

Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos.

Lee, Tseng Ssheng Gerald¹; Bressan, E.A.¹; Corrêa Da Silva, A.D.²; Lee, L.L.³

¹DBV/CCA/UFSCar; ²CanaVialis; ³Agro Lab Plants, E-mail: leetseng@cca.ufscar.br

INTRODUÇÃO

A produção industrial de cana-de-açúcar *in vitro* é uma prática bastante utilizada no Brasil, Cuba e China. É um método biotecnológico já consagrado pelos resultados alcançados com a sua produção de mudas mais saudáveis, mais uniformes e a uma velocidade muito mais rápida do que qualquer método convencional de multiplicação de cana-de-açúcar.

No Brasil, o conceito de biofábrica de cana-de-açúcar começou a ser definido em 1983, pela equipe de LEE, no laboratório de Fisiologia do antigo Planalsucar (IAA/PLANALSUCAR, 1983). Já em 1984, as primeiras plantas produzidas por este laboratório foram plantadas na Fazenda Nova Aliança, região de Ribeirão Preto, interior de São Paulo. Desde então, o processo foi aperfeiçoado e várias usinas resolveram adotá-lo, iniciando assim, a fabricação de suas próprias mudas.

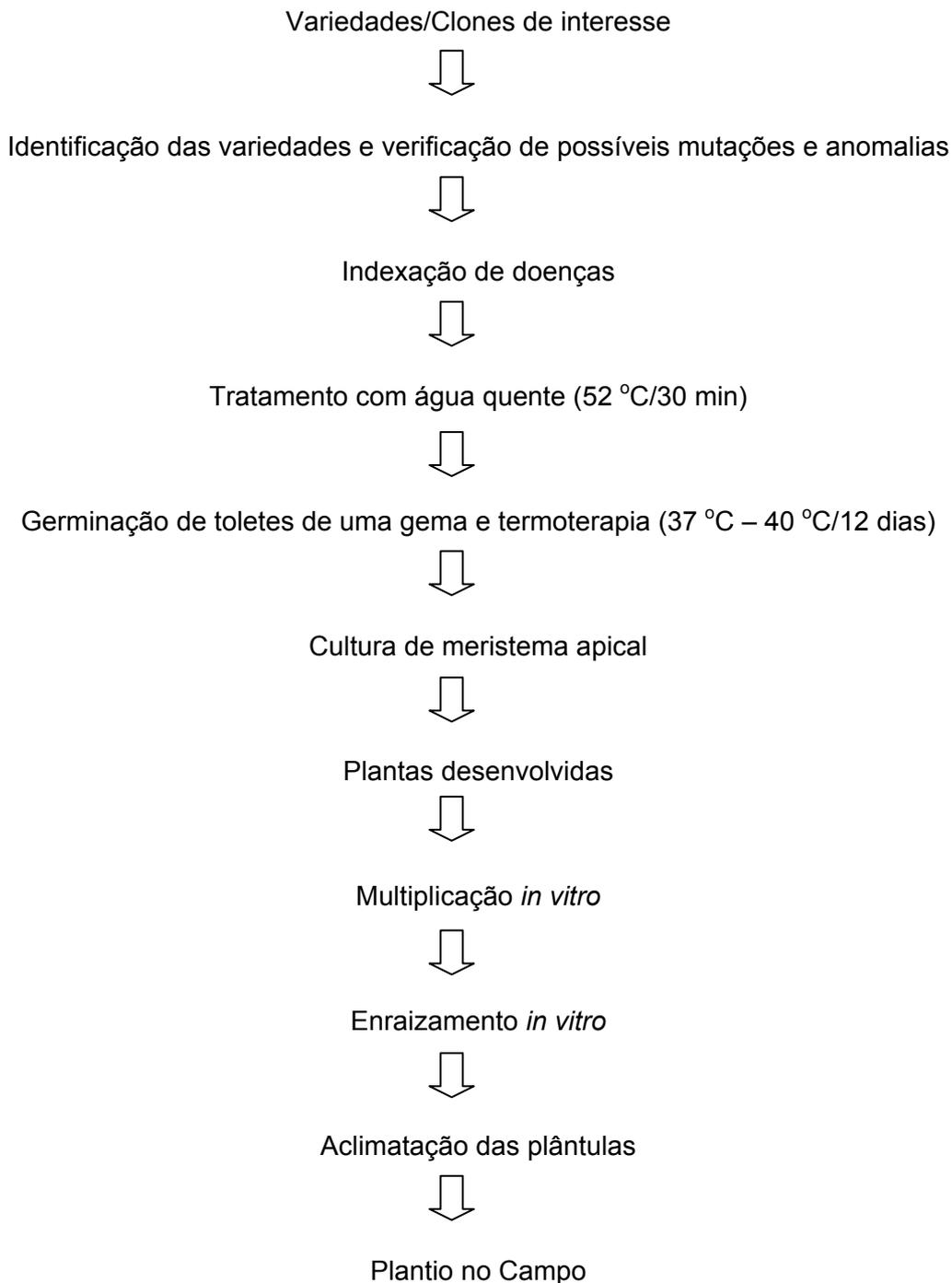
A primeira biofábrica comercial de cana-de-açúcar do Brasil foi instalada em 1987 pela Usina Ester, localizada em Cosmópolis, SP (GUIA RURAL, 1990; INFORMATIVO COOPERCITRUS, 1991). No seu pico de produção, durante os anos 90, esta usina produziu 80.000 plântulas/mês para atender à sua própria demanda, estando também capacitada para vender mudas para outros produtores. Desde então, muitas outras usinas e institutos de pesquisa de cana-de-açúcar têm montado este tipo de biofábrica. Recentemente, a Votorantim Novos Negócios instalou uma biofábrica de cana-de-açúcar em Campinas, a CanaVialis, com área construída de 560 m² e capacidade para produzir 220.000 plântulas por mês.

