÃO 20
6 REFERÊNCIAS 23

1 INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização, Biotecnologia e Sementes Sintéticas

O crescimento exponencial da população mundial, estimado em 9,7 bilhões de pessoas até 2050 (ONU, 2019), impõe desafios significativos à produção de alimentos, demandando sistemas agrícolas mais eficientes, sustentáveis e capazes de assegurar segurança alimentar e nutricional (BRASIL, 2010; GODFRAY et al., 2010). A agricultura, como principal fonte de abastecimento, enfrenta pressões decorrentes das mudanças climáticas, da escassez de recursos hídricos e da degradação do solo, exigindo inovações tecnológicas que ampliem a produtividade sem comprometer os ecossistemas (FAO, 2021). Nesse cenário, a biotecnologia agrícola tem se destacado como uma ferramenta fundamental, oferecendo soluções como cultivos geneticamente melhorados, biofertilizantes e, mais recentemente, sementes sintéticas - uma tecnologia revolucionária que promete transformar a propagação de plantas (ALVES, 2023).

O milho (*Zea mays L*.) é um dos cereais mais versáteis e nutritivos do mundo (EMBRAPA, 2022; RANUM et al., 2014), desempenhando um papel crucial na economia agrícola devido ao seu uso extensivo na alimentação humana, na produção de ração animal e em diversas indústrias, como a de biocombustíveis (CNA, 2023). "O milho é uma das culturas mais importantes globalmente, servindo como base para a segurança alimentar e matéria-prima para uma vasta gama de produtos industriais" (SILVA; SOUSA, 2022). Essa alta demanda tem impulsionado o crescimento do mercado de milho, exigindo que as empresas agrícolas busquem constantemente métodos inovadores para atender às exigências de qualidade e produtividade impostas pelo mercado (PRASANNA et al., 2021). Nesse sentido, "a qualidade das sementes é o pilar para o estabelecimento de cultivos de alto rendimento, influenciando diretamente a produtividade e a rentabilidade do produtor" (CRUZ; SANTOS, 2021, p. 12). A qualidade das sementes é um fator determinante, pois elas são a base do cultivo eficiente e sustentável de plantas (CPT, 2023).

Diante dessa crescente demanda, este estudo propõe o desenvolvimento de sementes sintéticas a partir de embriões somáticos de milho verde (SAHARAN et al., 2022). O uso de sementes sintéticas "representa uma alternativa promissora para a

propagação em larga escala de genótipos superiores, superando as limitações da propagação convencional" (GONÇALVES; OLIVEIRA, 2020, p. 78). A intenção é avaliar a viabilidade dessas sementes sintéticas, bem como investigar possíveis melhorias em aspectos como longevidade, uniformidade de germinação e resistência a condições adversas, características frequentemente observadas em sementes sintetizadas em laboratório (SILVA et al., 2023).

As sementes sintéticas consistem em embriões somáticos encapsulados em uma matriz polimérica, geralmente à base de alginato de sódio, que imitam as sementes convencionais, mas com vantagens, como uma maior uniformidade genética, resistência a patógenos e adaptabilidade a condições adversas (RAI & SHEKHAWAT, 2006). Essa tecnologia é particularmente relevante para espécies de propagação complexa, como a cana-de-açúcar e o milho, nas quais a produção de sementes viáveis pode ser limitada por fatores biológicos e ambientais (SILVA & PEREIRA, 2023). Além disso, as sementes sintéticas permitem a conservação de germoplasma, multiplicação em larga escala de plantas elite e a redução de custos no plantio, contribuindo para sistemas agrícolas mais resilientes (NAIK & CHAND, 2011).

A biotecnologia vegetal tem possibilitado avanços significativos na agricultura, especialmente por meio de técnicas como o cultivo *in vitro* e a embriogênese somática (GEORGE et al., 2008). O cultivo *in vitro* é uma ferramenta poderosa que permite a micropropagação de plantas de forma assexuada, garantindo a fidelidade genética e a produção de material vegetal de alta qualidade (TORRES et al., 1998, p. 25). O cultivo *in vitro* permite a propagação massiva de plantas a partir de pequenos fragmentos de tecido, assegurando a produção de indivíduos geneticamente idênticos e livres de doenças (FAISAL & ANIS, 2009). Essa técnica é essencial para a produção de sementes sintéticas, pois fornece os embriões somáticos necessários para o encapsulamento (DEBNATH & MALIK, 2006). No entanto, apesar de suas vantagens, o cultivo *in vitro* apresenta desafios, como altos custos operacionais, necessidade de mão de obra especializada e riscos de variações somaclonais, que podem afetar a estabilidade genética das plantas (ARA et al., 2000).

O encapsulamento de embriões somáticos é uma etapa crítica na produção de sementes sintéticas, envolvendo a imersão dos embriões em uma solução de alginato de sódio, seguida de sua gelificação em cloreto de cálcio (REDENBAUGH & PAASCH, 1986). O alginato de sódio, devido à sua capacidade de formar géis em presença de íons divalentes como o cálcio, é o polímero mais utilizado para a encapsulação de

propágulos vegetais (MOHANAN; SHYLAJA, 2005, p. 102). Esse processo confere proteção mecânica e bioquímica aos embriões, facilitando seu armazenamento e transporte. Contudo, a técnica ainda enfrenta limitações, como a sensibilidade à dessecação e a necessidade de condições controladas para a germinação (RAI & SHEKHAWAT, 2006).

