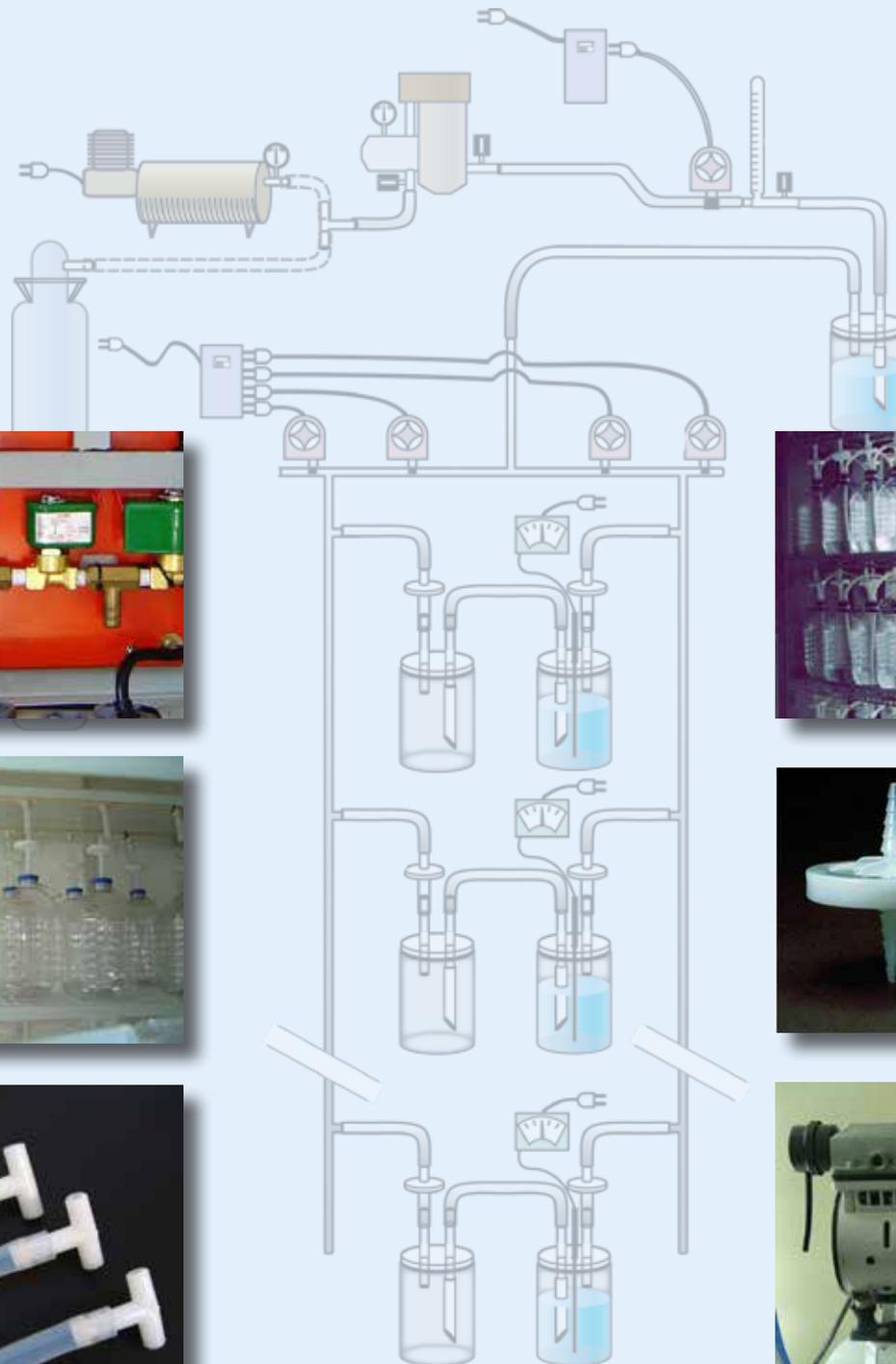


Biorreatores de imersão permanente e de imersão temporária

Constituição básica e funcionamento

João Batista Teixeira



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura e Pecuária*

Biorreatores de imersão permanente e de imersão temporária

Constituição básica e funcionamento

João Batista Teixeira

Embrapa
Brasília, DF
2023

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W5 Norte (final)
70770-917 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4700
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Responsável pelo conteúdo

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Comitê Local de Publicações

Presidente

Marcelo Lopes da Silva

Secretária-executiva

Ana Flávia do Nascimento Dias

Membros

Andrielle Câmara Amaral Lopes

Bruno Machado Teles Walter

Débora Pires Paula

Edson Junqueira Leite

Marcos Aparecido Gimenes

Solange Carvalho Barrios Roveri José

Responsável pela edição

Embrapa, Superintendência de Comunicação

Coordenação editorial

Carla Alessandra Timm

Nilda Maria da Cunha Sette

Supervisão editorial

Cristiane Pereira de Assis

Revisão de texto

Jane Baptistone de Araújo

Normalização bibliográfica

Márcia Maria Pereira de Souza (CRB 1/1441)

Projeto gráfico, diagramação e capa

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Ilustrações

Maurício Prado Figueirôa

1ª edição

Publicação digital (2023): PDF

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa, Superintendência de Comunicação

Teixeira, João Batista.

Biorreatores de imersão permanente e de imersão temporária: constituição básica e funcionamento / João Batista Teixeira. – Brasília, DF : Embrapa, 2022.

(PDF 119 p.). : il. color. ; 21,0 cm x 29,7 cm.

ISBN 978-65-89957-73-7

1. Reprodução vegetal. 2. Conservação in vitro. 3. Melhoramento genético. I. Teixeira, João Batista. II. Embrapa Recursos Genéticos. III. Título.

CDD (21. ed.) 14079

Márcia Maria Pereira de Souza (CRB 1/1441)

© Embrapa, 2023

Autor

João Batista Teixeira

Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia de Plantas, pesquisador aposentado da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Dedico esta obra à minha esposa, Assunta Maria, aos filhos, Thales e Plínio, à nora, Iva, aos netos, Kalina, Marley, ao Nicolas, que, com apenas 8 anos, já demonstrava interesse por biorreatores, a Deus, razão de todas as coisas, de Onde tudo procede e para Onde tudo converge.

Agradecimentos

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e aos colegas José Ribeiro de Souza Filho, Antonio Roberto Teixeira de Almeida e Jonny Everson Servinsky Pereira pelo apoio e colaboração.

Às empresas C4 Científica e Tecnal Equipamentos Científicos, por meio das quais foi possível, a partir dos protótipos originais, desenvolver modelos comerciais, nos quais foram agregadas melhorias do ponto de vista de construção e, em alguns casos, de funcionalidade.

À participação de Carlos Comte, que, por meio de sua empresa, a C4 Científica, colaborou por vários anos para a melhoria dos protótipos de biorreatores, desenvolvendo novos frascos, novas fontes de luz, sistema wi-fi para o monitoramento remoto, entre outros aspectos, os quais caracterizaram sua crença inabalável na nova tecnologia, como um instrumento que poderia revolucionar a produção de mudas em laboratório.

À parceria do colega Luis Pedro Barrueto Cid em todas as fases do processo de elaboração e teste dos protótipos experimentais do biorreator.

Às colegas da área de comunicação, em especial, Polliana da Silva Martins, Cláudio Bezerra Melo, Raul Cesar Pedroso da Silva, Maria da Dores V. Medeiros e Maria Fernanda Diniz Ávidos, que, sob a liderança da Fernanda, foram as responsáveis pela divulgação nas mais importantes feiras e eventos agropecuários e científicos, permitindo que a tecnologia de produção de mudas por meio de biorreatores pudesse ser conhecida em todo o território nacional.

À colega Diva Maria de Alencar Dusi pela cuidadosa revisão do manuscrito e pelas preciosas sugestões.

Ao Dr. José Manuel Cabral de Sousa Dias, chefe-geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em duas longas gestões, por acreditar na tecnologia de biorreatores para produção de mudas em laboratório e por contribuir incansavelmente para sua divulgação, melhoria e incentivo na elaboração de convênios com várias empresas privadas, entre elas a Tecnal e a C4 Científica.

Apresentação

Nesta publicação, procurou-se abordar os principais tipos de biorreatores desenvolvidos para fins de micropropagação, ou seja, a produção de mudas em laboratório.

A obra é dividida em duas partes. Na primeira parte, procurou-se fazer uma revisão dos principais tipos de biorreatores, tanto os de imersão permanente quanto os de imersão temporária, suas constituições básicas e funcionamentos. Na segunda parte, procurou-se apresentar com bastante detalhe o sistema de biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa), incluindo o memorial descritivo, o funcionamento, os fatores físicos e químicos que afetam o crescimento do explante em biorreator, as aplicações, as vantagens e as desvantagens do biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa).

Finalizando, não se teve a pretensão de esgotar o assunto, mas apenas apresentar os principais aspectos relacionados aos vários modelos de biorreatores desenvolvidos para eventual uso na produção de mudas em laboratório, que visaram, sobretudo, ao aumento da escala de produção e, com isso, a redução nos custos de produção. Muito ainda precisa ser feito nessa área até que a micropropagação possa ser conduzida com algum grau de automatização, que venha contribuir significativamente para reduzir os custos da muda produzida.

Maria Cléria Valadares Inglis

Chefe-Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prefácio

As primeiras tentativas de produção de mudas de plantas em laboratório remontam à década de 1950. Desde então, e sobretudo nas últimas décadas, a produção de mudas em laboratório vem se expandindo, e milhões de mudas são produzidas anualmente em todo o mundo por meio dessa técnica.

As técnicas básicas de micropropagação, como é comumente denominada a produção de mudas em laboratório, utilizam, em sua maioria, meio nutritivo gelificado e frascos relativamente pequenos, com volumes raramente superiores a 250 mL. Com isso, a micropropagação requer a manipulação de milhares de frascos, mesmo para uma biofábrica de porte médio, cuja produção é algo em torno de 1 milhão de mudas por ano. Conseqüentemente, esse grande número de frascos requer um contingente de pessoal suficientemente numeroso para que a biofábrica possa funcionar a contento.

Com isso, o grande envolvimento de mão de obra encarece significativamente o processo de produção de mudas em laboratório. Grosso modo, uma biofábrica de 1 milhão de mudas anuais demanda o trabalho de algo em torno de 30 pessoas, o que pode representar significativos 60% a 70% do custo final de produção de cada muda.

Visando reduzir o envolvimento de mão de obra no processo de micropropagação, novas metodologias foram pesquisadas, sobretudo aquelas que utilizam frascos maiores, que possam conter um grande número de mudas, diferentemente dos frascos pequenos. Para isso, o meio de cultura não mais poderia ser gelificado, e sim líquido. Com o uso de meio líquido, o material vegetal seria cultivado dentro do meio nutritivo e não apenas na superfície, como é no caso do meio gelificado. O cultivo em meio líquido permitiu utilizar frascos de 1 L, 2 L, 5 L, 10 L ou mesmo 20 L, nos quais dezenas ou mesmo centenas de mudas poderiam ser produzidas num único frasco. Entretanto, o cultivo em meio líquido requer aeração forçada, de modo a permitir um crescimento adequado do material vegetal. Numa nova configuração, os frascos passaram a ser interligados, dando origem a equipamentos denominados de biorreatores, nos quais, além do uso de meio de cultura líquido, o ar é renovado durante o cultivo. Além disso, é possível fazer o monitoramento de alguns parâmetros essenciais ao crescimento do explante, como pH, oxigênio dissolvido, temperatura e concentração de nutrientes. Os primeiros biorreatores para fins de micropropagação foram desenvolvidos no início da década de 1990, incluindo os biorreatores de imersão temporária, tema principal da presente publicação.

Em meados da década de 1990, a Embrapa deu início às primeiras pesquisas visando ao desenvolvimento de um modelo de biorreator de imersão temporária, que culminou com o pedido de patente em agosto de 2000, e concessão pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Inpi) da carta patente em janeiro de 2017. A presente publicação procura apresentar os principais biorreatores utilizados no processo de produção de mudas em laboratório, os quais são divididos em dois grandes grupos, os de imersão permanente e os de imersão temporária.

Apesar do grande número de publicações relacionadas a biorreatores e seu grande potencial na micropropagação, o uso comercial encontra-se ainda em sua fase inicial. No Brasil, algumas biofábricas vêm conduzindo testes com os modelos de biorreatores desen-

volvidos pela Embrapa, cujos resultados são muito promissores. No mundo, já se tem notícia de biofábricas que internalizaram a nova metodologia. Além disso, diferentes modelos de biorreatores foram adaptados e diferentes espécies de plantas vêm sendo multiplicadas utilizando essa nova metodologia.

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Pesquisador da Embrapa, Superintendência de Estratégia

Sumário

- 15** Introdução
- 18** Principais tipos de biorreatores de imersão permanente utilizados na micropropagação
- 23** Principais tipos de biorreatores de imersão temporária utilizados na micropropagação
- 30** Sistema de biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa)
- 32** Memorial descritivo de um kit de 40 pares de frascos
- 44** Funcionamento do biorreator (modelo Embrapa) sob regime de imersão temporária
- 52** Funcionamento do biorreator (modelo Embrapa) sob regime de imersão permanente
- 53** Fatores físicos e químicos que afetam o crescimento do explante em biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa)
- 61** Aplicações do biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa)
- 67** Vantagens do uso de biorreator (modelo Embrapa) na micropropagação
- 71** Desvantagens do uso de biorreator (modelo Embrapa) na micropropagação
- 74** Considerações finais
- 75** Referências
- 82** Glossário
- 88** Anexo 1 – Carta de concessão e descrição da patente

Introdução

Um grande número de espécies vegetais, incluindo banana, batata, morango, eucalipto, cana-de-açúcar e abacaxi, vem sendo multiplicado vegetativamente por micropropagação. A aplicação dessa técnica tem contribuído para a produção de mudas de alta qualidade sanitária, vigor e uniformidade (Lee; Lee, 2011).

A micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa conduzida in vitro por meio da cultura de tecidos de plantas ou cultura in vitro, que permite a propagação (ou multiplicação) rápida de material vegetal, resultando num grande número de plantas. Já a cultura de tecidos de plantas consiste em técnicas de propagação vegetativa por meio de métodos de excisão, desinfestação e cultura – em meio nutritivo sintético, em condições assépticas e controle ambiental –, de células, tecidos ou órgãos de plantas.

A micropropagação em escala comercial é feita em estabelecimentos conhecidos como biofábricas, que são constituídas basicamente de laboratório de cultura de tecidos, casas de vegetação, telados ou viveiros, além de espaço reservado à administração.

A produção de mudas micropropagadas apresenta uma série de vantagens quando comparada com outros processos de propagação vegetativa, como enxertia, estaquia e alporquia. Por meio da micropropagação, é possível serem obtidas mudas limpas de pragas já que se pode utilizar, como doadora de explantes, planta sadia, e o próprio processo de produção in vitro envolve a desinfestação das diferentes fontes de explantes, como gemas nodais, segmentos de rizoma e hastes caulinares. Além do mais, ao longo do processo, o material em cultivo passa por inspeções periódicas para eliminar eventuais contaminantes. Em relação aos vírus, especificamente, existem técnicas apropriadas que permitem obter material livre desses patógenos, como, por exemplo, o pré-cultivo da planta matriz em ambiente com alta temperatura, processo denominado termoterapia, seguido do cultivo de gemas de tamanho reduzido, entre 0,1 mm e 0,3 mm, constituídas do meristema e de um a três primórdios foliares. Como garantia da limpeza clonal, durante a fase de aclimatização, as mudas passam por avaliação final para demonstrar a presença ou ausência de organismos patogênicos, processo esse conhecido por indexação. Dessa forma, só serão disponibilizadas para comercialização mudas com alto grau de sanidade.

Outra grande vantagem da micropropagação diz respeito ao vigor e à uniformidade das mudas produzidas, além de essas poderem ser produzidas aos milhões e serem disponibilizadas ao agricultor na época adequada para plantio no campo.

Embora a produção de mudas em biofábrica seja interessante sob vários aspectos, o processo apresenta algumas desvantagens. A primeira delas, e talvez uma das mais importantes, é o alto custo de produção, já que o processo demanda mão de obra altamente especializada e um laboratório bem montado (Teixeira, 2002; Lee; Lee, 2011). Com isso, as mudas acabam sendo, em geral, bem mais caras do que as mudas convencionais. Além disso, o processo de produção precisa ser conduzido de forma rigorosamente controlada de modo a não produzir mudas anormais, ou seja, fora do padrão para a espécie que está sendo multiplicada. Assim, essa técnica só deve ser empregada em condições especiais: 1) quando se deseja fazer a limpeza clonal do material propagativo, como, por exemplo, no caso da batata e do morango; 2) quando não houver disponibilidade de mudas convencionais em quantidade, vigor e uniformidade, como, por exemplo, no caso da banana; 3) quando o valor de mercado da muda produzida for alto, como no caso de mudas de híbridos selecionados

de orquídea. Para as outras espécies, a conveniência ou não da propagação *in vitro* vai depender da relação custo-benefício da muda micropropagada.

Outra grande desvantagem no processo de micropropagação é o fato de a produção de mudas utilizar, em geral, meio de cultura gelificado. O meio de cultura gelificado é aquele que apresenta consistência semissólida, pela adição de um agente gelificante, como o ágar ou Phytigel™. O uso de meio gelificado apresenta uma série de problemas. Primeiro, o contato do explante com o meio é parcial, afetando a quantidade de nutrientes que o explante pode absorver durante o cultivo. Além do mais, devido à absorção de nutrientes pelo explante, pode haver a formação de um gradiente de concentração dos nutrientes, em volta do explante, por causa da maior resistência à difusão de nutrientes no meio gelificado. Da mesma forma, substâncias orgânicas, as mais diversas, liberadas pelos explantes, principalmente os polifenóis, podem se acumular em volta do explante e atingir níveis tóxicos.

Uma alternativa ao meio de cultura gelificado é o uso de meio líquido, que apresenta uma série de vantagens quando comparado ao meio gelificado:

- a) O custo é menor, porque não há gasto com substâncias gelificantes.
- b) A nutrição dos explantes é melhor, porque não há formação de gradiente de concentração de nutrientes, principalmente se houver uma agitação mínima do meio durante o cultivo.
- c) Os polifenóis oxidados se difundem por todo o meio, havendo diluição e menor inibição do crescimento do explante em cultivo.
- d) O uso de meio líquido favorece o desenvolvimento de novas formas de cultivo que permitam, por exemplo, algum grau de automatização do processo.

Entretanto, o uso de meio líquido apresenta alguns inconvenientes, entre os quais o fato de os explantes de muitas espécies não crescerem bem quando submersos.

Visando contornar esse problema, suportes físicos têm sido utilizados, tais como algodão e fibras de polipropileno, sobre os quais são colocados os explantes para cultivo (Youngy et al., 1991). Para permitir boa aeração, o meio líquido é dosado de tal forma a tocar os explantes, evitando sempre a imersão. Para algumas espécies – abacaxi e cana-de-açúcar –, o cultivo vem sendo feito em meio líquido, preferencialmente ao cultivo em meio gelificado, sobretudo nas fases de multibrotação, alongamento e enraizamento, com resultados bastante promissores, sem o uso de suportes sólidos. Nesse caso, entretanto, são tomados alguns cuidados para que os explantes não fiquem submersos durante o cultivo. O cultivo em camada fina de meio líquido, inferior a 1 cm, é um dos principais cuidados.

Seja utilizando meio gelificado ou líquido, a produção convencional de mudas micropropagadas é conduzida sempre com a utilização de frascos pequenos, com volumes de meio de cultura que raramente ultrapassam 250 mL. Com esse volume reduzido de meio de cultura, e também por falta de espaço interno, a quantidade de explantes cultivados em cada frasco é pequena, o suficiente para produzir, no máximo, uma dezena de mudas de abacaxi e um pouco mais de mudas de cana-de-açúcar, por exemplo. Assim, numa biofábrica de porte médio, dezenas de milhares de frascos são necessárias para que um razoável número de mudas possa ser produzido. Estima-se que, para produção de um milhão de mudas de abacaxi ou banana, no período de um ano, algo como 100 mil frascos precisam ser manipulados, em atividades como lavagem, preparo de meio, fechamento, etiquetagem e autoclavagem, o que resulta num grande envolvimento de mão de obra (Lee; Lee, 2011),

que pode representar algo em torno de 60% do custo final da muda. Com isso, o custo por muda produzida em frascos pequenos é muito alto (Etienne; Berthouly, 2002).

Assim, a micropropagação convencional apresenta uma série de limitações, tais como:

- a) Uso de frascos pequenos, raramente maiores que 250 mL.
- b) Uso de baixo volume de meio por frasco, 50 mL ou menos.
- c) Uso de meio gelificado, que encarece o meio.
- d) Uso de gelificantes, que podem alterar a composição do meio, por não serem produtos inertes.
- e) Problemas na nutrição, devido ao volume limitado do meio explorado pelos explantes.
- f) Acúmulo de substâncias tóxicas em volta dos explantes, entre eles os polifenóis oxidados.
- g) Deficiência na aeração devido ao uso de frascos selados.
- h) Acúmulo de gases prejudiciais no interior dos frascos, como o etileno.
- i) Alto consumo de energia elétrica.
- j) Alto envolvimento de mão de obra para manipulação de milhares de frascos.
- k) Alto risco de contaminação, principalmente bacteriana, devido à excessiva manipulação dos explantes e frascos.
- l) Alto risco de misturas varietais devido ao excesso de manipulação dos explantes e frascos.

Visando contornar os problemas encontrados na micropropagação, com o uso de frascos pequenos, seja em meio gelificado seja em meio líquido, buscou-se viabilizar o uso de meio líquido e novos frascos de cultivo, com maior volume, interligados numa nova configuração, dando origem a equipamentos denominados de biorreatores (Takayama; Akita, 1994). Nos biorreatores, além do uso de meio de cultura líquido, o ar é renovado durante o cultivo, bem como é possível fazer o monitoramento de alguns parâmetros essenciais ao crescimento do explante, como pH, oxigênio dissolvido, temperatura e concentração de nutrientes (Paek et al., 2001, 2005). Em meados da década de 1990, a Embrapa deu início às primeiras pesquisas visando ao desenvolvimento de um modelo de biorreator de imersão temporária, que culminou com o pedido de patente em agosto de 2000, e concessão pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Inpi) da carta patente em janeiro de 2017 (Anexo 1).

Basicamente, os modelos de biorreatores são de dois tipos: os de imersão permanente e os de imersão temporária. Em seguida, serão descritos os principais biorreatores de imersão permanente e de imersão temporária utilizados na micropropagação.

Principais tipos de biorreatores de imersão permanente utilizados na micropropagação

A constituição dos biorreatores de imersão permanente é fundamentalmente a mesma dos fermentadores, equipamentos utilizados para cultivo de fungos e bactérias (Takayama; Akita, 1994). Basicamente, os biorreatores de imersão permanente apresentam os seguintes componentes: frasco de cultivo, motor elétrico conectado a um eixo que se estende até o interior do frasco, onde se liga uma ou mais hélices agitadoras, bomba compressora de ar e sensores de temperatura, pH e oxigênio (Takayama; Akita, 1994).

O frasco de cultura é desenhado de tal forma a permitir ótima aeração e homogeneização do meio de cultura, com um mínimo de dano mecânico ao material em cultivo. Os frascos podem ser feitos de vidro, policarbonato, polipropileno ou qualquer outro material que suporte autoclavagem, à temperatura de 121 °C, durante 15 a 30 minutos. Frascos de material plástico não autoclaváveis podem ser utilizados, desde que a esterilização seja feita por radiação gama ou química (Takayama; Akita, 1994).

A homogeneização do meio de cultura e a aeração do material em cultivo são feitas de diversas formas, das quais a mais comum é a injeção de um fluxo de ar borbulhante a uma determinada pressão, combinada ou não com o movimento de uma hélice no interior do frasco de cultivo (Takayama; Akita, 1994). O ar que entra no sistema é esterilizado ao ser forçado a passar através de uma membrana com poros de 0,22 µm ou 0,44 µm de diâmetro. O volume dos frascos é variado, embora os de 1 L a 4 L sejam os mais utilizados (Takayama; Akita, 1994).

Os fermentadores encontrados no mercado que podem ser adaptados para micropropagação, em geral, são equipamentos com as seguintes características:

- a) Foram desenvolvidos especificamente para o cultivo de microrganismos.
- b) São destinados apenas ao cultivo sob condições de imersão permanente e não permitem versatilidade no seu uso, por exemplo, não há como transformar um modelo de imersão permanente em um modelo de imersão temporária e vice-versa.
- c) Em sua maioria, são complexos do ponto de vista de montagem e funcionamento.
- d) São, geralmente, de difícil manipulação durante as fases de esterilização, carga, descarga e troca do meio de cultura.
- e) São geralmente bastante caros.

Os primeiros biorreatores de imersão permanente foram utilizados para o cultivo de células vegetais visando à produção de substâncias do metabolismo secundário, de importância industrial (Wagner; Vogelmann, 1977; Margaritis; Wallace, 1984; Fowler, 1987). Para essa finalidade, poucas alterações nos fermentadores foram necessárias, já que, assim como os microrganismos, as células vegetais necessitam, para seu crescimento e desenvolvimento, de homogeneização e borbulhamento do meio de cultura, a fim de propiciar uma tensão

adequada de oxigênio. Posteriormente, os biorreatores foram testados para o cultivo de gemas e segmentos nodais, para fins de micropropagação.

O primeiro relato sobre o uso de biorreatores de imersão permanente na propagação vegetal foi feito por Takayama e Misawa (1981), para micropropagação de begônia. Nesse trabalho, os autores utilizaram segmentos nodais de plântulas estabelecidas *in vitro*, seguindo protocolos de cultivos convencionais. Os segmentos nodais foram inoculados em biorreatores de imersão permanente do tipo coluna de bolhas, sendo possível obter um aumento da massa seca dos explantes da ordem de 20 vezes. Procedimentos similares foram conduzidos para uma série de outras espécies vegetais, utilizando bulbos (Takayama, 1991; Takayama; Akita, 1998), microtubérculos (Akita; Takayama, 1994) e cormos (Ziv et al., 1998).

Os biorreatores de imersão permanente foram utilizados igualmente na produção de embriões somáticos (Denchev et al., 1992; Taurorus et al., 1992) e sementes sintéticas (Attree et al., 1994; Onishi et al., 1994). A metodologia de produção de sementes sintéticas requer completo domínio do processo de indução e seleção de calos embriogênicos, bem como da diferenciação, maturação e encapsulamento dos embriões somáticos, além da germinação das sementes.

Diversos tipos de biorreatores de imersão permanente foram desenvolvidos e utilizados no cultivo de gemas, embriões e plantas. Esses biorreatores são classificados basicamente pelo tipo de agitação, aeração e construção do frasco (Takayama; Akita, 1994).

Em seguida, serão descritos alguns tipos de biorreatores de imersão permanente, de acordo com Takayama e Akita (1994).