Em Cuba e na China, as biofábricas de plantas são bastante comuns. Hoje, existem pelo menos 3 biofábricas de cana-de-açúcar em Cuba. São laboratórios que possuem entre 1000 a 2000 m² e capacidade de produção entre 3 a 5 milhões de plântulas/ano. No sul da China há várias biofábricas de cana-de-açúcar. Dentre estas, a maior está localizada no Instituto de cana-de-açúcar (GSRI) que possui em torno de 1000 m² de área construída com produção anual de 1 milhão de plântulas.

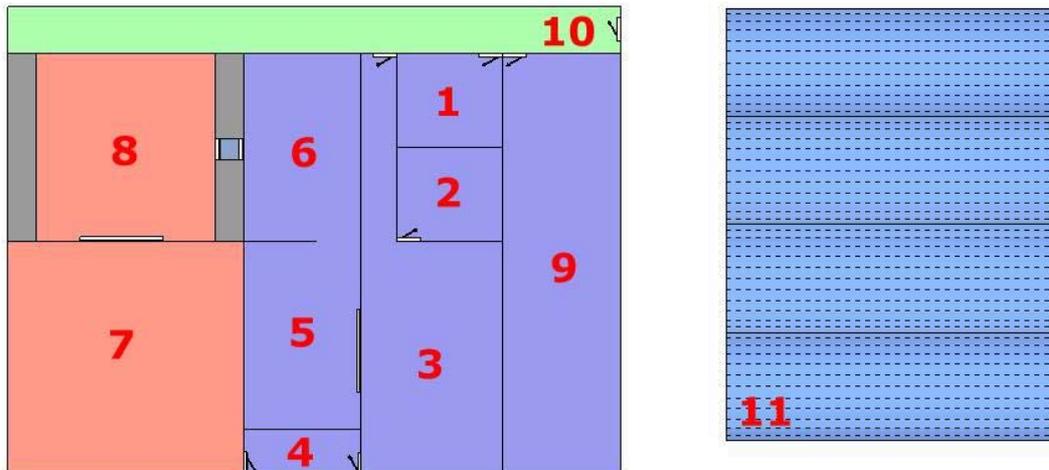
IMPLANTAÇÃO DA BIOFÁBRICA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Biofábrica é um novo conceito de produção de mudas. Conforme o próprio nome indica, ela é uma fábrica que utiliza métodos biotecnológicos para a produção de plantas. Sendo uma fábrica, a produção deve ser em grande escala e todos os processos bem definidos. No caso da cana-de-açúcar, o método utilizado é a da cultura de tecidos de plantas sendo que todas as etapas da cadeia de produção já estão muito bem definidos, permitindo que a produção chegue facilmente a milhões de plantas por ano. Desta forma, a denominação de uma unidade de produção deste tipo como uma biofábrica de cana-de-açúcar é bastante adequada.