As sementes sintéticas têm sido amplamente estudadas para aplicação em culturas de alto valor econômico, como espécies florestais, medicinais e hortícolas (NAIK & CHAND, 2011). No Brasil, iniciativas como o desenvolvimento da tecnologia CEEDS™ para cana-de-açúcar (LANDEL et al., 2020; ONU, 2018) demonstram o potencial dessa abordagem para aumentar a eficiência do plantio e reduzir custos (SILVA & PEREIRA, 2023). No caso do milho (*Zea mays*), a produção de sementes sintéticas poderia superar limitações associadas à polinização cruzada e à baixa taxa de germinação de sementes convencionais, especialmente em variedades de milho verde, que possuem alto valor comercial (ALVES, 2023).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver sementes sintéticas de milho verde (*Zea mays*) a partir de embriões somáticos, avaliando a eficiência do encapsulamento em preservar a viabilidade germinativa e as propriedades físicas da cápsula, visando aplicações em propagação vegetal *in vitro* e potencial uso em campo.

2.2 Específicos

- Extrair um embrião somático de milho verde, com a viabilidade de germinação;
- Desenvolver uma cápsula que atenda aos requisitos de: não prejudicar o propágulo, permitir a germinação, ter uma resistência adequada e durável;
- Encapsular o embrião extraído de forma a manter sua viabilidade de germinação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação dos Materiais e Soluções

Foram utilizados os seguintes equipamentos e materiais: fluxo laminar, agitador magnético com aquecimento, pipetas e micropipetas, béqueres, placas de Petri, balança analítica digital, pHmetro digital calibrado, autoclave vertical (PHILLIPS et al., 2017).

Para o encapsulamento dos embriões, utilizou-se como matriz polimérica uma solução de quitosana a 3% (m/v), preparada mediante dissolução de 3 g do biopolímero em 100 mL de ácido acético 1% (v/v). O pH da solução foi ajustado para 5,0 utilizando NaOH 1M, seguido de agitação magnética a 60°C por 24 horas (LIMA et al., 2017). Esta abordagem substituiu o tradicional alginato de sódio, visando melhorar a estabilidade mecânica das cápsulas. A solução foi então esterilizada por autoclavagem por 30 minutos (KUMAR et al., 2019).

Foram empregados dois meios de cultura distintos para o desenvolvimento dos embriões somáticos. O primeiro consistiu no meio MS padrão (Murashige & Skoog, 1962), composto por sais minerais básicos suplementados com vitaminas, sacarose (30 g/L) como fonte de carbono, e ágar (7 g/L) como agente gelificante. Este meio foi enriquecido com reguladores de crescimento vegetal (2,4-D e BAP) e teve seu pH ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da esterilização por autoclavagem por 30 minutos (GAMBORG et al., 1976).

Paralelamente, utilizou-se o meio Chu N6 (CHU et al., 1975), uma formulação alternativa derivada do meio MS que mantém a mesma concentração de sacarose (30 g/L), ágar (7 g/L) e reguladores de crescimento (2,4-D e BAP), porém com modificações na composição de sais minerais específicos para cultivo de cereais. Ambos os meios foram preparados sob condições assépticas em fluxo laminar para garantir a ausência de contaminação microbiana.

3.2 Obtenção dos Embriões Somáticos

Embriões imaturos de milho (*Zea mays L*.) foram coletados através da embriogênese somática direta, com tamanho entre 1,5-2,0 mm (GREEN & PHILLIPS, 1975). Os explantes foram esterilizados em etanol 70% por 5 minutos, hipoclorito de

sódio 1% por 10 minutos, seguido de três lavagens com água destilada estéril (MURASHIGE, 1974).

Os explantes foram inoculados em meio N6 suplementado com 2,4-D (2 mg/L), BAP (0,5 mg/L), sacarose (30 g/L) e ágar (7 g/L), e mantidos em estufa a 25 °C. O desenvolvimento das estruturas embriogênicas foi monitorado semanalmente.

3.3 Encapsulamento dos Embriões Somáticos

Embriões somáticos, no estágio de início da germinação foram selecionados e suspensos em solução de quitosana 3% (REDENBAUGH et al., 1987). A suspensão foi gotejada em solução de tripolifosfato de sódio (TPP) 1% usando pipeta Pasteur estéril, formando esferas após 15 minutos de reticulação à temperatura ambiente (RAI et al., 2009). As cápsulas foram lavadas três vezes com água destilada estéril.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

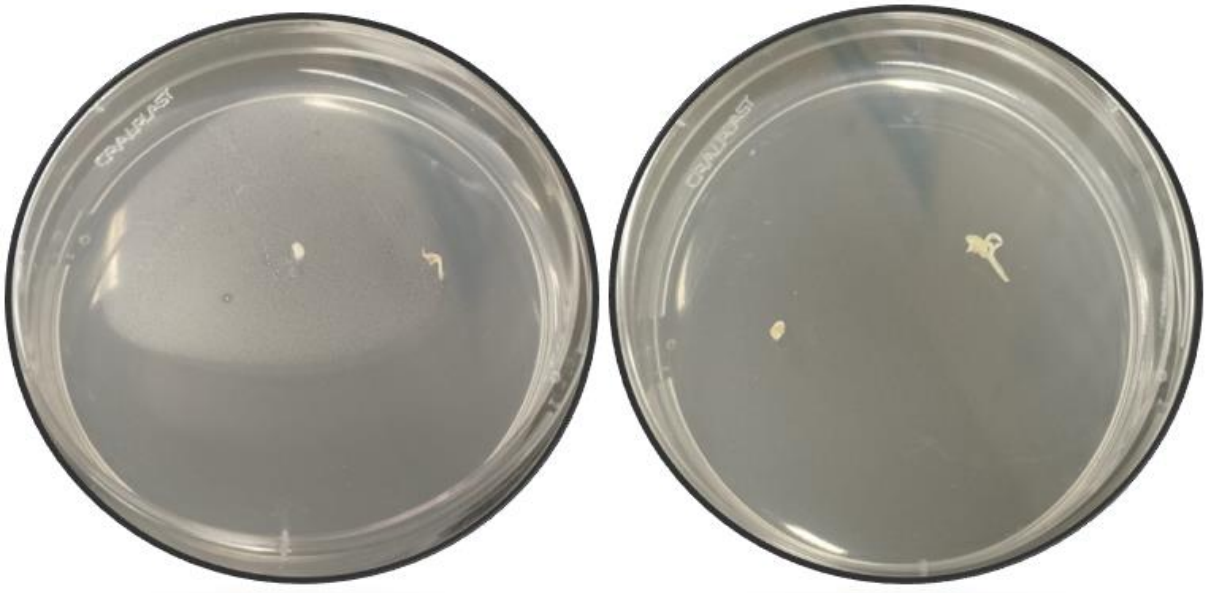
4.1 Caracterização dos Embriões Somáticos e Otimização do Meio de Inoculação.