Biorreator do tipo aerador agitador (*aeration-agitation bioreactor*)

Em relação ao funcionamento, este tipo de biorreator é o mais parecido com os fermentadores convencionais. A agitação é basicamente feita por meio de hélice ou hélices conectadas a um eixo giratório (Figura 1). É basicamente utilizado para cultivo de células e embriões somáticos (Kessel; Carr, 1972; Stuart et al., 1987; Preil et al., 1988; Preil, 1991). Para o cultivo de gemas nodais e hastes caulinares, esse modelo de biorreator não é o mais indicado, já que, para haver uma boa homogeneização do meio, é preciso que a hélice gire em velocidades suficientemente elevadas, o que pode causar algum dano mecânico ao material em cultivo. Já para o cultivo de células e embriões

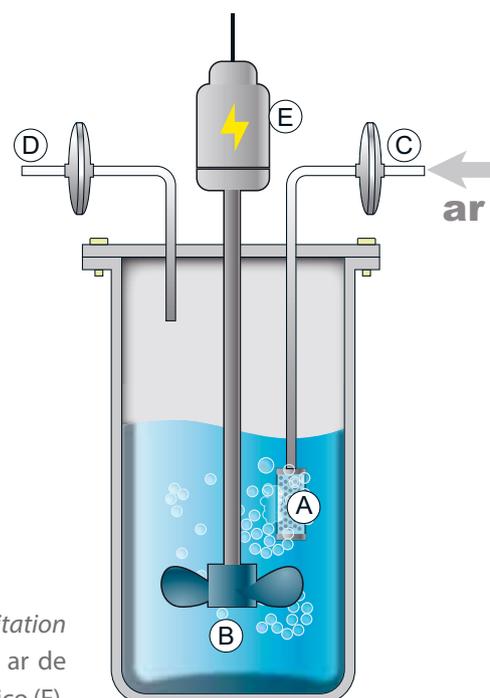


Figura 1. Biorreator do tipo aerador agitador (*aeration-agitation bioreactor*): bico borbulhador (A); hélice agitadora (B); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (C e D); motor elétrico (E).

somáticos, o dano é mínimo ou ausente, desde que a construção considere o formato e o tamanho da hélice e, durante o funcionamento, a rotação seja a mínima possível, mas que ainda permita uma boa homogeneização do meio de cultura.

Biorreator do tipo tambor rotatório (*rotating-drum bioreactor*)

Para este biorreator, o frasco de cultivo gira suavemente em movimentos rotacionais sobre dois eixos, que servem não apenas de apoio, como também para imprimir ao frasco o movimento rotatório (Figura 2). O dano mecânico é mínimo, permitindo o seu uso no cultivo de células e embriões, além de gemas e hastas caulinares. Entretanto, o nível de oxigenação só é adequado quando se utilizam meios de cultura com alguma viscosidade (Tanaka et al., 1983).

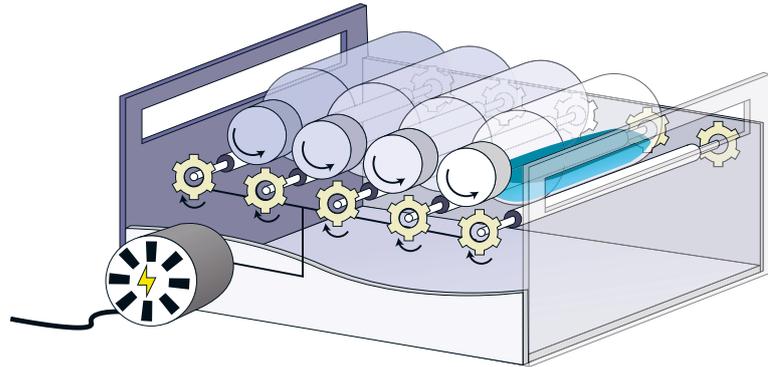


Figura 2. Biorreator do tipo tambor rotatório (*rotating-drum bioreactor*).

Biorreator do tipo filtro giratório (*spin-filter bioreactor*)

O biorreator de filtro giratório apresenta um filtro conectado a um eixo central, por onde o meio de cultura é carregado e descarregado (Styer, 1985) (Figura 3). Esse elemento é responsável, igualmente, pela homogeneização do meio. A aeração do material em cultivo é feita por borbulhamento de ar, assim como ocorre no biorreator do tipo aerador agitador (Figura 1). O biorreator do tipo filtro giratório funciona muito bem para propagação via embriogênese somática, a partir da fase de multiplicação de células embriogênicas até a diferenciação e germinação de embriões somáticos (Wheat et al., 1986). As fases iniciais da embriogênese, para a maioria das espécies, é feita em meio gelificado, em

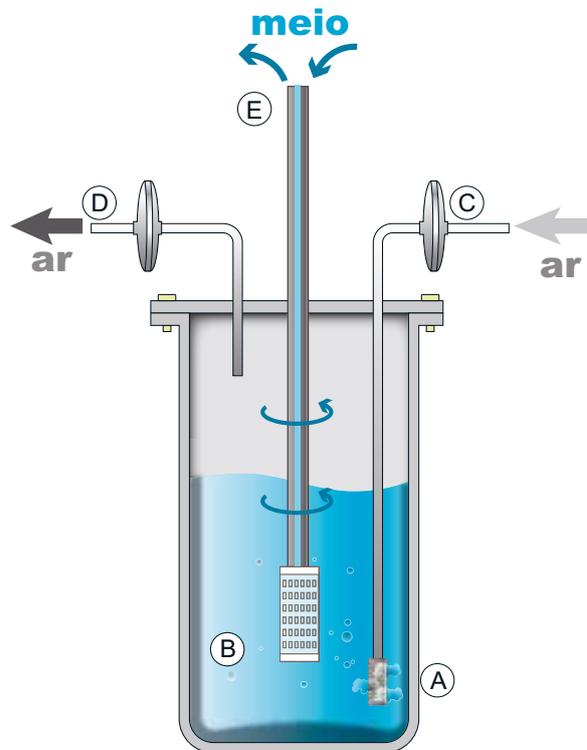


Figura 3. Biorreator do tipo filtro giratório (*spin-filter bioreactor*): bico borbulhador (A); filtro giratório (B); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (C e D); tubo de carregamento e descarregamento de meio de cultura (E).

placas de Petri ou frascos de pequeno volume. Na fase em que as células embriogênicas podem ser isoladas e multiplicadas, é possível transferi-las para o cultivo em meio líquido, em biorreator.

Biorreator do tipo borbulhador de ar (*air-driven bioreactor*)

O biorreator do tipo borbulhador de ar apresenta uma constituição muito simples (Figura 4). A homogeneização do meio, bem como a aeração são feitos via borbulhamento de ar a partir do fundo do frasco. Pode ser de dois tipos: aeração simples ou coluna de bolhas.

A relação altura/diâmetro de 1 a 2 define o biorreator de aeração simples; se a relação for de 3 ou acima, o biorreator é do tipo coluna de bolhas. Esses modelos de biorreatores apresentam bons resultados no cultivo de hastes caulinares, bulbos, cormos e tubérculos (Takayama; Misawa, 1981; Takayama et al., 1991a, 1991b), tendo sido desenvolvido e utilizado primeiramente na micropropagação de *Begonia* por Takayama e Misawa (1981).

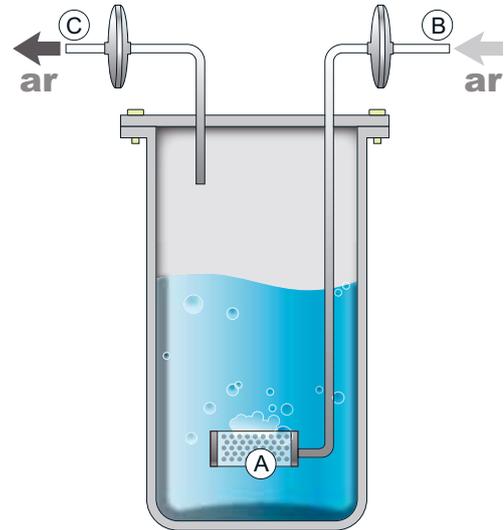


Figura 4. Biorreator do tipo borbulhador de ar (*air-driven bioreactor*): bico borbulhador (A); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (B e C).

Biorreator do tipo elevação de ar (*air-lift bioreactor*)

Neste tipo de biorreator, o meio de cultura se move de baixo para cima dentro de um tubo, pelas bolhas de ar produzidas no fundo do frasco de cultivo (Figura 5). Esse modelo apresenta bons resultados, uma vez que há uma boa aeração e homogeneização do meio de cultura e pouco dano mecânico ao material em cultivo (Park et al., 1989). A única diferença entre esse biorreator e o modelo anterior é que o borbulhamento de ar é feito dentro de um tubo centralizado no interior do frasco de cultivo.

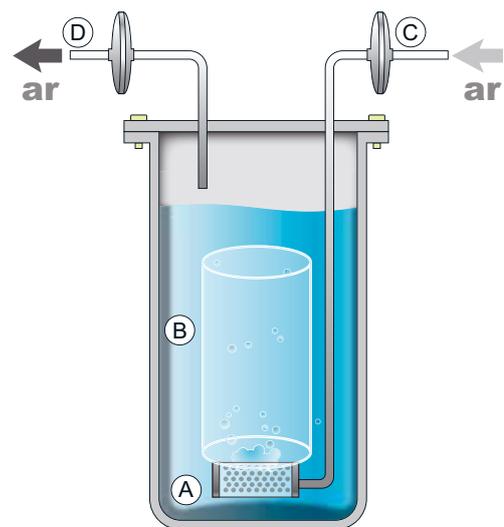


Figura 5. Biorreator do tipo elevação de ar (*air-lift bioreactor*): bico borbulhador (A); tubo condutor de bolhas (B); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (C e D).

Biorreator de aeração por membrana porosa ao oxigênio (*oxygen permeable membrane aerator bioreactor*)

Neste biorreator, o frasco de cultura contém uma canalização fina em forma de espiral feita de material poroso ao oxigênio, que pode ser teflon, silicone, policarbonato ou poli-propileno, através do qual o oxigênio passa para o meio de cultura (Luttman et al., 1994) (Figura 6). Esse modelo de biorreator não apresenta problemas relacionados a dano mecânico, dado que não há nenhum tipo de agitação, entretanto a homogeneização do meio de cultura fica prejudicada. Para contornar esse problema, pode-se inserir um eixo central com hélice agitadora na extremidade (Figura 7).

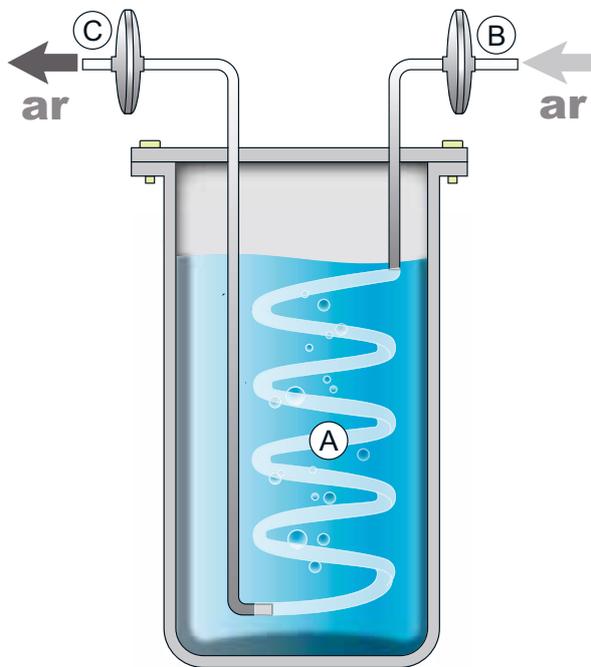


Figura 6. Biorreator de aeração por membrana porosa ao oxigênio (*oxygen permeable membrane aerator bioreactor*): tubo permeável a gases (A); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (B e C).

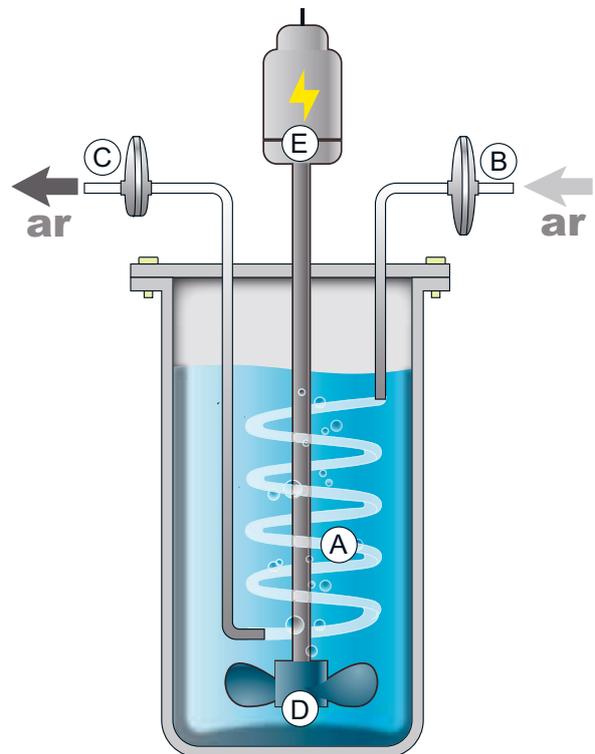


Figura 7. Biorreator de aeração por membrana porosa ao oxigênio (*oxygen permeable membrane aerator bioreactor*) com hélice agitadora: tubo permeável a gases (A); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (B e C); hélice agitadora (D); motor elétrico (E).

Biorreator do tipo sobreaeração (*overlay-aeration bioreactor*)

Neste modelo, a aeração é feita por sopramento do ar estéril sobre o meio de cultura. Eventualmente, esse tipo de aeração pode ser combinado com agitação suave do meio via eixo com hélice agitadora, visando homogeneizar e melhorar a aeração do meio (Figura 8) (Ishibashi et al., 1987 citado por Takayama; Akita, 1994).

Principais tipos de biorreatores de imersão temporária utilizados na micropropagação

Vários modelos de biorreatores de imersão temporária foram desenvolvidos no intuito de eliminar ou minimizar os problemas encontrados nos cultivos sob imersão permanente. No biorreator de imersão temporária, o meio de cultura permanece em contato com o explante por um período predeterminado. Em seguida, o meio é drenado e o explante deixa de ficar em contato com o meio de cultura.