A implantação de uma biofábrica é bastante semelhante à de qualquer laboratório de micropropagação de mudas. A grande diferença está na escala e no fluxo de trabalho que deve ser rigorosamente seguido. No caso da cana-de-açúcar, o fluxograma da sua produção é o seguinte:



Portanto, o fluxo de trabalho deve seguir este fluxograma rigorosamente. Normalmente, uma estrutura de único nível é recomendado para que o acesso a todas as áreas da biofábrica seja facilitado. Caso a estrutura possua dois níveis, o andar superior deve ser utilizado para atividades que não estejam diretamente ligadas ao processo de produção técnico em si como por exemplo, escritório, centro de funcionários e outros. A seguir encontra-se uma planta baixa de uma estrutura que obedece ao fluxo de trabalho de uma biofábrica de cana-de-açúcar (Figura 1).



- 1 – Sala da gerência
- 2 – Sala de tratamento térmico e germinação
- 3 – Sala de controle de saída e entrada de plantas
- 4 – Sala para troca de roupas e sapatos
- 5 – Sala de autoclavagem e lavagem
- 6 – Sala de preparo de meio de cultura
- 7 – Sala de cultura
- 8 – Sala de inoculação
- 9 – Laboratório de apoio (confirmações de variedades e indexação de doenças)
- 10 – Corredor
- 11 – Estufas para aclimação de plântulas

Figura 1. Planta baixa de uma estrutura de único nível para uma biofábrica de cana-de-açúcar. As salas consideradas “Áreas Limpas” onde deve haver filtragem e pressão positiva do ar são: 1 – Sala de Inoculação e 2 – Sala de cultura.

MÉTODO DE CULTURA DE TECIDOS PARA BIOFÁBRICA DE CANA-DE-AÇÚCAR

O método de cultura de tecidos para a produção massal de plântulas de cana-de-açúcar já foi descrito por LEE (1984, 1986, 1987, 1988), LEE & BACCHI (1984) e HENDRE et al. (1983) há vários anos. No ano de 1984 este método foi adotado pelo antigo PLANALSUCAR para a produção de mudas de cana-de-açúcar da variedade NA56-79. Os detalhes das operações técnicas podem ser encontrados em trabalhos publicados por LEE (1984, 1987, 1988, 1991). Desde então, o método foi bastante simplificado para conseguir aceitação popular. Uma única solução (MP II) pode ser utilizada no processo todo, embora tenha-se verificado que, quando não se conta com uma boa estrutura de estufa para climatização, a segunda solução (MR) pode ser de grande ajuda para a sobrevivência das plântulas antes de entrarem na aclimatização (Tabela 1).

As etapas do processo são as seguintes:

1. Obtenção de fonte de explantes: envolve o plantio do tolete individual do clone ou variedade desejada, do qual o meristema é extraído. Poucos toletes são necessários para a realização desta etapa. O tolete deve ser lavado e esterilizado em uma solução de hipoclorito comercial a 20% (Cloro ativo: 2 a 5%) por 40 minutos e posto para germinar em incubadora de 37°C a 40°C. São necessários de 12 a 15 dias até que a planta recém-germinada esteja pronta para a etapa seguinte;

Tabela 1. Meio de cultura utilizado para micropropagação de cana-de-açúcar.

	INGREDIENTES	MP II (mg/L)	MR (mg/L)
1.	MACRONUTRIENTES		
	KNO ₃	1900	950
	NH ₄ NO ₃	1650	825
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185
	KH ₂ PO ₄	170	85
2.	MICRONUTRIENTES		
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	18,6
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	13,9
	H ₃ BO ₃	6,2	6,2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
	KI	0,83	0,83
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
3.	VITAMINAS, HORMÔNIOS E OUTROS COMPONENTES ORGÂNICOS		
	Tiamina	1	-
	Inositol	100	-
	Cinetina	0,1	-
	BAP	0,2	-
	Sacarose	20000	20000
4.	pH	5,8	4,0