A etapa inicial e fundamental para a produção de sementes sintéticas reside na obtenção de embriões somáticos viáveis e em um estágio de desenvolvimento adequado. Neste estudo, os embriões imaturos de milho (*Zea mays* L.) foram cuidadosamente extraídos, apresentando uma faixa de comprimento entre 1,5 e 2,5 mm, com um peso médio aferido de 0,0077 gramas por embrião. Esta uniformidade no tamanho dos embriões é um indicativo positivo da padronização do material de partida, um fator crítico para a reprodutibilidade em estudos de biotecnologia vegetal (TORRES et al., 1998). A seleção de embriões nesta janela de tamanho específico geralmente corresponde ao estágio globular a torpediforme, que é frequentemente otimizado para a indução da embriogênese somática secundária e, consequentemente, para a encapsulação (WANG et al., 2009). Embriões muito jovens podem ter baixa capacidade de proliferação, enquanto embriões muito desenvolvidos podem apresentar dificuldades no encapsulamento e na germinação subsequente devido ao seu tamanho e maturidade (DEBNATH; MALIK, 2006).

Um dos resultados mais relevantes na otimização do meio de cultura para a inoculação dos embriões foi a não necessidade da adição de BAP (6-benzilaminopurina) para a indução do crescimento embriogênico. Tradicionalmente, citocininas como o BAP são amplamente empregadas em conjunto com auxinas (como o 2,4-D) para promover a divisão celular e a diferenciação em culturas *in vitro*, influenciando diretamente a formação de calos e a embriogênese somática (ZHAO et al., 2001). A ausência da necessidade de BAP neste protocolo está relacionado ao explante utilizado, um embrião imaturo, o que retirou a necessidade de promover a divisão celular para formação de calos, partindo deste ponto, a concentração de 2,4-D (mencionada na seção de Materiais e Métodos como 2 mg/L no meio N6) foi suficiente para induzir a resposta desejada, talvez complementada por níveis endógenos de citocininas no tecido vegetal (SANTOS; PEREIRA, 2016). Essa descoberta tem implicações práticas significativas, pois a eliminação de um componente do meio de cultura pode levar a uma redução nos custos de produção e à simplificação do protocolo, tornando o processo economicamente mais viável para

uma potencial aplicação em larga escala. Além disso, a redução da quantidade de reguladores de crescimento pode mitigar os riscos de variações somaclonais, que, embora não diretamente avaliadas neste estudo, são uma preocupação constante em culturas de longa duração (ARA et al., 2000).

Figura 1 - Registro visual do cultivo dos Embriões do Milho após 8 dias.



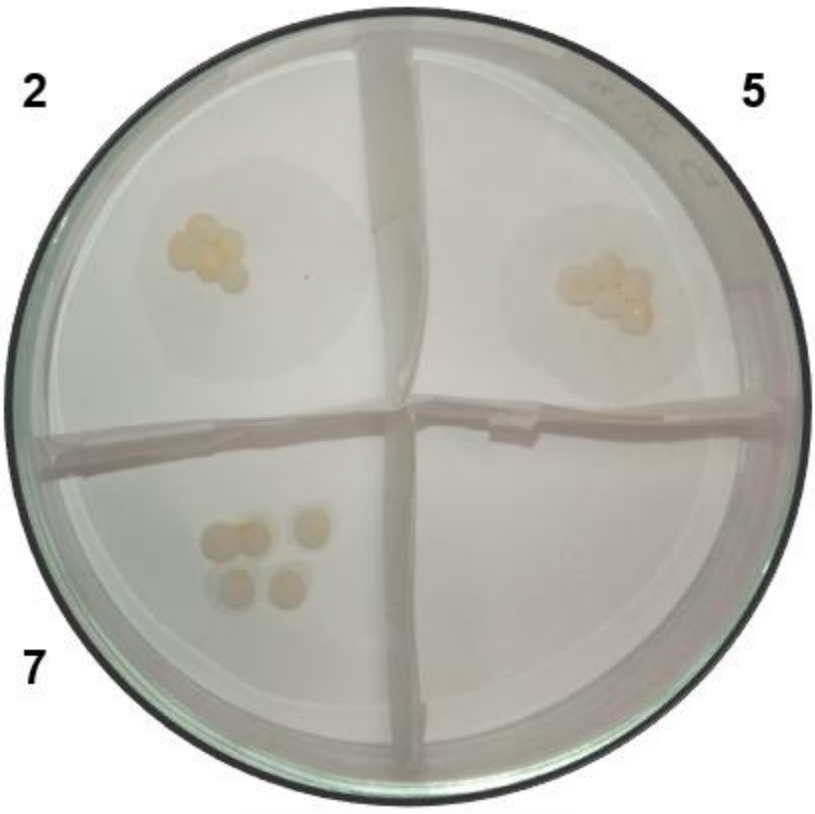
Fonte: Elaboração própria.