O princípio do cultivo *in vitro* sob imersão temporária foi primeiramente descrito por Steward et al. (1952), os quais mostraram que segmentos de raízes de cenoura imersos em meio líquido sob imersão temporária apresentavam crescimento superior ao obtido em meio gelificado. Para comparar o crescimento em meio líquido com o crescimento em meio gelificado, Steward et al. (1952) delinearam e construíram um equipamento denominado de "auxophyton", que movimentava os frascos de cultura de forma rotacional de modo que, em determinado momento, os segmentos de raiz fossem expostos ao ar no interior do frasco e, no momento seguinte, submersos no meio líquido, conseguindo com isso um aumento da matéria fresca de 60,5 mg (de 38,1 mg em 10 mL de meio gelificado para 98,6 mg em 10 mL de meio líquido). O "auxophyton" era basicamente constituído de um balão de vidro, no qual foi feita uma modificação pela inserção de várias protuberâncias arredondadas, onde os explantes eram retidos durante o movimento rotacional do frasco, permitindo assim o cultivo sob imersão temporária.

Três décadas após os experimentos de Steward et al. (1952) mostrarem a superioridade do cultivo sob imersão temporária, apareceram os primeiros equipamentos que utilizavam esse princípio de cultivo para micropropagação. Harris e Mason (1983) desenvolveram um equipamento para cultivo de explantes de uva em meio líquido, em frascos de Erlenmeyer, que apresentava o mesmo princípio relatado por Steward et al. (1952). Nesse equipamento,

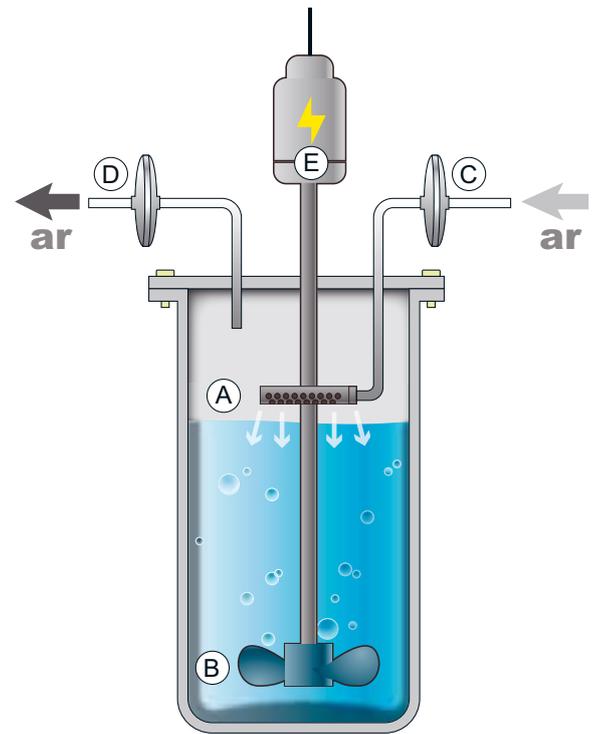


Figura 8. Biorreator do tipo sobreaeração (*overlay-aeration bioreactor*) com hélice agitadora: bico soprador de ar estéril (A); hélice agitadora (B); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (C e D); motor elétrico (E).

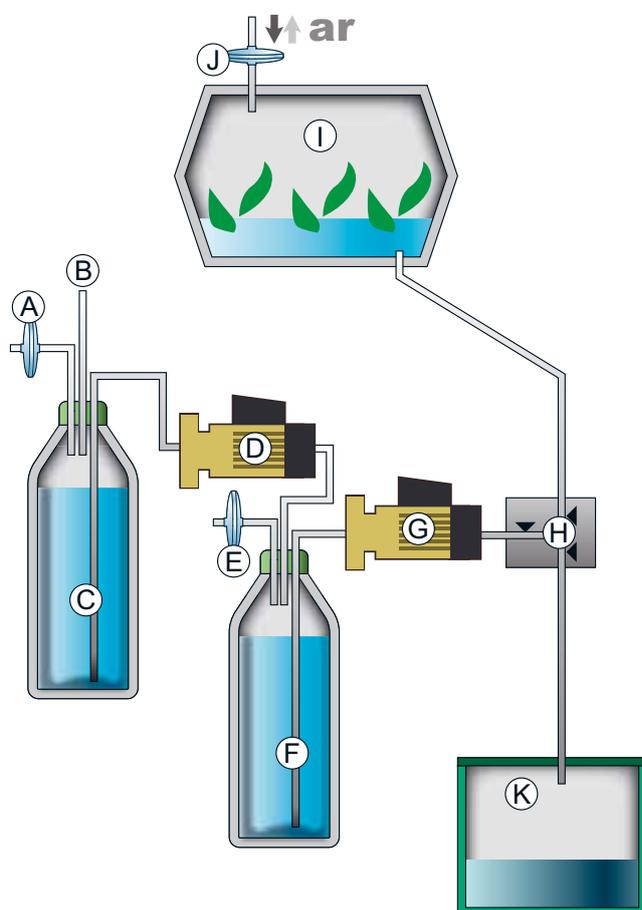
o frasco de Erlenmeyer era inclinado para um lado e para o outro, automaticamente, em intervalos predeterminados, de tal forma que, em certa posição, o explante se encontrava submerso e em outra posição não submerso. O estoque inicial de explantes era obtido por meio do cultivo por 28 dias em meio gelificado com ágar. Após 90 dias de cultivo no meio de imersão temporária, a produção de brotos foi sete vezes superior ao rendimento obtido no mesmo período em meio com ágar.

A seguir, serão descritos os principais modelos de equipamentos, agora denominados biorreatores de imersão temporária, que foram desenvolvidos para fins de micropropagação, tomando como base o processo desenvolvido por Steward et al. (1952).

Sistema de biorreator de imersão temporária segundo Tisserat e Vandercook (1985)

Tisserat e Vandercook (1985) desenvolveram um sistema de cultivo em imersão temporária constituído por uma grande câmara de cultura, a qual era periodicamente abastecida com meio de cultura (Figura 9). Segundo os autores, embora o controle da troca gasosa fosse insatisfatório, esse método de cultivo por imersão temporária mostrou-se muito superior ao cultivo em meio gelificado.

O modelo desenvolvido por Tisserat e Vandercook (1985) (Figura 9) apresenta um funcionamento bastante sofisticado. Esse equipamento é composto por três tanques: o



tanque C é destinado ao meio de cultura novo; o tanque F, ao meio em uso; e o tanque K, ao meio usado, que será descartado. Através de um sistema de programação, a válvula solenoide H direciona o fluxo de meio. Inicialmente, o meio novo é inserido no frasco C via entrada B. Do frasco C, o meio é transferido para o frasco F pelo acionamento da bomba peristáltica D. Do frasco F, o meio é transferido para a câmara de cultivo I pela ação da bomba peristáltica G e da válvula solenoide

Figura 9. Sistema de biorreator de imersão temporária segundo Tisserat e Vandercook (1985): filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (A, E e J); via de entrada do meio de cultura novo para o frasco C (B); frasco de estoque inicial de meio de cultura novo (C); bombas peristálticas (D e G); frasco de meio de cultura em uso (F); válvula solenoide de três vias (H); frasco de meio de cultura usado para fins de descarte (K); câmara de cultivo (I).

de três vias H, que direciona o meio para a câmara de cultivo I. Após a imersão do material de cultivo, o meio retorna, via válvula solenoide H e bomba peristáltica G, para o frasco F e ali permanece até que o ciclo recomece. Ao final de 2, 3 ou 4 semanas, dependendo da espécie em cultivo, o meio em uso é direcionado ao frasco de descarte pela válvula solenoide H, ao final do último ciclo de imersão. Para funcionamento, o sistema depende de uma interface com computador, a fim de determinar qual ação será conduzida e em que ordem. Não basta um simples sistema de temporizadores como em outros modelos de biorreator.

Sistema de biorreator de imersão temporária desenvolvido por Aitken-Christie e Davies (1988)

Aitken-Christie e Jones (1987) desenvolveram um sistema de cultivo sob imersão temporária na propagação de *Pinus*. Nesse sistema, o meio nutritivo líquido é colocado sobre o meio gelificado sobre o qual crescem os explantes. O meio permanece em contato com os explantes por 4 a 6 horas. Após esse período, o meio é retirado através de uma bomba de vácuo, sendo o processo repetido a cada semana. Esse procedimento demonstrou que a adição temporária de meio líquido trazia benefícios ao crescimento dos explantes.

Pouco tempo depois, Aitken-Christie e Davies (1988) desenvolveram um sistema semiautomático de cultivo, no qual plântulas eram cultivadas em um grande recipiente com uma camada de meio gelificado, com adição e remoção automática e periódica de meio líquido, sobre o meio gelificado. O sistema de Aitken-Christie e Davies (1988) (Figura 10) é composto de uma câmara de cultivo A e de dois frascos para meio de cultura: um para meio em uso (H) e outro para meio usado (I).

Do frasco H, o meio é transferido para a câmara de cultivo A, via acionamento da bomba peristáltica B e temporizador multifuncional D. Após a imersão e a permanência na câmara de cultivo por tempo determinado, o meio em uso retorna para o frasco H pelo mesmo caminho da ida. Esse ciclo se repete uma vez por semana até que, ao fim do período de cultivo, o meio é descartado pelo acionamento da bomba peristáltica C, que transfere o meio da câmara de cultivo A para o frasco de meio de descarte I.

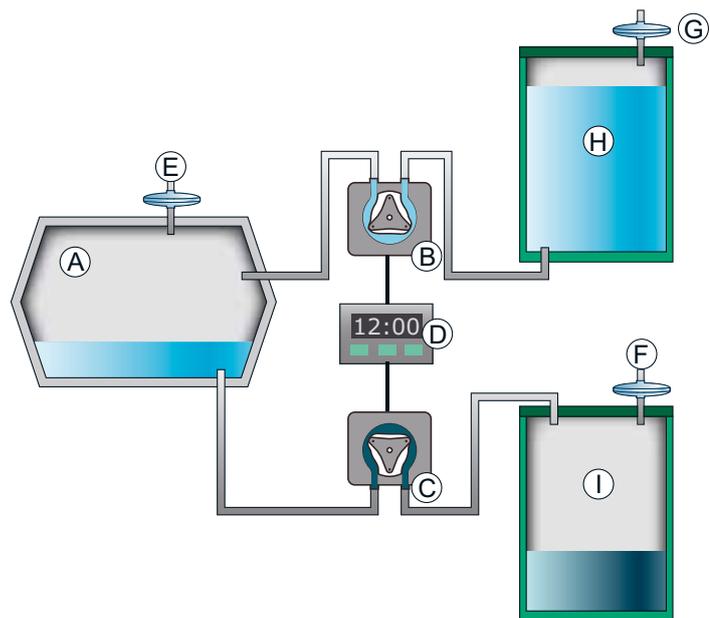


Figura 10. Sistema de biorreator de imersão temporária desenvolvido por Aitken-Christie e Davies (1988): câmara de cultivo (A); bombas peristálticas (B e C); temporizador multifuncional (D); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (E, F e G); frasco de meio em uso (H); frasco de meio usado para descarte (I).

Sistema de biorreator de imersão temporária segundo Simonton et al. (1991)

Simonton et al. (1991) desenvolveram um sistema parecido com o de Aitken-Christie e Davies (1988) (Figura 11). O sistema é constituído de um equipamento automático de micro-propagação, onde o meio líquido é injetado sobre as plântulas em cultivo, de acordo com um esquema de tempo preestabelecido. O controle do funcionamento da bomba peristáltica e das válvulas solenoides é feito via placa microprocessadora conectada a um computador de mesa. Embora esse sistema tenha apresentado um bom desempenho quanto ao preciso controle da exposição dos explantes ao meio de cultura, alguns problemas foram identificados, como o uso de frascos excessivamente grandes, de difícil manuseio, além de problemas com contaminação, especialmente do tipo bacteriana.

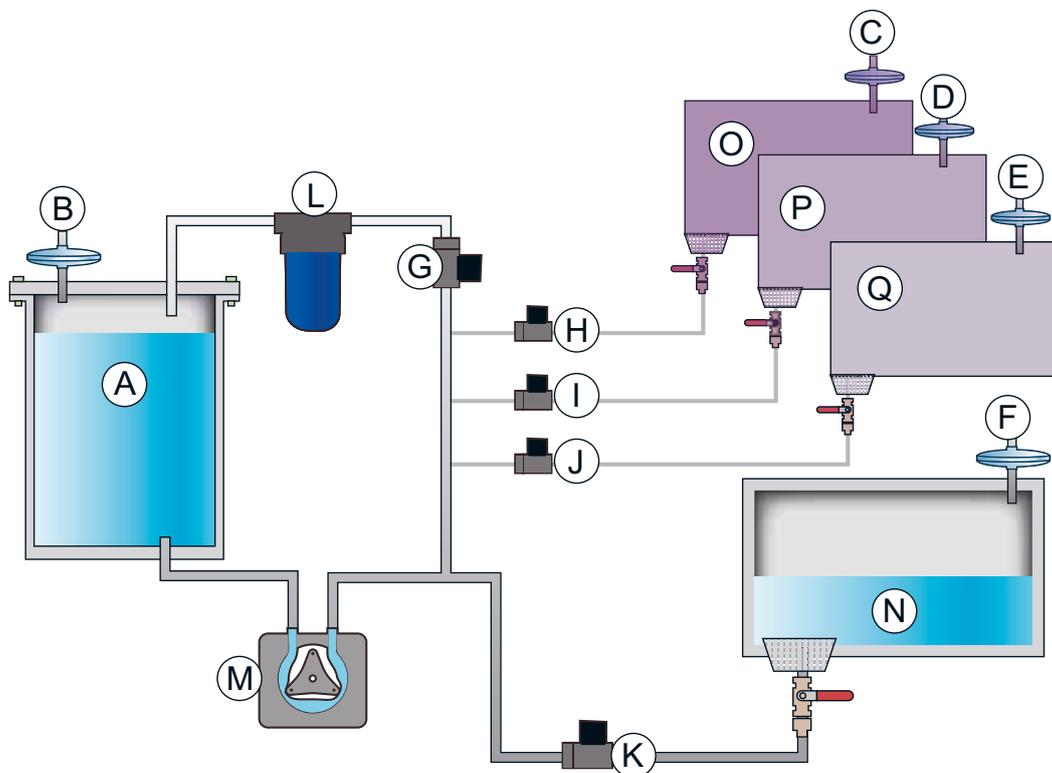


Figura 11. Sistema de biorreator de imersão temporária segundo Simonton et al. (1991): frasco de meio de cultura em uso (A); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (B, C, D, E e F); válvulas solenoides (G, H, I, J e K); filtro de linha para filtragem e clarificação do meio de cultura em uso (L); bomba peristáltica (M); câmaras de cultivo (O, P e Q); frasco de meio para descarte (N).