2. Desenvolvimento de plântulas de meristema: os meristemas podem ser obtidos das fontes (etapa 1), com o auxílio de um microscópio estereoscópico. O tamanho dos meristemas deve ser de 2-3 mm, utilizando-se a solução MP II para seu desenvolvimento. Esta etapa leva 30-45 dias. No preparo da solução MP II deve-se utilizar a solução estoque concentrada (multiplicando-se por 50-100 vezes as quantidades mostradas na Tabela 1). Tubos de ensaios devem ser utilizados nesta etapa;
3. Multiplicação *in vitro*: as plântulas de meristema desenvolvidas passam, então, pela fase de multiplicação. Elas devem ser transferidas para frascos comerciais de 6 x 10 cm, contendo solução MP II. Como esta solução contém reguladores de crescimento, as plântulas apresentam rápido perfilhamento. Em 15 dias, o resultado obtido é cerca de 10 vezes superior ao originalmente transferido para os frascos. Esta etapa pode ser repetida diversas vezes, até que se obtenha a quantidade de plântulas desejada. Geralmente, 3 a 4 meses são suficientes para a obtenção de material suficiente para o plantio de vários hectares;
4. Enraizamento das plântulas: as plântulas da etapa 3 devem ser transferidas para a solução MR (Tabela 1) para o crescimento e enraizamento, o que se completa em 15 a 20 dias. Caso o laboratório disponha de uma estufa com maiores recursos aclimatização, na qual possa controlar a temperatura durante o inverno e a umidade relativa, esta etapa poderá ser omitida. Plântulas tratadas com MR crescem facilmente em qualquer estufa mais simples.

ACLIAMATIZAÇÃO E PLANTIO EM CAMPO DAS MUDAS PRODUZIDAS PELA BIOFÁBRICA DE CANA-DE-AÇÚCAR

1. Aclimatização em estufa: após a etapa 4 do laboratório, resultam frascos com aproximadamente 10-20 plântulas. Estas plântulas são então removidas, lavadas e levadas à estufa ou vendidas a terceiros. Praticamente qualquer tipo de estufa com um microaspersor simples serve a este propósito, desde que a temperatura exterior não esteja muito baixa. O sistema plug utilizado em estufa é o mesmo que normalmente se emprega em horticultura para a formação de mudas de hortaliças ou de plantas ornamentais (LEE, 1989). Esta etapa requer de 40 a 60 dias para se completar. As plântulas, agora bem enraizadas e aclimatizadas, estão prontas para o transplântio no campo;
2. Plantio no campo: as plântulas resultantes da aclimatização apresentam uma altura de 25 a 30 cm. Elas podem ser podadas antes de serem retiradas das bandejas do sistema plug, colocadas em caixas plásticas (geralmente utilizadas na coleta de laranja) e transportadas para as áreas de plantio. Cada plântula, a esta altura, pesa cerca de 20 g e cada caixa plástica pode acondicionar de 300 a 400 unidades. A cada viagem, um caminhão comum pode transportar de 200.000 a 300.000 plântulas, quantidade suficiente para o plantio de cerca de 15 a 20 hectares. Uma descrição mais detalhada das vantagens de se utilizar este sistema pode ser encontrada em trabalho de STOLF & LEE (1990). O plantio no campo pode ser realizado tanto por transplantador mecânico como também manualmente. As plântulas devem ser irrigadas abundantemente logo após o plantio.

CUSTO E BENEFÍCIO DE UMA BIOFÁBRICA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os custos da montagem de uma biofábrica de cana-de-açúcar dependem, principalmente, do seu objetivo de produção mensal. Uma biofábrica com produção mensal de 40.000 plântulas/mês projetado recentemente pelo autor para uma usina de cana-de-açúcar teve seu custo estimado em US\$ 200.000,00. O custo de cada plântula pode sofrer uma drástica redução em caso de escalonamento da produção. Por exemplo: um custo de US\$ 0,14/plântula numa produção de 200.000 unidades/ano, poderá ser reduzida para US\$ 0,08 a US\$ 0,04 a unidade se a produção aumentar para 400.000 e 1.000.000 unidades/ano, respectivamente (LEE, 1991 com valores atualizados). Empresas de cultura de tecidos que produzem mais de um milhão de unidades por ano são muito comuns nos Estados Unidos e Europa (LEE et al., 1995). Como o mercado de plântulas de cana-de-açúcar no Brasil é enorme, não deve haver dificuldade na comercialização desta quantidade de mudas.