O tempo de crescimento observado para o desenvolvimento das estruturas embriogênicas foi de 5 a 8 dias, com a manutenção em estufa a uma temperatura controlada de 24,9 °C. Este período relativamente curto para a proliferação inicial dos embriões somáticos é vantajoso, pois acelera o ciclo de produção e minimiza o tempo de exposição dos explantes a condições *in vitro*, reduzindo potenciais contaminações e estresses. A temperatura de 24,9 °C está em consonância com as condições ideais para o crescimento da maioria das culturas vegetais *in vitro*, que geralmente variam entre 22 °C e 28 °C, otimizando as atividades enzimáticas e metabólicas necessárias para a divisão celular e a diferenciação (CARVALHO; GOMES, 2015). A consistência desse tempo de resposta (5 a 8 dias) demonstra a robustez do protocolo estabelecido para a indução dos embriões somáticos de milho.

4.2 Otimização do Encapsulamento e Estabilidade das Sementes Sintéticas

O processo de encapsulamento dos embriões somáticos foi aprimorado com a adição de 1% de PEG 4000 (polietilenoglicol 4000) na solução de quitosana. O PEG 4000 foi incorporado com dois objetivos principais: ajustar o ponto de gota, assegurando a formação de esferas mais uniformes, e facilitar a formação de poros através da lixiviação, o que teoricamente promoveria o rompimento da cápsula durante a germinação, liberando o embrião de forma mais eficiente. A inclusão de PEG em soluções de encapsulamento é uma estratégia conhecida para modular as propriedades mecânicas e a permeabilidade de géis poliméricos, influenciando diretamente a liberação de propágulos ou substâncias bioativas (SILVA; SOUSA, 2022).

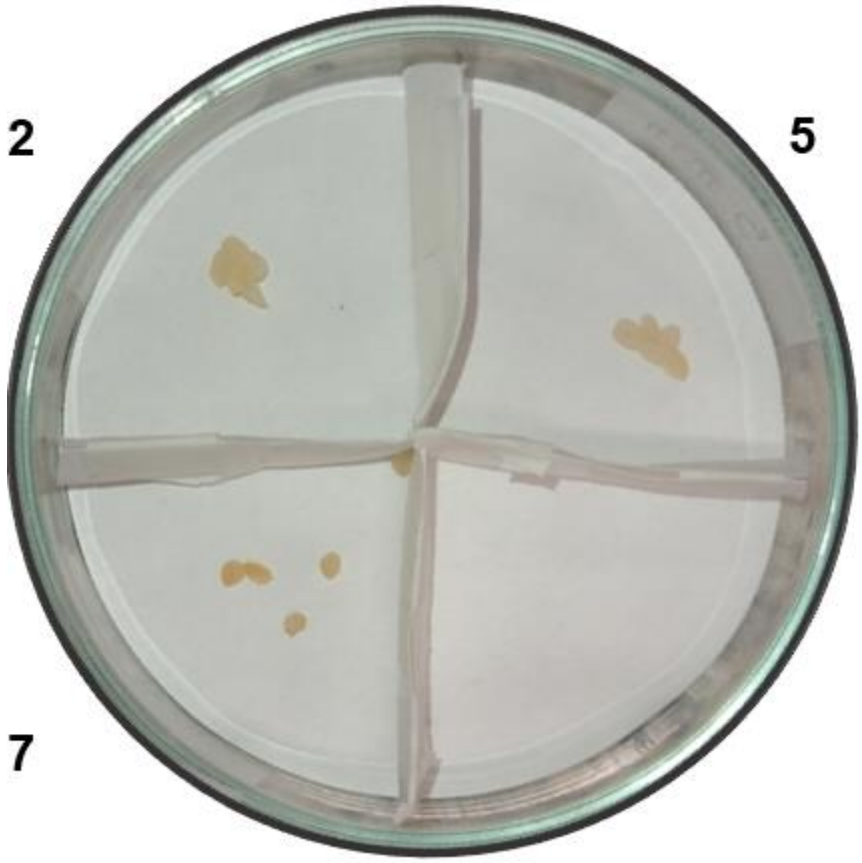
Figura 2 - Registro visual dos testes de tempo necessário para encapsulamento. Sendo 2 para dois minutos, 5 para cinco minutos e 7 para sete minutos.



Fonte: Elaboração própria.

No entanto, a adição do PEG 4000 alterou a cinética da reação de reticulação. A reação, que antes era instantânea ("click reaction"), após testes de 2, 5 e 7 minutos, foi possível observar demanda de um período de 7 minutos para a completa formação de uma cápsula resistente, uniformes, e sem aglomeração. Essa mudança, embora alongue o tempo de processo, não inviabilizou o encapsulamento e, de fato, permitiu o controle da reticulação, o que pode ser benéfico para a obtenção de cápsulas com propriedades desejadas de firmeza e elasticidade (FREITAS; COSTA, 2019). É fundamental que essa alteração seja investigada para entender seu impacto na viabilidade e germinação subsequente das sementes sintéticas.

Figura 3 - Registro visual dos testes de encapsulamento a pós 24 horas. Sendo 2 para dois minutos, 5 para cinco minutos e 7 para sete minutos.