Biorreator de imersão temporária de acordo com Alvard et al. (1993)

O biorreator de imersão temporária desenvolvido por Alvard et al. (1993) é constituído de um frasco de dois compartimentos, um superior e um inferior, conectados entre si (Figura 12). O meio de cultura é colocado no compartimento inferior; e o material a ser cultivado, no

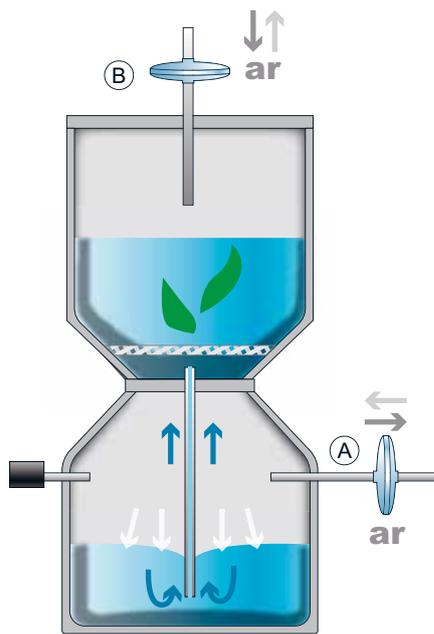


Figura 12. Modelo de biorreator de imersão temporária de acordo com Alvard et al. (1993): filtro de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro, por onde é exercida pressão no compartimento inferior (A); filtro de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro, por onde o ar é expelido do compartimento superior, durante a injeção de ar no compartimento inferior (B); via de entrada do meio de cultura (C).

Biorreator de imersão temporária denominado de Rita

O modelo desenvolvido por Alvard et al. (1993) foi modificado no que se refere à construção, mas o princípio de funcionamento foi mantido, dando origem ao sistema de biorreator comercializado com a denominação de Rita (do francês: *réceptacle à immersion temporaire automatique*) (Teisson et al., 1995) (Figura 13).

O sistema Rita vem sendo testado para várias espécies vegetais, com diferentes tipos de explantes, apresentando resultados excelentes (Alvard et al., 1993; Teisson et al., 1995; Cabasson et al., 1997; Etienne et al., 1997, 1999, McAlister et al., 2005; Carvalho et al., 2019).

superior. Esse meio de cultura passa do compartimento inferior para o superior pela injeção de ar no compartimento inferior. Quando todo o meio passa para o compartimento superior, ocorre borbulhamento e aeração do meio em contato com o material em cultivo. O ar é expelido através de um orifício na tampa do compartimento superior. Após um período preestabelecido, a pressão do ar no compartimento inferior é aliviada, o que faz com que o meio, por gravidade, retorne ao compartimento inferior, permanecendo ali até que o ciclo recomece.

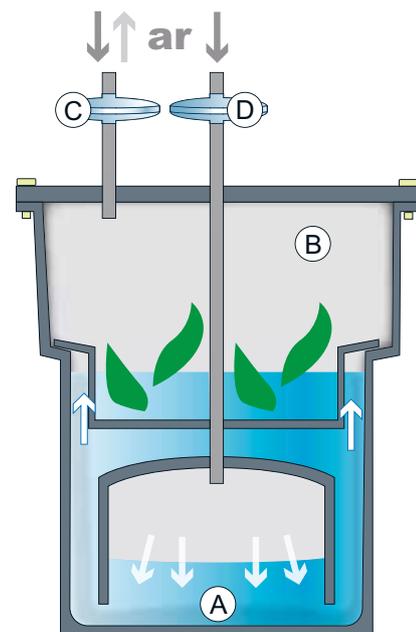


Figura 13. Sistema de biorreator de imersão temporária denominado Rita, tendo como referência o modelo desenvolvido por Alvard et al. (1993): compartimento inferior (A); compartimento superior (B); filtro de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro, por onde é exercida pressão no compartimento inferior (C); filtro de ar de membrana de 0,44 μm de diâmetro, por onde o ar é expelido do compartimento superior, durante a injeção de ar no compartimento inferior (D).

Biorreator de imersão temporária desenvolvido por Lorenzo et al. (1998) e Escalona et al. (1999)

Um exemplo mais recente de modelo de biorreator de imersão temporária foi feito por Lorenzo et al. (1998) para micropropagação de gemas de cana-de-açúcar e Escalona et al. (1999) para gemas de abacaxi (Figura 14). Esse sistema utiliza dois frascos, um para cultivo do material vegetal e outro para estocagem do meio de cultura. A imersão temporária dos explantes é feita pela transferência do meio de cultura do frasco de meio para o frasco de cultivo, já que os frascos estão unidos por mangueiras, dois a dois, configuração também conhecida por frascos gêmeos. A movimentação do meio é feita por pressão ou vácuo, em intervalos programados por sistemas de temporizadores.

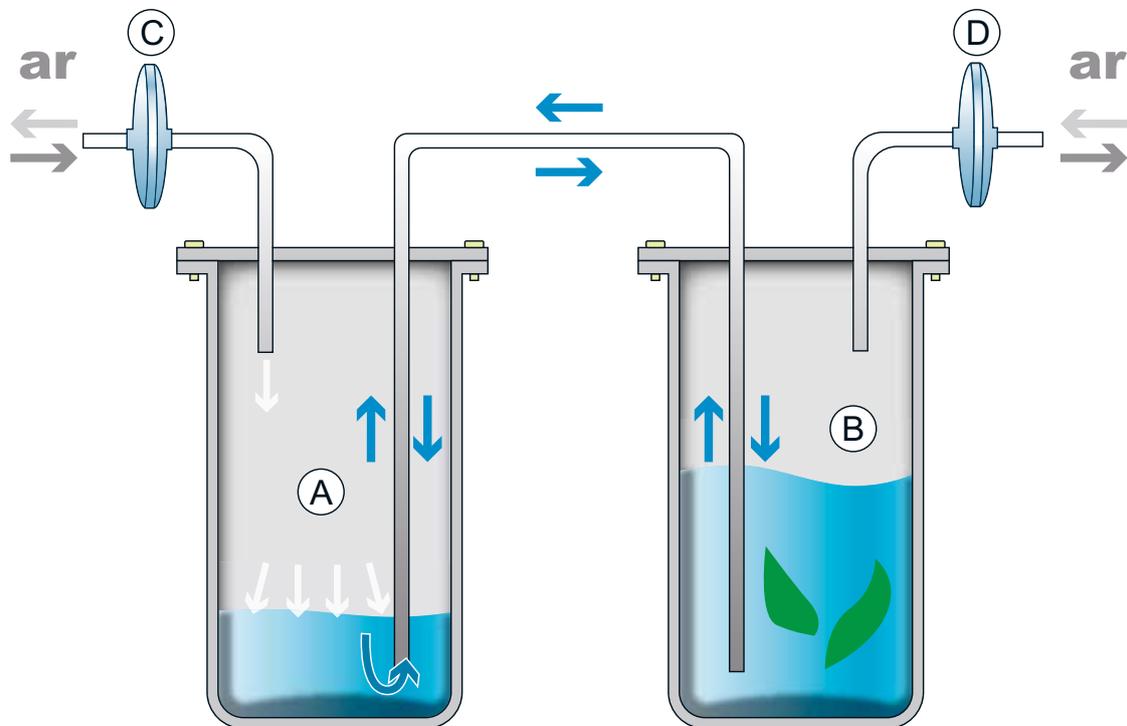


Figura 14. Sistema de biorreator de imersão temporária desenvolvido por Lorenzo et al. (1998) e Escalona et al. (1999): frasco de meio de cultura (A); frasco de cultivo (B); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (C e D).

Biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa)

Em 28 de agosto de 2000, a Embrapa registrou no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Inpi) o pedido de patente de um biorreator de imersão temporária (nº PI0004185-8) (Teixeira, 2011). Em 12 de janeiro de 2016, a carta patente foi concedida à Embrapa (Embrapa, 2016) (Anexo 1).

O modelo desenvolvido pela Embrapa apresenta uma série de características não encontradas em equipamentos anteriores, como será descrito em detalhes mais adiante.

Biorreator do tipo fase gasosa

O biorreator do tipo fase gasosa (*gaseous phase bioreactor*) (Weathers; Zobel, 1992; Takayama; Akita, 1994) é equipado com um suporte perfurado sobre o qual o material em cultivo é posicionado. O meio de cultura pulverizado sobre o material em cultivo é, em seguida, drenado pela base e novamente bombeado e pulverizado em intervalos preestabelecidos (Figura 15). Esse tipo de biorreator apresenta excelentes resultados no cultivo de embriões, gemas e hastas caulinares, porque não há dano mecânico ao explante, nem agitação via borbulhamento.

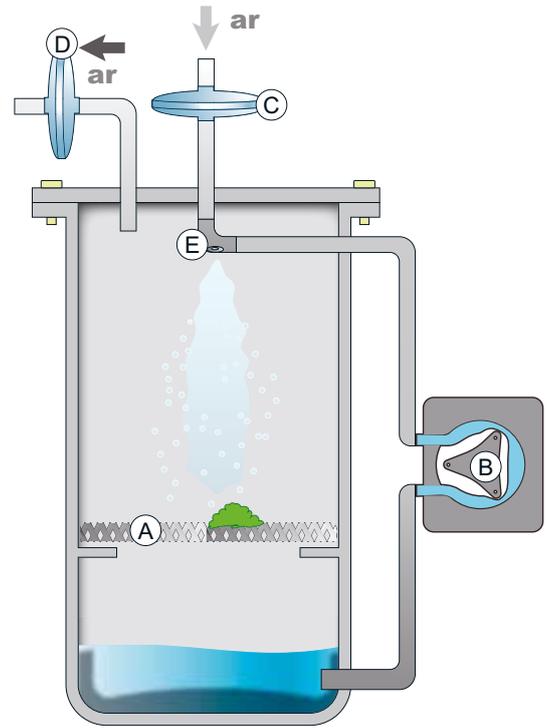


Figura 15. Biorreator do tipo fase gasosa (*gaseous phase bioreactor*): tela onde são posicionados os explantes para cultivo (A); bomba peristáltica (B); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (C e D); bico aspersor de meio de cultura (E).

Biorreator do tipo névoa

Outra categoria de biorreator que não se enquadra nos modelos tradicionais de imersão permanente ou temporária é o do tipo névoa (*mist bioreactor*) (Weathers et al., 2008). Nesse modelo, o meio de cultura é fornecido via névoa, em gotículas muito pequenas, gerada num compartimento à parte do frasco de cultivo, via ultrassom (Figura 16).

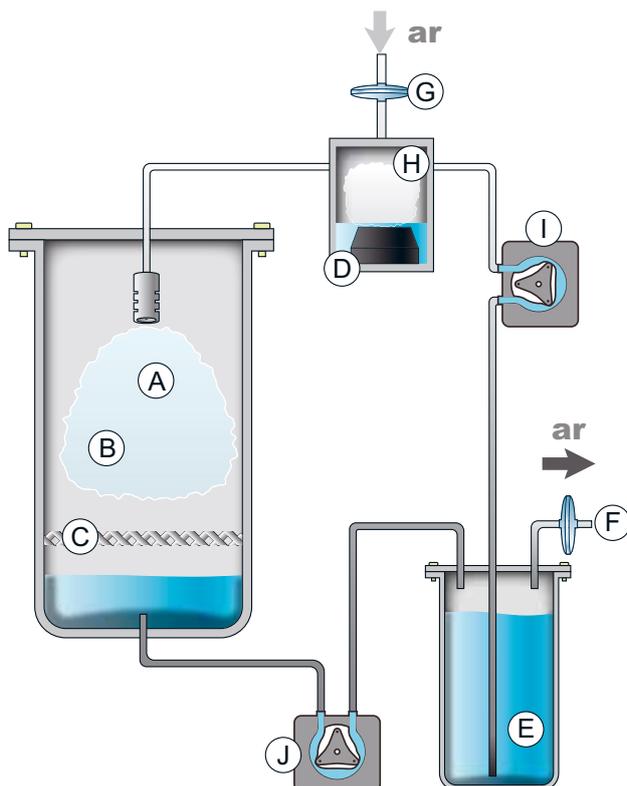


Figura 16. Biorreator do tipo névoa (*mist bioreactor*) de acordo com Weathers et al. (2008): bico nebulizador do meio de cultura (A); compartimento superior (B); tela de cultivo (C); equipamento de ultrassom (D); frasco para coleta do meio de cultura, que se encontra em uso (E); filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (F e G); compartimento formador de névoa por ultrassom (H); bombas peristálticas (I e J).

Biorreator do tipo imersão por bolhas (BIB)

Outro modelo de biorreator é o de imersão por bolhas (BIB), desenvolvido por Soccol et al. (2008). Esse modelo é feito de um cilindro de vidro ou qualquer outro material transparente, com dois compartimentos, divididos transversalmente por uma placa porosa, com poros de 170 μm a 220 μm (Figura 17). A parte inferior tem uma altura de 3,5 cm com entrada de ar. Na parte superior, que tem 24,5 cm de altura, são colocadas as peneiras (malha 18). Todos os componentes internos são feitos de aço inoxidável. O biorreator possui 28 cm de altura e 9 cm de diâmetro, mas essas dimensões podem ser alteradas. O equipamento funciona com um sistema interligado por mangueiras flexíveis de silicone, através do qual o explante recebe aeração e solução nutritiva por meio de bolhas que se formam na parte inferior e se movem verticalmente até atingir o topo do equipamento; com isso, o material vegetal fica imerso numa mistura de bolhas.