Com a utilização de mudas sadias de cana-de-açúcar, é possível aumentar a produtividade da cultura de 10 a 30% e a longevidade dos canaviais em 30%. Estas estimativas são variáveis, pois os efeitos benéficos da cura das mudas dependem das variedades, organismos patogênicos e tratamentos culturais envolvidos (TOKESHI, comunicação pessoal).

O investimento para a instalação de uma biofábrica como a mencionada por LEE (1991), é bem justificável economicamente, considerando-se que sua implantação não visará somente o atendimento das necessidades da usina (o que deverá ocorrer no início), mas também a venda de mudas sadias a outros produtores, futuros compradores em potencial. Esta afirmação baseia-se nos seguintes pontos (TOKESHI, comunicação pessoal):

- a. a área cultivada com cana-de-açúcar no país está acima de 6.000.000 ha;
- b. estima-se que, anualmente, 20% da área cultivada seja replantada, o que equivaleria a 1.200.000 ha;

- c. para o plantio de 1.200.000 ha, é necessária uma área de viveiro de mudas equivalente a, pelo menos, 10% da área a ser plantada, ou seja, 120.000 ha de viveiros comerciais;
- d. estimando-se que o potencial de mercado de muda certificada represente somente 1% do total acima (podendo ser bem maior), isto corresponderia a uma área de 1.200 ha de viveiros de mudas, que seriam adquiridas pelos viveiristas;
- e. uma área de 1.200 ha de viveiros certificados necessita de, pelo menos, 18.000.000 de plântulas saudáveis, produzidas em biofábrica (LEE, 1991);
- f. o custo médio de plantas produzidas pelo método tradicional de tratamento térmico está em torno de US\$ 0,10 por unidade, enquanto que as plantas provenientes de cultura de tecidos, poderão chegar a US\$ 0,04. Isso significa que é plenamente viável a comercialização de plântulas de cultura de tecidos a preço igual às de tratamento térmico, ou seja, US\$ 0,10. Convém ressaltar que, uma muda de cana-de-açúcar biofabricada possui hoje, no mercado, preço entre US\$ 0,20 a US\$ 0,50.
- g. Como a área estimada é replantada anualmente, este montante representa a estimativa do valor bruto a ser, possivelmente, comercializado por ano.

O custo de transporte da muda deixa de ser um fator limitante, mesmo quando se consideram grandes distâncias, uma vez que, com a mesma capacidade de carga se transportam 15 vezes mais mudas provenientes deste processo do que do processo convencional (STOLF & LEE, 1990).

É importante ressaltar que os cálculos foram efetuados pressupondo-se que a comercialização de mudas saudáveis produzidas em uma biofábrica de cana-de-açúcar seja equivalente ao de mudas de tratamento térmico, e sendo a meta proposta de somente 1% da área de viveiros dos canaviais comerciais do país.

SUCESSO E RISCO

O risco está presente em qualquer negócio e operação de qualquer natureza. A montagem de uma biofábrica de cana-de-açúcar possui um investimento inicial relativamente alto. Para se ter certeza de que um projeto desta natureza terá sucesso, é fundamental ter uma equipe competente e bem gerenciada, sob orientação bem fundamentada e por pessoas que possuam bons conhecimentos do processo de biofabricação de cana-de-açúcar.

A biofábrica de cana-de-açúcar possui riscos semelhantes a qualquer outro tipo de laboratório comercial. Este riscos são os seguintes:

1. Contaminação

Devido ao grande volume de frascos com plântulas envolvido na biofábrica, um surto de contaminação pode causar uma grande perda em pouco tempo.

A contaminação pode ocorrer em qualquer fase do processo, desde o início dos explantes (ex. Desenvolvimento de meristemas) até a última fase de enraizamento. A utilização de plantas o mais limpas possíveis para iniciar a cultura normalmente diminui bastante a contaminação inicial dos explantes. Contaminações por fungos indicam, normalmente, a má manipulação durante o processo enquanto que contaminações por bactérias podem ser decorrentes tanto da manipulação como também de manifestações de bactérias latentes. É muito comum ocorrer durante a fase de multiplicação, repentinamente, uma contaminação generalizada, ou seja, todos os frascos ficam contaminados. Em cana-de-açúcar, isto geralmente acontece na 3ª ou 4ª repicagem, enquanto que durante a fase de meristema apical, na 1ª e 2ª repicagem, pouca bactéria é notada.