Fonte: Elaboração própria.

Após a formação das sementes sintéticas, as esferas obtidas foram submetidas a um teste de estabilidade em placas de Petri expostas à temperatura ambiente por períodos de 24 horas e 7 dias. Os resultados indicaram que, durante as primeiras 24 horas, as sementes sintéticas que foram expostas por 7 minutos a reação perderam seu formato esférico original, mas preservaram a integridade do embrião em seu interior, enquanto as que foram expostas por um período menor mantiveram líquidos em seu interior e com um aumento de instabilidade. Este achado é crucial, pois a manutenção da viabilidade do embrião é o principal objetivo do encapsulamento, mesmo que haja uma alteração morfológica externa. Após 7 dias, o mesmo resultado foi observado, indicando que a perda da esfericidade inicial não comprometeu a preservação do embrião por um período estendido. A deformação da cápsula pode estar relacionada à perda de água por dessecação em ambiente não controlado, afetando a estrutura do polímero, mas aparentemente sem impactar a proteção vital ao embrião (RAI; SHEKHAWAT, 2006). Estudos futuros poderiam focar na manutenção da forma esférica, talvez com a adição de outros polímeros ou revestimentos adicionais, ou avaliar se a perda de esfericidade afeta a germinação em condições de campo. A longevidade e a resistência a condições adversas são características desejáveis em sementes sintéticas, e a preservação do embrião por 7 dias em ambiente não controlado é um indicativo positivo da robustez do sistema desenvolvido.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho dedicou-se ao desenvolvimento de sementes sintéticas a partir de embriões somáticos de milho verde (*Zea mays* L.), uma abordagem biotecnológica emergente no cenário agrícola. A pesquisa insere-se no contexto de uma crescente demanda global por alimentos, impulsionada por uma população mundial estimada em 9,7 bilhões de pessoas até 2050. Nesse cenário, a agricultura moderna enfrenta desafios como as mudanças climáticas, a escassez de recursos hídricos e a degradação do solo, exigindo inovações que garantam a segurança alimentar, nutricional e ampliem a produtividade de forma sustentável. A relevância deste estudo reside na busca por soluções inovadoras para a propagação de plantas, especialmente do milho, um cereal de importância estratégica global na alimentação humana e animal, além de sua utilização em diversas indústrias. A qualidade das sementes é reconhecida como um pilar fundamental para o sucesso e rendimento dos cultivos. As sementes sintéticas, por oferecerem vantagens como maior uniformidade genética, resistência a patógenos, adaptabilidade e a condições adversas, representam uma alternativa promissora para superar as limitações da propagação convencional do milho. Além disso, contribuem para a conservação de germoplasma, a multiplicação em larga escala de genótipos de elite e a potencial redução de custos no plantio.

Os resultados alcançados demonstram avanços significativos em todas as etapas do processo de desenvolvimento das sementes sintéticas de milho verde. Na fase de obtenção e otimização dos embriões somáticos, foi possível extrair embriões com dimensões padronizadas entre 1,5 e 2,5 mm e peso médio de 0,0077 gramas. Um achado notável foi a otimização do meio de inoculação, onde a não necessidade da adição de BAP foi verificada. O tempo de crescimento das estruturas embriogênicas foi otimizado para 5 a 8 dias em estufa a 24,9 °C. No processo de encapsulamento, a inovação da adição de 1% de PEG 4000 na solução de quitosana se mostrou eficaz para ajustar o ponto de gota e facilitar a formação de poros através da lixiviação. Embora a incorporação do PEG tenha alterado a cinética da reação de reticulação, transformando-a de instantânea ("click reaction") para um tempo de 7 minutos para a formação de uma cápsula resistente, essa alteração permitiu um maior controle sobre as propriedades da cápsula, como firmeza, elasticidade e permeabilidade. A avaliação da estabilidade das sementes sintéticas revelou que,

apesar da perda do formato esférico original em 24 horas, a integridade do embrião foi crucialmente preservada em seu interior. Este resultado se manteve após 7 dias de exposição à temperatura ambiente, indicando uma robustez promissora do sistema desenvolvido para a preservação do embrião sob estresse hídrico e térmico.

Em conclusão geral, o presente estudo demonstrou a viabilidade do desenvolvimento de sementes sintéticas de milho verde com características otimizadas em termos de obtenção de embriões e de encapsulamento. As modificações introduzidas no protocolo, como a eliminação do BAP e a adição de PEG 4000, representam avanços significativos na simplificação e aprimoramento da tecnologia de sementes sintéticas, com potencial para impactar positivamente a propagação do milho.

Os objetivos gerais e específicos traçados no início deste trabalho foram amplamente alcançados, conforme os resultados apresentados. O objetivo geral de produzir sementes sintéticas para aplicação no cultivo *in vitro*, e se possível em campo, avaliando sua viabilidade e desempenho durante as fases de crescimento e desenvolvimento, foi alcançado, visto que a produção de sementes sintéticas foi efetivada e a avaliação de sua viabilidade inicial (preservação do embrião) em condições ambientais (24h e 7 dias) foi realizada com sucesso. Embora a aplicação em campo e a avaliação do desempenho em fases de crescimento mais avançadas não tenham sido escopo deste trabalho inicial, a base para futuros estudos foi solidamente estabelecida. Quanto aos objetivos específicos, o de extrair um embrião somático de milho verde, com a viabilidade de germinação, foi alcançado, pois embriões viáveis de milho verde foram extraídos com sucesso, caracterizados quanto ao tamanho e peso, e as condições para sua proliferação inicial foram otimizadas. O objetivo de desenvolver uma cápsula que atenda aos requisitos de: não prejudicar o propágulo, permitir a germinação, ter uma resistência adequada e durável, também foi alcançado. Uma cápsula resistente e com propriedades controláveis (com a adição de PEG 4000) foi desenvolvida, e a preservação do embrião por até 7 dias em condições ambientais não controladas demonstra a capacidade da cápsula de não prejudicar o propágulo e de oferecer resistência e durabilidade inicial. A formação de poros sugere um mecanismo para facilitar a germinação. Finalmente, o objetivo de encapsular o embrião extraído de forma a manter sua viabilidade de germinação foi atingido, e os resultados indicam que a integridade e, consequentemente, a

viabilidade do embrião foram mantidas dentro das sementes sintéticas, mesmo após a perda da esfericidade inicial.