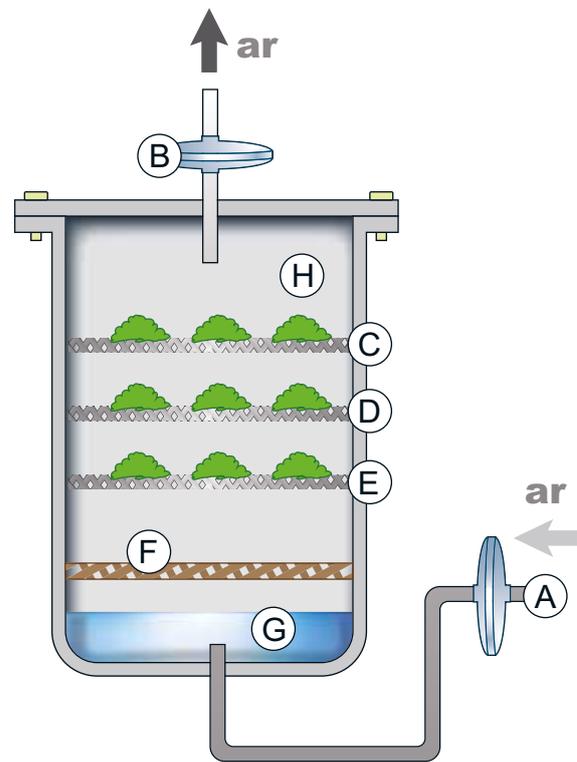


Figura 17. Biorreator do tipo imersão por bolhas desenvolvido por Soccol et al. (2008): filtros de ar de membrana de 0,22 μm ou 0,44 μm de diâmetro (A e B); peneiras, com malha 18, onde são posicionados os explantes (C, D e E); placa porosa, com poros de 170 μm a 220 μm , responsável pela formação das bolhas durante a movimentação do meio de cultura (F); compartimento inferior, onde é colocado o meio de cultura (G); compartimento superior, onde os explantes são cultivados (H).

Sistema de biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa)

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia desenvolveu e patenteou um sistema de biorreator de imersão temporária (Embrapa, 2016) (Anexo 1), tomando como base o princípio de funcionamento do modelo desenvolvido por Alvard et al. (1993) (Figura 18).

O biorreator desenvolvido pela Embrapa apresenta as seguintes características que normalmente não são encontradas em outros modelos de biorreatores:

- O equipamento pode utilizar diferentes tipos de frascos, que podem variar quanto aos seguintes aspectos: tamanho, formato, constituição, tipo de tampa, transparência, etc.
- A montagem é relativamente simples e os componentes (válvulas solenoides, temporizadores, fonte de ar comprimido, filtros de ar, fluxômetro, conexões metálicas, mangueiras de silicone, etc.) são de fácil aquisição.

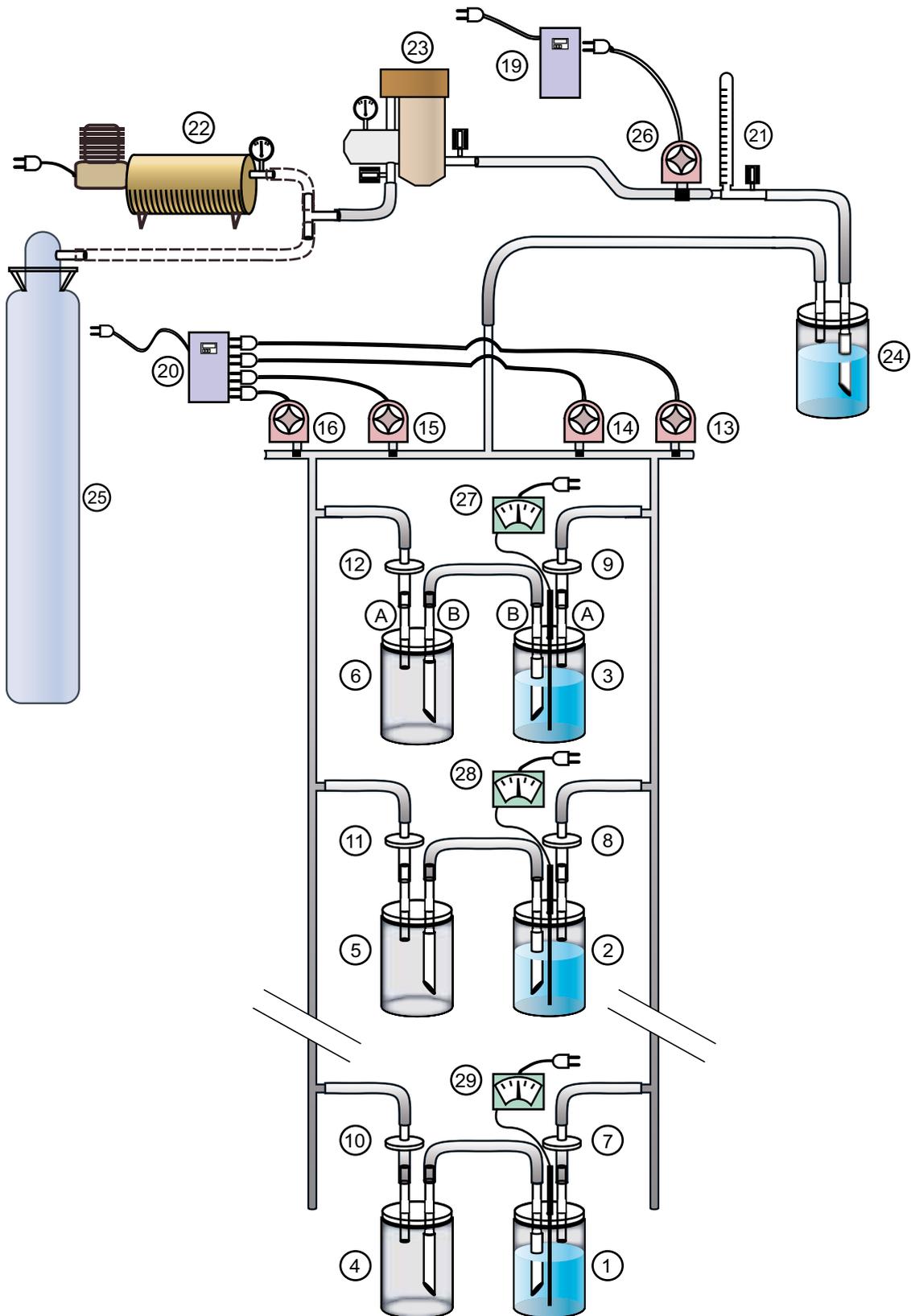


Figura 18. Desenho esquemático do biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa: frascos de cultivo (1, 2, 3); frascos de meio (4, 5 e 6); filtros de ar de 50 mm de diâmetro e poros de 0,22 μm (7, 8, 9, 10, 11 e 12); válvulas solenoides (13, 14, 15, 16 e 26); temporizadores (19 e 20); fluxômetro (21); compressor de ar (22); filtro de óleo (23); frasco lavador de ar (24); cilindro de ar artificial (25); eletrodos (27, 28 e 29); canalização (30 e 31).

- c) O sistema é modular, tendo sido desenhado para comportar diferentes pares de frascos (frascos gêmeos), o que é determinado pela extensão das tubulações, pelo tamanho da estante e pela potência do compressor ou da fonte de ar comprimido.
- d) O equipamento pode ser utilizado em diferentes ambientes, no que diz respeito à intensidade de luz, ao fotoperíodo e à temperatura.
- e) O equipamento foi desenvolvido para cultivo em regime de imersão temporária, mas, com pequenos ajustes, pode ser utilizado para cultivo em regime de imersão permanente.
- f) No regime de imersão permanente, o equipamento pode funcionar sob regime de borbulhamento contínuo com diferentes fluxos de ar ou com borbulhamento temporário, dependendo, para isso, de modificações na programação dos temporizadores.
- g) O equipamento permite fazer, ainda, uso de uma fonte de ar artificial com dosagens específicas de oxigênio, nitrogênio e gás carbônico.
- h) O equipamento pode ser utilizado tanto para cultivo de células, embriões e sementes, quanto para cultivo de gemas, segmentos nodais, raiz e plântulas.
- i) Embora tenha sido desenvolvido para cultivo de explantes vegetais, é possível adaptá-lo para cultivo de bactérias, algas e fungos.

Memorial descritivo de um kit de 40 pares de frascos

A seguir, serão descritos os principais componentes do biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa, tomando como base o desenho esquemático mostrado na Figura 18.

Frascos de meio de cultura (itens 1, 2 e 3) e frascos de cultivo (itens 4, 5 e 6)

Tanto para meio de cultura quanto para cultivo, são utilizados frascos de 5 L iguais aos utilizados na comercialização de água mineral. Esse tipo de frasco foi escolhido por ser atóxico – feito de plástico virgem – de fácil aquisição e de custo relativamente baixo. Além disso, os pares de frascos que contêm no máximo 1 L de meio são de fácil manipulação, principalmente durante os procedimentos em capela de fluxo laminar de ar estéril. O uso de frascos maiores, por exemplo, de 10 L ou mais, dificulta sobremaneira a manipulação, principalmente na capela de fluxo laminar.

A combinação de um frasco de 2,5 L ou 5 L para o meio de cultura e um frasco de 5 L ou 10 L para o cultivo pode ser usada para algumas culturas, embora essa combinação

precise ser cuidadosamente ajustada e testada antes de ser estabelecida como padrão na multiplicação em larga escala. Porém, antes de escolher o modelo e a marca do frasco a ser utilizado, deve-se verificar a sua disponibilidade no mercado. Os frascos utilizados para água mineral – com exceção de algumas marcas – estão protegidos por propriedade intelectual e não poderão ser utilizados.

Frascos de plásticos de PET [(Poli(tereftalato de etileno))] menores que 2,5 L geralmente não são apropriados para a montagem de biorreatores, pois suas bocas são de pequeno diâmetro, o que dificulta a instalação de bicos e mangueiras, além de dificultar a introdução de certos tipos de explantes.

Outros frascos de vidro de menor volume (0,25 L, 0,5 L, 1 L e 2 L), comuns em laboratórios, podem ser utilizados para determinados tipos de cultivo. Além de serem autoclaváveis, o diâmetro das tampas e sua constituição permitem a instalação de bicos para as mangueiras, além de facilitar a inoculação de material para cultivo. Entretanto, esses tipos de frascos são mais apropriados para os modelos experimentais, nos quais se utiliza pequeno número de frascos.

Filtro de membrana para esterilização do ar de entrada de cada frasco (itens 7, 8, 9, 10, 11 e 12)

Vários tipos de filtros para esterilização do ar podem ser usados. Além do filtro de 50 mm de diâmetro, há outros tipos de filtro, como os de 30 mm, autoclaváveis, e os filtros descartáveis de 15 mm e 20 mm. Estes últimos são difíceis de ser utilizados, uma vez que são feitos para uso, basicamente, em seringas. Os filtros de 50 mm de diâmetro são os mais adequados, porque apresentam uma área de filtração maior e, com isso, exercem menor resistência à passagem do ar, além de ter uma vida útil mais longa (Figura 19).

O filtro com diâmetro de poro de $0,22\ \mu\text{m}$ é o mais indicado, embora possa ser testado e eventualmente utilizado de forma rotineira o de $0,45\ \mu\text{m}$. A vantagem do uso de filtro com poro maior é a menor resistência à passagem do ar, além de ser mais barato. O uso rotineiro deste último tipo de filtro só deve ser feito após testes cuidadosos.



Fotos: João Batista Teixeira

Figura 19. Filtro autoclavável de membrana com poros de $0,22\ \mu\text{m}$ ou $0,45\ \mu\text{m}$ e 50 mm de diâmetro, para esterilização do ar proveniente do compressor.

Para cada frasco, é possível fazer a combinação de dois filtros (um de 0,45 μm conectado em série com outro de 0,22 μm). No entanto, o filtro de 0,22 μm deve estar mais próximo do frasco. O uso dessa combinação tem a vantagem de reduzir a chance de contaminação do meio de cultura, embora tenha a desvantagem de encarecer o equipamento e de aumentar a resistência à passagem do ar para os frascos. Entretanto, para ambientes que possam conter grandes quantidades de contaminantes no ar, essa combinação pode ser determinante na redução da taxa de contaminação das culturas.

A resistência à passagem do ar no sistema – que deve ser sempre minimizada – é a soma das resistências dos filtros (filtros duplos), a qual pode atingir valores muito altos e prejudicar o funcionamento do equipamento, requerendo uma pressão de operação muito alta, o que é indesejável. Com o uso de um filtro por frasco, a resistência à passagem do ar cai quase pela metade, já que a resistência do filtro de 0,22 μm é um pouco maior que a do filtro de 0,44 μm .

Para prevenir possíveis problemas de contaminação do meio de cultura, em vez do uso de filtros duplos, a melhor alternativa é procurar manter a sala de cultura no nível de contaminação o mais baixo possível. Nesse caso, basta apenas o uso de um filtro com membranas de poro de 0,44 μm de diâmetro.

Válvula solenoide para gás (itens 13, 14, 15, 16 e 26)

Válvulas solenoides são utensílios elétricos compostos por uma bobina (solenoide) e um pequeno êmbolo de metal, o qual se movimenta dentro de um cilindro quando a válvula é energizada. A bobina é montada num corpo metálico, com orifícios, de tal forma que é possível interromper ou liberar automaticamente, via temporizador, o fluxo de ar no sistema.

Existem muitos tipos de válvulas solenoides no mercado, de diferentes preços e características de construção e funcionamento. Para a montagem do modelo de biorreator da Embrapa, utilizaram-se cinco válvulas solenoides: três do tipo normalmente fechadas (13, 15 e 26) e duas válvulas do tipo normalmente abertas (14 e 16), com orifício interno de 4,0 mm (Figura 20). O diâmetro do orifício da válvula deve ser suficientemente grande para permitir a passagem do ar com o mínimo de resistência, dado que o sistema trabalha sob baixa pressão.