Este fenômeno acontece com mais facilidade em meio com pH 5,8 sendo reduzido em meio com pH 4,0. O meio de multiplicação (MP II) apresenta menos contaminação que o

meio de enraizamento (MR). Isto é fácil de se notar também quando as plantas que estão dentro do frasco envelhecem. Plantas contaminadas desta forma não se multiplicam nem enraizam bem e a sua sobrevivência na estufa é muito baixa, causando uma enorme perda.

A causa deste problema pode ser alguns contaminantes bacterianos como o *Bacillus subtilis*, *Erwinia* e *Pseudomonas*, que, às vezes, estão presentes dentro das plântulas mas não conseguem se desenvolver em meio de cultura, talvez por limitação causada pelo pH do meio ou pela citocinina utilizada na manipulação. Após algumas multiplicações, essas bactérias tendem a se adaptar ao meio, o que desencadeia o seu crescimento, aparecendo, assim, o surto de contaminação quase total.

2. Envelhecimento das plantas em frasco

Este é um risco que pode ocorrer com mais probabilidade na biofábrica de cana-de-açúcar devido ao seu desenvolvimento rápido no meio de cultura.

O problema normalmente ocorre na fase de multiplicação das culturas com ciclo de repicagem muito curto. É, basicamente, um problema de mau planejamento da produção que causa atraso na repicagem. Em cana-de-açúcar, é preciso fazer uma repicagem a cada 15 dias. Quando o número de frascos começa a ficar muito grande, os atrasos começam a acontecer e o problema começa a aparecer. O envelhecimento das plantas aumenta a possibilidade de contaminação e diminui bastante o rendimento das novas repicagens. Este problema pode ser resolvido com o melhor planejamento de trabalho e alteração das condições de cultura para que as plantas cresçam em menor velocidade.

3. Desordens fisiológicas

A má formação de plantas pode ocorrer dentro dos frascos durante a fase de multiplicação e pode ser causada pelas próprias condições (alta umidade, trocas de ar deficientes, alta concentração de fitorreguladores utilizados no meio de cultura, etc.). A vitrificação é a anomalia de maior ocorrência. Em cana-de-açúcar, uma massa verde pode ocorrer em qualquer estágio. A massa verde é uma touceira de brotinhos muito pequenos que se formam a partir da base da touceira normal. Essa massa verde normalmente é também vitrificada, mas pode voltar ao seu aspecto normal se for passada várias vezes em MR (meio de enraizamento). Este problema pode ser evitado com a diminuição na dosagem de BAP no meio de multiplicação.

4. Variabilidade das plantas

Existe sempre um risco de que possa ocorrer variabilidade de plantas e unidades atípicas nos produtos das biofábricas. O problema está geralmente relacionado ao genótipo e a má utilização da metodologia e de seus processos. No caso da cana-de-açúcar, praticamente 100% das variações observadas ocorrem na variedade RB835486 devido à instabilidade genética da própria variedade. O BAP é o principal fator causador de variação nesta cultura que, juntamente com a repicagem excessiva, podem propiciar a ocorrência de maior variação. Para evitar o risco de perdas aos produtores, recomendamos muito cuidado na concentração do BAP utilizado no meio de cultura e controle nas repicagens que não devem ultrapassar 7 vezes.

Conforme mencionado, o sucesso de uma biofábrica de cana-de-açúcar depende de muitos fatores, principalmente da liderança no processo todo. A forma como a pessoa líder gerenciará esta biofábrica poderá decidir o sucesso do negócio. O treinamento do pessoal e uma rigorosa exigência do controle da qualidade do trabalho e dos produtos são componentes indispensáveis ao sucesso da produção em larga escala e devem ser uma constante responsabilidade do seu gerenciamento.