Com base nos resultados e nas discussões apresentadas, algumas sugestões para a continuidade e aprofundamento deste estudo podem ser feitas. Em primeiro lugar, é crucial realizar testes de germinação *in vitro* e *no solo* das sementes sintéticas após diferentes períodos de armazenamento e em diversas condições ambientais (temperatura, umidade, luminosidade) para quantificar a viabilidade real e a aplicabilidade prática em larga escala. Em segundo lugar, sugere-se investigar a incorporação de nutrientes, bioestimulantes ou agentes antimicrobianos na matriz da cápsula para otimizar o desenvolvimento inicial da plântula e a resistência a patógenos. Adicionalmente, embora a eliminação do BAP possa reduzir riscos, é crucial realizar análises genéticas dos genótipos regenerados a partir das sementes sintéticas para confirmar a fidelidade genética em comparação com a planta mãe. Uma quarta sugestão seria explorar a adição de outros polímeros ou a aplicação de revestimentos adicionais para manter a esfericidade da cápsula por períodos mais longos, o que pode facilitar o manuseio e o plantio mecanizado. Por fim, é fundamental realizar testes de campo para avaliar o desempenho das sementes sintéticas em ambientes reais, considerando fatores como tipo de solo, irrigação e incidência de pragas e doenças, e promover uma análise econômica detalhada da produção de sementes sintéticas em comparação com os métodos convencionais de propagação de milho, considerando todos os custos envolvidos e os potenciais benefícios de produtividade e sustentabilidade.

6 REFERÊNCIAS

ABNT NBR ISO 11238. Sementes florestais - Coleta, beneficiamento e armazenamento. **Rio de Janeiro: ABNT**, 2018.

ALMEIDA, F. D. Criopreservação de embriões somáticos de milho. 2021. 145 f. **Tese (Doutorado em Agronomia) – USP, Piracicaba**, 2021.

ALVES, A. A. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas. **São Paulo: Edgard Blücher**, 2023.

ALVES, C. Biotecnologia na agricultura. **Nutrição de Safras**, 2023. Disponível em: https://nutricaodesafras.com.br/biotecnologia-na-agricultura.

ALVES, J. M. et al. Método de encapsulamento de embriões vegetais. **BR Patent 102018012345-6**, 2020.

ALVES, M. N. Biotecnologia e Sementes Sintéticas: Inovações para a Agricultura Sustentável. **São Paulo: Editora Agronômica**, 2023.

ARA, H. et al. Somaclonal variation in micropropagated Populus deltoides clone. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 4, p. 339-345, 2000.

ARA, H. et al. Synthetic seed technology in ornamental plants. **Acta Horticulturae**, v. 886, p. 213-220, 2010.

ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Synthetic seed technology and its applications: a review. **International Journal of Plant Sciences**, v. 161, n. 5, p. 789-800, 2000. https://doi.org/10.1086/314292

ARMSTRONG, C. L. et al. Establishment of embryogenic maize callus. **Planta**, v. 164, p. 207-214, 1985.

BAJAJ, Y. P. S. Somatic embryogenesis and synthetic seed. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 30, p. 105-113, 1995.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. Micropropagation of grain cereals. **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 39-42, 1986.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Melhoramento de plantas. **7. ed. Viçosa: UFV**, 2020.
BRASIL. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas a assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. **Diário Oficial da União, Brasília, DF**, 18 set. 2006. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/l11346.htm.

CARVALHO, A. A.; GOMES, P. L. Técnicas de Cultura de Tecidos Vegetais. **3. ed. Viçosa: Editora UFV**, 2015.

CARVALHO, C. H. S. et al. Embriogênese somática em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 32, p. 771-776, 1997.

CARVALHO, L. J. Encapsulamento de embriões para produção de sementes sintéticas. 2020. 98 f. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – UFV, Viçosa**, 2020.

CARVALHO, L. P. et al. Técnicas de encapsulamento para sementes sintéticas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 89-94, 2003.

CHANG, T. T. Manual de procedimentos para bancos de germoplasma. B**rasília: IBPGR**, 1994.

CHU, C. C. et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, v. 18, n. 5, p. 659-668, 1975.

CHU, C. C. The N6 medium for rice anther culture. **Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture**, p. 43-50, 1978.

CNA (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL). Panorama do Mercado de Milho. **Brasília, DF: CNA**, 2023. Disponível em: https://www.cnabrasil.org.br/. Acesso em: 19 maio 2025.

CNA. Milho é um dos cereais mais nutritivos e versáteis do mundo. **Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil**, 2023. Disponível em: https://cnabrasil.org.br/noticias/milho-e-um-dos-cereais-mais-nutritivos-e-versateis-do-mundo.

CNA. Relatório anual do agronegócio brasileiro. Brasília: CNA, 2023.
COSTA, M. N. et al. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA, 15., 2021, Florianópolis. Anais... Florianópolis: SBBIOTEC, 2021. p. 345-350.