Válvulas com orifício interno menor que 0,4 mm não devem ser utilizadas, pois exercem alta resistência à passagem do ar e exigem pressão de trabalho muito alta, sobrecarregando o compressor desnecessariamente. Além disso, o que é mais importante, com a liberação de pressão do sistema feita por duas válvulas alternadamente (itens 13 e 16 da Figura 18), ocorre contrapressão no momento em que o temporizador 20 é desligado para finalização do ciclo de imersão/emersão. Com isso, pode haver retorno de certa quantidade do meio de cultura para os frascos de cultivo, o que é indesejável. Para evitar que isso aconteça, é fundamental utilizar válvulas solenoides com orifício interno de diâmetro igual ou maior que 4,0 mm, além da programação adequada dos temporizadores.



Foto: João Batista Teixeira

Figura 20. Válvulas solenoides de duas vias.

Temporizadores digitais com capacidade de pelo menos 16 programas e intervalo de programação mínima de 1 minuto (itens 19 e 20)

O temporizador digital é o responsável por acionar as válvulas solenoides, a fim de que o ciclo de imersão/emersão ocorra, de forma automática, ou seja, segundo a programação preestabelecida (Figura 21). O sistema requer dois temporizadores independentes, que funcionam com os relógios sincronizados, ou um temporizador duplo, cujo relógio interno é um só, não sendo necessária a sincronização manual. Um terceiro temporizador pode ser necessário se o sistema de iluminação for específico para cada kit, já que as lâmpadas devem estar ligadas por um período predefinido, por exemplo, 14 horas por dia. Alternativamente, podem ser utilizados controladores lógicos programáveis (CLPs), que podem comportar toda a programação necessária para o funcionamento do biorreator, embora seja um sistema de maior custo e requeira a ajuda de pessoal especializado



Foto: João Batista Teixeira

Figura 21. Temporizadores digitais.

na sua montagem e programação. Da mesma forma, é possível fazer o controle de todo o sistema por uma interface com um computador, incluindo uma interface wi-fi, que pode estar conectada à internet.

Fluxômetro com resolução de 1 L por minuto para medição da vazão de ar para o sistema (item 21)

Fluxômetros são pequenos aparelhos utilizados na medição do fluxo de ar dentro de um sistema (Figura 22). A medição é normalmente feita em litros por minuto. É um utensílio muito simples que mostra em tempo real a velocidade com que o ar transita no interior da tubulação. Não é um equipamento obrigatório para o biorreator, mas pode ser utilizado com algumas vantagens. É barato, preciso e permite monitorar o fluxo de ar de forma independente do manômetro acoplado ao filtro de óleo. O fluxômetro deve ser usado de forma adicional ao monitoramento do funcionamento via manômetro. A presença de manômetro no fluxômetro (Figura 22) é desnecessária, já que o monitoramento da pressão é feito em outro ponto do sistema. O fluxômetro é instalado o mais próximo possível da entrada de ar nas válvulas solenoides 13, 14, 15 e 16 (Figura 18).

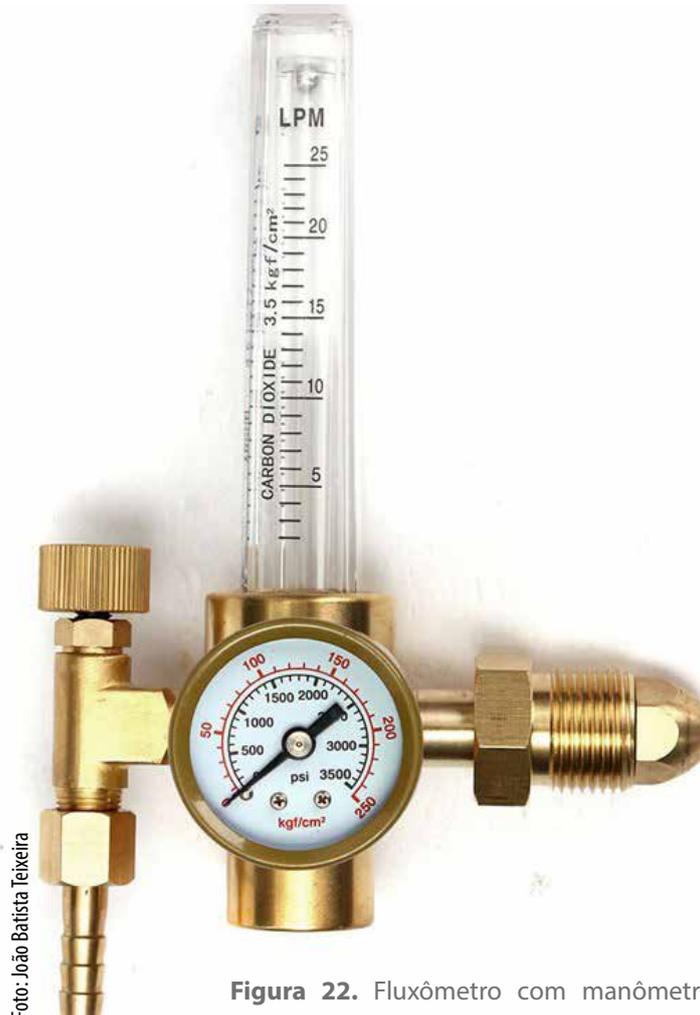


Figura 22. Fluxômetro com manômetro para monitoramento da pressão.

Compressor de ar com reservatório de ar comprimido e com manômetro para ajuste da pressão de funcionamento (item 22)

Em princípio, qualquer compressor de ar pode ser utilizado, desde que apresente reservatório de ar comprimido (Figura 23). Pequenas unidades experimentais de biorreator podem ser montadas com compressores simples, até mesmo com aqueles utilizados para aquário ou similar.



Fotos: João Batista Teixeira

Figura 23. Compressores de ar, com tanque de ar comprimido: compressor de ar comum lubrificado a óleo (A); compressor de ar não lubrificado a óleo (B).

Como a maioria dos compressores é lubrificada a óleo, é essencial a conexão de um filtro de óleo na saída do tanque de ar comprimido. Compressores que não são lubrificados a óleo estão disponíveis no mercado e podem ser utilizados, embora sejam bem mais caros, não sendo recomendados para uso na produção de mudas em larga escala. Entretanto, esses apresentam uma grande vantagem, que é o baixo nível de ruído quando em funcionamento, o que, em determinadas circunstâncias, pode ser considerado importante, sobretudo para unidades experimentais.

Filtro de óleo com manômetro para monitoramento da pressão de funcionamento do sistema (item 23)

O filtro de óleo é essencial quando se usa compressor lubrificado a óleo (Figura 24).



Foto: João Batista Teixeira

Figura 24. Filtro de óleo para filtragem do ar que vem do compressor.

Além de filtro de óleo, ele funciona como filtro para pequenas partículas, o que pode ser interessante mesmo quando se utilizam compressores não lubrificados a óleo. O filtro de óleo possui um manômetro acoplado, o que é essencial para o monitoramento da pressão de trabalho do sistema.

Frasco lavador de ar (item 24)

A instalação do frasco lavador de ar visa umidificar o ar que entra no sistema, visto que, no processo de compressão de ar, há condensação de água e consequente desidratação do ar que entra nos frascos, e isso pode levar à desidratação do meio de cultura.

O frasco lavador de ar também contribui para retirada de impurezas sólidas e, pela presença de carvão ativado, são retirados gases provenientes do tanque de ar comprimido.

Nos modelos mais recentes, o frasco lavador de ar foi eliminado, uma vez que se verificou que esse aparato era desnecessário quando não prejudicial. O aumento de umidade do ar no sistema pode estimular o crescimento de fungos no interior da tubulação, sobrecarregando os filtros de ar, além de aumentar as chances de contaminação do meio de cultura.

A instalação de filtros adicionais na entrada da canalização de cada prateleira poderia ser interessante, já que isso iria contribuir para melhorar a qualidade do ar que chega aos filtros de membrana e, conseqüentemente, aumentaria sua vida útil. Entretanto, não foi possível localizar no mercado, filtros de ar que se ajustassem a essa finalidade. Além disso, a instalação de tais filtros poderia aumentar substancialmente a resistência à passagem do ar, dificultando o funcionamento.

Cilindro de ar artificial (item 25)

Cilindro de ar artificial nada mais é do que um cilindro de ar comprimido que contém uma mistura predeterminada de gases, conforme a solicitação feita ao fornecedor. A concentração básica do ar artificial é de 78% de nitrogênio e 21% de oxigênio. A concentração de CO₂ vai depender da demanda do solicitante. Normalmente o ar atmosférico apresenta uma concentração entre 350 ppm e 400 ppm de CO₂.

O cultivo de plantas em ambiente com aumento da concentração de CO₂ é benéfico. A concentração pode chegar a 1.500 ppm, e o intervalo adequado para testes de cultivo da maioria das espécies é de 800 ppm a 1.200 ppm. O aumento da concentração de CO₂ só se justifica para cultivo autotrófico, ou seja, com meio de cultura desprovido de sacarose e na presença de alta intensidade luminosa.

O uso de cilindros com ar artificial só se justifica em testes experimentais, já que o custo desestimula o seu uso para fins de produção de mudas em larga escala. Caso o teste com ar artificial com teor de CO₂ aumentado mostre grande benefício, a alternativa mais econômica é o ajuste da concentração de CO₂ da sala de cultura toda, já que o metro cúbico de CO₂ puro é muito mais barato que o metro cúbico de ar artificial. Além disso, o consumo de CO₂ por metro cúbico da sala é de apenas 0,6 L para atingir uma concentração do ar da sala de 1.000 ppm e uma concentração inicial de CO₂ do ar da sala de 400 ppm.

Eletrodo para monitoramento do pH e condutividade elétrica (itens 27, 28 e 29)

A presença de eletrodos em, pelo menos, um frasco tem o propósito de monitorar alguns parâmetros importantes relacionados ao crescimento do explante e à presença de contaminantes microbianos (itens 27, 28 e 29 da Figura 18). Pela medição da condutividade, de forma geral é possível avaliar o consumo dos nutrientes. Já pelo uso de eletrodos específicos, é possível avaliar o consumo de diferentes nutrientes, como fósforo, potássio, cálcio, entre outros. Por sua vez, pela avaliação do pH é possível avaliar mudanças bruscas nesse parâmetro, que podem estar associadas à presença de fungos ou bactérias.

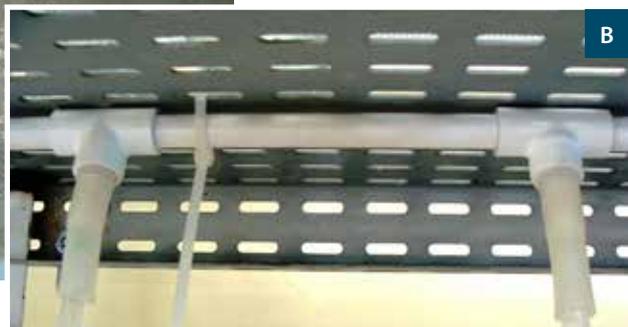
O uso de eletrodos depende do emprego de frascos e tampas apropriados que possam comportar tantos eletrodos quantos forem desejados, permitindo a leitura dos parâmetros em tempo real. Dessa forma, não é necessária qualquer manipulação dos frascos e das culturas, minimizando as chances de contaminação. Outra condição importante é que, para serem conectados aos frascos, os eletrodos precisam estar estéreis. Para isso, é necessário que suportem a esterilização por autoclavagem ou química.

Tubulação de PVC de 15 mm para conexão dos frascos em cada prateleira (itens 30 e 31)

Ao longo de cada prateleira, no sentido horizontal, são utilizadas duas linhas de cano de PVC de 15 mm de diâmetro externo e 11 mm de diâmetro interno ou qualquer outro tipo de tubulação, no entanto o de PVC é o mais prático e barato para kits experimentais (Figura 25). Para produção industrial, outras alternativas são mais apropriadas, como as mangueiras flexíveis, que permitem a conexão por engates rápidos, sobretudo das mangueiras conectadas aos frascos. Cada linha de cano é entremeada por conexões do tipo T, sendo um T para cada frasco. Ao final da linha, para o último frasco, basta um joelho ou um T com um



Figura 25. Tubulação horizontal de PVC de 15 mm de diâmetro externo para conexão com os frascos em cada prateleira: visão geral da linha dupla de canos da prateleira (A) e detalhe (B).



dos orifícios fechado. A conexão dos Ts com a mangueira, para cada frasco, é feita por um adaptador ou redutor, a fim de que se torne compatível com o diâmetro da mangueira de silicone que conecta os frascos.

Tubulação de PVC de 28 mm para conexão das prateleiras

Em uma das laterais da estante, são instaladas duas linhas de cano de PVC de 28 mm de diâmetro externo, no sentido vertical (Figura 26). Na altura de cada prateleira, são instalados os Ts para conexão às duas linhas de cano de cada prateleira. Essa canalização apresenta um diâmetro maior que a canalização das prateleiras, a fim de permitir uma distribuição mais uniforme da pressão do ar antes de chegar até os frascos. Com isso, a troca do meio é feita de forma sincronizada em todos os frascos, independentemente da prateleira. Cada linha de tubulação de PVC de 28 mm é conectada às válvulas solenoides. A conexão dessa canalização com as duas linhas de cano de cada estante e com as duas linhas que conectam as válvulas solenoides é feita com mangueiras de silicone com diâmetro compatível.

Foto: João Batista Teixeira



Figura 26. Tubulação lateral de PVC de 28 mm de diâmetro para conexão das prateleiras.

Mangueiras de silicone para conexão dos frascos, filtros e canalização de PVC

Mangueiras de silicone de 10 mm de diâmetro externo, 6 mm de diâmetro interno e 2 mm de parede são usadas para conexão dos frascos com os filtros de ar e com as tubulações de PVC de cada prateleira (Figura 27).

Esse tipo de tubulação é usado para conectar os frascos aos filtros de ar e os filtros de ar às duas tubulações horizontais de cada prateleira. As mangueiras de silicone são flexíveis e autoclaváveis, por isso são as mais indicadas para conexão dos frascos, filtros e canalização de PVC.