Outros itens como a melhoria do ambiente de trabalho, desenvolvimento de alternativas para redução de contaminações e mesmo a automatização de alguns procedimentos também devem ser considerados e praticados. O constante treinamento e

motivação do pessoal do laboratório é fundamental para a redução final dos custos, uma vez que uma equipe altamente motivada pode fazer com que uma instalação mais simples ou pequena renda bons resultados, fazendo com que o rendimento de um local com boa infraestrutura produza ainda mais.

CONCLUSÃO

A produção industrial de mudas sadias de cana-de-açúcar através de uma biofábrica deixou de ser teórica. São muitas as vantagens como por exemplo:

- a) Taxa de multiplicação muito alta;
- b) Velocidade de multiplicação muito rápida;
- c) Produção de plântulas de alta qualidade;
- d) Produção anual constante;
- e) Facilidade de manuseio e transporte das plântulas resultando em custos menores;
- f) Plantio facilitado no campo.

O sucesso da biofábrica de cana-de-açúcar da Usina Ester instalada no ano de 1987 e da CanaVialis instalada no ano de 2004 são ótimos exemplos do seu potencial.

Acreditamos que, com o aperfeiçoamento e maior automação da tecnologia, a biofabricação da cana-de-açúcar será o único processo eficaz e economicamente viável para a rápida produção de mudas sadias e de alta qualidade de cana-de-açúcar.

BIBLIOGRAFIA

COOPERCITRUS, Usina Ester. Tecnologia avançada e respeito pelo meio ambiente. **Informativo Coopercitrus**, n. 54, p. 8-12, 1991.

GUIA RURAL. Plantando cana de proveta. **Guia Rural**, v. 4, n. 6, p. 32-33, 1990.

HENDRE, R.R. et.al. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. **Sugarcane**, v. 1, p. 5-9, 1983.

HENDRE, R.R.; IYER, R.S.; KOTWAL, M.; KHUSPE, S.S.; MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. **Sugar Cane**, High Wycombe, n. 1, p. 5-8, 1983.

IAA/PLANALSUCAR. COSUL. Seção de Fisiologia. **Micropropagação de mudas sadias de cana-de-açúcar através da técnica de cultura de meristema apical**. In: Relatório Anual, 1983. Araras.

LEE, T.S.G. Micropropagação da cana-de-açúcar através de meristema apical. **Saccharum APC**, v. 7, p. 36-9, 1984.

LEE, T.S.G. & BACCHI, O.O.S. Improved rooting of differentiated shoots from sugarcane callus tissue. **Turrialba**, v. 34, p. 481-4, 1984a.

LEE, T.S.G. Multiplication of sugarcane by apex culture. **Turrialba**, v. 36, p. 231-5, 1986.

LEE, T.S.G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 10, p.47-55, 1987.

LEE, T.S.G. Produção de mudas sadias de cana-de-açúcar através da técnica de cultura de tecidos. **Álcool & Açúcar**, v. 45, p. 20-9, 1988.

LEE, T.S.G. Produção industrial de mudas de cana-de-açúcar: uma nova abordagem. **Álcool & Açúcar**, v. 59, p. 12-6, 1991.

LEE, T.S.G. Biofábrica de cana-de-açúcar. **Álcool & Açúcar**, v. 63, p. 26-32, 1992.

LEE, T.S.G.; PICOLLO, L.T.; MENEGHIN, S.P.; ARAÚJO, S.M.S.S. Biofábrica: Produção industrial de plantas *in vitro*. In: LEE, T.S.G. (Coord.). **Biofábrica** - Produção industrial de plantas *in vitro*. São Carlos: UFSCar, 1995. p.9-17,

LEE, T.S.G.; BRESSAN, E.A. Clean cane with Nitrogen Fixing Bacteria. **Sugar Tech**, v. 7, n. 1, p. 11-16, 2005.

STOLF, R. & LEE, T.S.G. Sistema comercial de plantio de plântulas de cultura de tecidos e gemas isoladas: plantio de estaca. **Álcool & Açúcar**, v. 53, p. 20-9, 1990.

UCHÔA, P.E.A.; NOGUEIRA Jr., P.; NETO, J.A.P.; LEE, T.S.G. Biofactory of Sugarcane at Ester Sugarmill: Achievements and Problems. **STAB**, v. 13, n. 6, p. 33-34, 1995.

PALAVRAS-CHAVE:

Biofábrica, cana-de-açúcar, micropropagação.