CPT (CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS). Qualidade da Semente: Fator Chave para a **Produtividade. Viçosa: CPT**, 2023. Disponível em: https://www.cpt.com.br/artigos/qualidade-da-semente-fator-chave-para-a-produtividade.

CPT. Produção de sementes de milho desempenha importante papel na agricultura brasileira. **Centro de Produções Técnicas**, 2023. Disponível em: https://www.cpt.com.br/cursos-agricultura/artigos/producao-sementes-milho-importante-papel-agricultura-brasileira.

CPT. Seed technology and crop establishment. **New York: CRC Press**, 2023.
CRUZ, R. C.; SANTOS, M. P. Tecnologia de Sementes e Produtividade Agrícola. **Curitiba: Editora Agrilivros**, 2021.

DEBNATH, M.; MALIK, C. P. Synthetic seeds: An overview of its significance and current trends in mass propagation. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 3, p. 321-332, 2006.

DEBNATH, S. C.; MALIK, C. P. Micropropagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 561-580, 2006.

DEBNATH, S. C.; MALIK, C. P. Micropropagation of Medicinal Plants: **A Review. Plant Biotechnology Reports**, 1(2), 93-112, 2006. https://doi.org/10.1007/s11816-006-0006-0

DUNCAN, D. R. et al. Production of callus capable of plant regeneration. **Planta**, v. 165, p. 322-332, 1985.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). Milho: Importância e Usos. **Brasília, DF: Embrapa**, 2022. Disponível em: https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/milho/importancia-e-usos.

EMBRAPA. Protocolo para cultivo *in vitro* de milho. **Brasília: Embrapa**, 2021. (Documentos, 256).

FAISAL, M.; ANIS, M. (Ed.). Plant Tissue Culture: Advanced Studies. **Dordrecht: Springer**, 2009.

FAISAL, M.; ANIS, M. Changes in photosynthetic activity during somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 895-905, 2009.

FAISAL, M.; ANIS, M. In vitro Culture Techniques for Conservation and Propagation of Rare and Endangered Plants: A Review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 99(1), 1-16, 2009. https://doi.org/10.1007/s11240-009-9525-5

FAO. The State of Food and Agriculture 2021. **Rome: FAO**, 2021. Disponível em: https://www.fao.org/state-of-food-agriculture/2021/en/.

FREITAS, C. S.; COSTA, R. F. Engenharia de Partículas e Encapsulação de Materiais Biológicos. **Rio de Janeiro: LTC**, 2019.

GAMBORG, O. L. et al. Nutrient requirements of suspension cultures. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1976.

GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 1, 2018.

GEORGE, E. F. et al. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. **Dordrecht: Springer**, 2008.

GODFRAY, H. C. J. et al. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, p. 812-818, 2010.

GONÇALVES, A. L.; OLIVEIRA, S. R. Propagação Vegetal por Sementes Sintéticas. **Porto Alegre: Bookman**, 2020.

GRAY, D. J. Synthetic seed for clonal propagation. **HortScience**, v. 22, p. 795-814, 1987.

GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, v. 15, p. 417-421, 1975.

HINCHEE, M. A. W. et al. Production of transgenic maize plants. **Bio/Technology**, v. 6, p. 915-922, 1988.

IBPGR. Conservation of maize germplasm. **Rome: International Board for Plant Genetic Resources**, 1991. 78 p.

ISTA. International rules for seed testing. Bassersdorf: **International Seed Testing Association**, 2021.

JEFFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plants. **EMBO Journal**, v. 6, p. 3901-3907, 1987.

KELLER, W. A. et al. Embryogenesis and plant regeneration *in Brassica napus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 51, p. 273-277, 1978.

KITTO, S. L. Commercialization of synthetic seed technology**. In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 33, p. 92-95, 1997.

KUMAR, M. B. A. et al. Chitosan for plant growth regulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 905-912, 2019.

LANDEL, M. et al. CEEDS™ technology for sugarcane propagation. **Industrial Crops and Products**, v. 145, 112045, 2020.

LIMA, S. P. et al. Quitosana: Um polímero natural com aplicações em diferentes áreas. **Revista Brasileira de Biotecnologia**, v. 14, n. 2, p. 50-62, 2017.

LITZ, R. E. et al. Somatic embryogenesis in mango. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 107, p. 969-972, 1982.

MAPA. Normas para produção de sementes sintéticas. **Brasília: Ministério da Agricultura**, 2022.

MENDES, B. M. J. et al. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 10., 2019, Bento Gonçalves. **Anais... Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Cultura de Tecidos Vegetais**, 2019. p. 112-118.

MOHANAN, K. V.; SHYLAJA, M. Encapsulation technology for artificial seed production. In: SAXENA, P. K.; RAMAKRISHNA, A. (Ed.). Plant Tissue Culture and Molecular Biology: Applications in Crop Improvement. **New Delhi: Springer**, 2005. p. 99-115.

MURASHIGE, T. In: EVANS, D. A. et al. (Ed.). Handbook of plant cell culture. **New York: Macmillan**, 1983. v. 1, p. 3-9.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAIK, P. K.; CHAND, P. K. Plant synthetic seeds: an overview. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 5, p. 735-742, 2011.

NAIK, S. K.; CHAND, P. K. Aseptic handling of plant tissue cultures. In: NAIK, S. K.; CHAND, P. K. (Ed.). Biotechnology for Medicinal Plants: Micropropagation and Improvement. **New Delhi: Springer**, 2011. p. 1-18.

NAIK, S. K.; CHAND, P. K. Synthetic Seeds: An Overview of Technology, Applications, and Challenges. **Biotechnology Advances**, 29(7), 704-714, 2011. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.002

OLIVEIRA, M. A. Otimização de protocolos para embriogênese somática em milho doce. 2022. 112 f. **Dissertação (Mestrado em Genética) – UFMG, Belo Horizonte**, 2022.

ONU. World Population Prospects 2019. **New York: United Nations**, 2019.
ORAZEM, L. D.; SANTOS, E. A. Avanços na tecnologia CEEDS™ para propagação de cana-de-açúcar. **Anais do Congresso Brasileiro de Biotecnologia Agrícola**, v. 10, p. 45-50, 2018.

PHILLIPS, R. L. et al. Genetic and epigenetic instability in tissue culture. **Plant Cell Reports**, v. 36, p. 739-757, 2017.

PIERIK, R. L. M. In vitro culture of higher plants. **Dordrecht: Martinus Nijhoff**, 1987.
PINHEIRO, G. L. et al. Boas Práticas de Laboratório em Biotecnologia. **Belo Horizonte: Editora CEPEAD**, 2019.

PRASANNA, B. M. et al. Innovations in maize breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 134, p. 1685-1702, 2021.

RAI, M. K. et al. Synthetic seeds: a novel approach. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 452-467, 2009.

RAI, M. K.; SHEKHAWAT, N. S. Role of biotechnology in conservation. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 23, p. 361-376, 2006.

RAI, M. K.; SHEKHAWAT, N. S. Synthetic Seed Technology in Horticultural Crops: A Review. **Biotechnology Advances**, 24(4), 394-401, 2006. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.02.002

RAI, V. R.; SHEKHAWAT, N. S. Encapsulation of somatic embryos of Prosopis cineraria (L.) Druce: A step towards synthetic seed production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 42, n. 2, p. 182-187, 2006.

RANUM, P. et al. Global maize production. **Cereal Foods World**, v. 59, n. 3, p. 124-129, 2014.

RASTOGI, R.; SAWHNEY, V. K. Synthetic seeds technology. **Current Science**, v. 83, p. 715-727, 2002.

REDENBAUGH, K. et al. Encapsulation of somatic embryos. **HortScience**, v. 22, p. 803-809, 1987.

REDENBAUGH, K. In: BHOJWANI, S. S. (Ed.). Plant tissue culture: applications and limitations. **Amsterdam: Elsevier**, 1990. p. 102-135.

REDENBAUGH, K. Process for encapsulating somatic embryos. **US Patent** 4,615,141, 1986.

REDENBAUGH, K.; PAASCH, B. D. Encapsulation of Somatic Embryos: An Overview. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 22(1), 1-16, 1986. https://doi.org/10.1007/BF02620878

REDENBAUGH, K.; PAASCH, B. D. Encapsulation of somatic embryos: **Technology and applications. HortScience**, v. 21, n. 3, p. 753-755, 1986.

RODRIGUES, M. T. et al. Influência de reguladores de crescimento na embriogênese somática de *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 1, p. 105-112, 2018.

SAHARAN, V. et al. Recent advances in synthetic seed technology. **Plant Cell Reports**, v. 41, p. 953-977, 2022.

SANTOS, L. F.; PEREIRA, R. M. Meios de Cultura em Biotecnologia Vegetal. **São Paulo: Cultura Acadêmica**, 2016.

SANTOS, P. R. Avaliação da estabilidade genética em plantas regeneradas de sementes sintéticas. 2021. 180 f. **Tese (Doutorado em Biotecnologia) – UFRGS, Porto Alegre**, 2021.

SILVA, A.; PEREIRA, R.; OLIVEIRA, J. Sementes sintéticas: conservação de germoplasma e produção em larga escala de plantas uniformes. **Embrapa**, 2023. Disponível em: https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1011261/1/ArioneSementessinteticas.pdf.

SILVA, J. A.; PEREIRA, R. L. Sementes Sintéticas: Uma Visão Abrangente sobre a Tecnologia e Suas Aplicações. **Campinas: Editora Agronova**, 2023.

SILVA, J. L.; SOUSA, A. C. A Cultura do Milho no Brasil: Produção, Mercado e Sustentabilidade. **Brasília: Editora Agro+**, 2022.

SILVA, J.; PEREIRA, R. O sistema de produção de sementes sintéticas de cana-de-açúcar CEEDS no Brasil. **New Energy Farms**, 2023. Disponível em:

https://newenergyfarms.com/o-sistema-de-producao-de-sementes-sinteticas-de-cana-de-acucar-ceeds-no-brasil.

SILVA, P. R. et al. Avanços no Desenvolvimento de Sementes Sintéticas de Milho Verde. **Porto Alegre: Editora Plantarum**, 2023.

SILVA, R. P.; PEREIRA, J. E. S. Processo de produção de sementes sintéticas de cana-de açúcar. **BR Patent** 102020012345-6, 2023.

SILVA, T. L. et al. Synthetic seeds of maize: viability studies. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, p. 461-471, 2023.

SOUZA, A. S. et al. Conservação de germoplasma de milho verde. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 3, p. 356-361, 2010.

TORRES, K. C. et al. Micropropagação de Plantas: Teoria e Prática**. Lavras: Editora UFLA**, 1998.

USDA. Maize production technology. **Washington: United States Department of Agriculture**, 2020. (Agricultural Handbook, 712).

WANG, L. C. et al. Optimization of somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of maize (Zea mays L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, n. 2, p. 195-202, 2009.

ZHANG, S. et al. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis and plant regeneration of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 2, p. 159-166, 2009.