Foto: João Batista Teixeira

Figura 27. Mangueira de silicone para conexão dos frascos com o filtro de ar e a tubulação horizontal de PVC.

Tubulação de silicone para o interior dos frascos

Mangueiras com a mesma especificação – 10 mm de diâmetro externo, 6 mm de diâmetro interno e 2 mm de parede – são utilizadas no interior dos frascos a fim de que se ajustem com facilidade ao formato dos frascos e não interfiram no crescimento dos explantes (Figura 28). Um kit de 50 pares de frascos demanda algo em torno de 100 m de mangueira de silicone.



Foto: João Batista Teixeira

Figura 28. Mangueiras de silicone para o interior dos frascos.

Tampa para os frascos, com dois bicos para conexão das mangueiras

A tampa utilizada nos frascos pode ser de PVC ou de qualquer outro material autoclavável. O importante é que apresente dois orifícios com bicos sobressalentes, tanto na parte externa quanto na interna, com diâmetro externo compatível com o diâmetro interno da mangueira, ou seja, diâmetro externo de 8 mm (2 mm a mais que o diâmetro interno das mangueiras, que é de 6 mm). Diâmetro interno da mangueira menor em 2 mm permite uma boa fixação dela com o bico da tampa do frasco (Figura 29).



Foto: João Batista Teixeira

Figura 29. Tampa com orifícios e bicos sobressalentes utilizada nos frascos.

Para um pequeno número, essas tampas podem ser feitas por profissional de microtornearia, a partir de material plástico autoclavável – PVC ou nylon. Para grande número, é mais fácil e barato adquirir as tampas diretamente do mercado.

Conexão do tipo T para a extremidade da mangueira no interior dos frascos

Na extremidade de cada mangueira, no interior dos frascos, é conectado um T, cujas dimensões são as seguintes: 8 mm de diâmetro externo, 4 mm de diâmetro interno e 2 mm de parede (Figura 30).



Foto: João Batista Teixeira

Figura 30. Conexões do tipo T instaladas na extremidade das mangueiras no interior de cada frasco.

A instalação desse tipo de T na extremidade da mangueira no interior dos frascos tem a função de duplicar a abertura da mangueira, além de mudar a posição das aberturas para as laterais. Com isso, o entupimento da entrada da mangueira é menos provável. Para casos específicos, é possível instalar adicionalmente uma tela nas duas entradas dos Ts, a fim de impedir qualquer tipo de oclusão dos orifícios. Essa adaptação é feita, principalmente, para o cultivo de explantes pequenos, como embriões, calos e raízes. É oportuno lembrar que o cultivo de calos é conduzido de forma mais apropriada sob imersão permanente, não

havendo necessidade do uso de Ts. Nesse caso, o borbulhamento é feito com adaptador de vidro sinterizado na extremidade da mangueira de modo a otimizar a aeração do meio.

Unidade básica do biorreator (modelo Embrapa)

Na Figura 31, é apresentada a unidade básica de cultivo do biorreator desenvolvido pela Embrapa, constituída pelos dois frascos de 5 L com tampas específicas, conexão de mangueiras de silicone e filtros de ar de 0,22 μm de diâmetro de poro. Essa unidade básica é movimentada no laboratório, sem risco de contaminação microbiológica. Qualquer trabalho de inoculação, troca de meio de cultura ou mudanças em algum segmento de mangueira ou filtro de ar dessa unidade só podem ser feitos em capela de fluxo laminar de ar estéril e com os devidos cuidados de assepsia.

Estante para instalação do kit de biorreator (modelo Embrapa)

A estante utilizada no modelo experimental (Figura 32) apresenta as seguintes dimensões: altura – 3,00 m; largura – 1,00 m; profundidade – 0,45 m; e intervalo entre as prateleiras – 0,50 m.



Figura 31. Unidade básica do biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa: unidade básica do biorreator (A) e detalhe da disposição das mangueiras (B) para funcionamento como biorreator de imersão temporária.



Fotos: João Batista Teixeira

Foto: João Batista Teixeira



Qualquer tipo de estante pode ser utilizado para a montagem do biorreator, desde que a profundidade mínima seja de 0,45 m. A estante descrita é de aço e a altura do pé-direito da sala permite a instalação de 40 pares de frascos: 8 pares em cada uma das 5 prateleiras. Com isso, há um melhor aproveitamento do espaço disponível. A largura da estante pode ser um pouco maior a fim de comportar até 10 pares de frascos. O número máximo é de 50 frascos por kit. É desaconselhável ultrapassar essa quantidade, devido a vários problemas de funcionamento, como a má distribuição da pressão de ar no equipamento, o que interfere na troca de meio entre os frascos.

A proposta inicial é a de que os vários kits de uma mesma biofábrica funcionem de forma independente.

Figura 32. Vista geral do kit experimental de biorreator desenvolvido pela Embrapa.

Para biofábricas grandes, com dezenas de kits em uso, pode-se fazer a agregação de vários kits, como, por exemplo, cinco conectados a um mesmo compressor de ar. Nesse caso, o compressor alimenta uma barra de pressão, na qual são conectados os diferentes kits, via válvula solenoide – uma válvula para cada kit. Para não ocorrer uma queda de pressão muito brusca, os diferentes kits de um mesmo conjunto devem ser programados para horários diferentes de funcionamento. Por exemplo, o primeiro kit seria programado para funcionar às 6h da manhã, o segundo às 6h10, o terceiro às 6h20 e, assim por diante, até o quinto kit, que é programado para funcionar às 6h40. Às 7h da manhã, o ciclo de imersão/emersão de todos os kits já teria ocorrido, e o novo ciclo só voltaria a ocorrer após o intervalo de tempo programado para novo ciclo de imersão/emersão, que poderia ser, por exemplo, às 10h ou mesmo às 12h, para ciclos com a frequência de 6 ou 4 vezes por dia, respectivamente.

Unidades menores, com 20 pares de frascos, ou menos, podem ser montadas em estantes menores, diferentes da especificada anteriormente. Se o número de pares de frascos não ultrapassar uma dezena, a instalação pode ser feita numa simples bancada, desde que tenha suporte para instalação das lâmpadas e tubulações de ar.

Da mesma forma, um pequeno biorreator pode ser montado no interior de uma câmara de crescimento, desde que a bomba compressora possa ser instalada internamente ou a fonte de pressão possa vir de uma fonte externa.

Funcionamento do biorreator (modelo Embrapa) sob regime de imersão temporária

O biorreator desenvolvido pela Embrapa permite várias configurações, como pode ser visto nas diferentes figuras apresentadas na patente (Anexo 1). A seguir, serão descritas duas configurações, que permitem o funcionamento no regime de imersão temporária e no regime de imersão permanente, tomando como base a disposição das ligações por mangueira entre os frascos, além da programação dos temporizadores.

Para o bom funcionamento do kit de biorreator, uma série de ações precisam ser conduzidas, as quais dependem, principalmente, das características de construção de cada kit. Na Figura 18, procurou-se mostrar a disposição e a conexão entre as diferentes partes e peças que compõem o biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa. Nessa configuração, foram utilizadas cinco válvulas de duas vias, das quais três são normalmente fechadas (13, 15 e 26) e duas normalmente abertas (14 e 16).

Para iniciar o funcionamento, o compressor de ar (item 22 da Figura 18) é ligado no modo automático, ou seja, uma vez ligado, a pressão no tanque de ar comprimido aumenta até atingir um valor entre 80 psi e 120 psi (libras por polegada ao quadrado), dependendo do modelo utilizado. Entretanto, a pressão no tanque de ar comprimido não é a pressão de funcionamento do sistema, a qual é muito menor, algo em torno de 10 psi. Assim, a pressão do ar na saída do tanque de ar comprimido precisa baixar até esse valor, o que é feito por uma válvula reguladora de pressão, que já vem acoplada ao compressor. Além do ajuste

da pressão do ar, por essa válvula realiza-se um ajuste mais fino por meio do manômetro acoplado ao filtro de óleo (item 23 da Figura 18).

Em síntese, tomando como base o esquema mostrado na Figura 18, o funcionamento do biorreator no regime de imersão temporária é basicamente o seguinte:

- a) O ar entra no tanque de ar comprimido por ação do compressor (22).
- b) O ar sob pressão passa pelo filtro de óleo (23) e chega até a primeira válvula solenoide (26). A pressão no manômetro, acoplado ao filtro de óleo, deve marcar um valor próximo de 10 psi.
- c) A válvula solenoide (26) deve estar aberta, ou seja, ligada, já que é uma válvula normalmente fechada; com isso, o fluxo de ar segue, passa pelo fluxômetro (21) e pelo lavador de ar (24). Em seguida, chega até as válvulas solenoides de número 14 (normalmente aberta) e de número 15 (normalmente fechada).
- d) Em seguida, o fluxo de ar chega à canalização (30), uma vez que a válvula solenoide de número 13 encontra-se fechada.
- e) O fluxo de ar segue e passa pelos filtros esterilizadores de ar (9, 8 e 7) e chega até os frascos de meio (3, 2 e 1).
- f) Com isso, há aumento de pressão do ar no interior dos frascos (3, 2 e 1) e o meio de cultura começa a subir pela mangueira de silicone que une os frascos.
- g) No máximo em 1 minuto, o meio de cultura passa para os frascos de cultivo (6, 5 e 4) e, quando todo o meio é transferido para esses frascos, ocorrem alguns segundos de borbulhamento. A transferência do meio do frasco de meio para o frasco de cultivo é feita de forma simultânea para todos os pares de frascos, do kit, demorando, no máximo, 1 minuto.
- h) Durante a transferência do meio do frasco de meio para o frasco de cultivo, o ar segue via filtros esterilizadores de ar (12, 11 e 10) e chega à canalização (31). A pressão nessa canalização é liberada pela válvula solenoide (16), que se encontra aberta, já que é do tipo normalmente aberta.
- i) Ao final de 1 minuto, o temporizador (20) libera energia elétrica para as válvulas 13, 14, 15 e 16. Com isso, há inversão de funcionamento das válvulas: as de número 13 e 15 se abrem e as de número 14 e 16 se fecham, havendo inversão no sentido do fluxo de ar no sistema.
- j) O fluxo de ar, então, passa pela válvula 15, chega até a canalização 31 e, via filtro de esterilização de ar (12, 11 e 10) atinge os frascos de cultivo (6, 5 e 4).
- k) A pressão nesses frascos aumenta e o meio de cultura inicia seu caminho de volta para os frascos de meio (3, 2 e 1) pelo mesmo caminho da ida. Após 1 minuto, todo o meio de cultura já deve ter sido transferido para os frascos de meio.
- l) Ao final do segundo minuto de funcionamento, o temporizador (19) desativa o funcionamento da válvula 26. Com isso, há queda de pressão do ar nos frascos 6, 5 e 4 e cessa o borbulhamento nos frascos 3, 2 e 1. O temporizador (20) continua

liberando energia para as válvulas solenoides (13, 14, 15 e 16) por mais 1 minuto, para garantir que a pressão de ar no sistema caia a zero e não haja refluxo de meio dos frascos de meio para os frascos de cultivo.

- m) Ao final, então, de 3 minutos, termina o ciclo de imersão e o sistema volta ao estado de repouso por algumas horas, período que pode ser, por exemplo, de 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 horas, o que define a frequência de imersão diária. A frequência de imersão diária deve ser sempre submúltiplo de 24, para que os ciclos de imersão ocorram sempre nos mesmos horários durante um período de 24 horas pois isso facilita a inspeção periódica do funcionamento do biorreator.

Para que o sistema funcione conforme o descrito, é necessário que os temporizadores 19 e 20 (Figura 18) tenham sido programados de forma adequada. Como exemplo, um programa para imersão de 1 minuto e frequência diária de imersão a cada 3 horas é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Horário programado de funcionamento do temporizador 19 para a válvula solenoide 26 (normalmente fechada) e do temporizador 20 para as válvulas solenoides 13 e 15 (normalmente fechadas) e 14 e 16 (normalmente abertas), para ciclos de imersão de 1 minuto a cada 3 horas e frascos de cultivo da esquerda – 6, 5 e 4 (Figura 18). Para essa programação, o temporizador deve permitir, pelo menos, 16 programas.

Temporizador 19		Temporizador 20	
Liga	Desliga	Liga	Desliga
0h	0h02	0h01	0h03
3h	3h02	3h01	3h03
6h	6h02	6h01	6h03
9h	9h02	9h01	9h03
12h	12h02	12h01	12h03
15h	15h02	15h01	15h03
18h	18h02	18h01	18h03
21h	21h02	21h01	21h03

É importante ressaltar que a Tabela 1 é um exemplo de programação para sistema de imersão temporária, sem período de descanso do meio nos frascos de cultivo. Caso o temporizador permita, pode-se fazer a programação de um período de descanso do meio nos frascos de cultivo, ou seja, uma vez ocorrida a imersão dos explantes, o meio de cultura permanece nos frascos de cultivo por um período predeterminado. Por exemplo, 1 minuto para transferência do meio dos frascos de meio para os frascos de cultivo, seguido de um período de 10 minutos de descanso do meio nos frascos de cultivo e, só ao final desse período, ocorre o retorno do meio para os frascos de meio. Esse tipo de programação permite que o meio de cultura fique em contato com o explante, por qualquer tempo predeterminado, sem que ocorra borbulhamento durante esse período, já que o borbulhamento por longo tempo pode ser prejudicial ao explante. O não borbulhamento nesse caso é proposital, para evitar excesso de oxigenação do meio de cultura.

Na Tabela 2, é mostrado um exemplo de cultivo sob imersão temporária, com uma frequência de imersão de 1 minuto a cada 3 horas e período de descanso do meio nos frascos de cultivo por 10 minutos. É importante ressaltar que essa programação só é possível caso o temporizador 19 permita, pelo menos, 32 programas; e o temporizador 20, 16 programas.

Tabela 2. Horário programado do temporizador 19 para a válvula 26 (normalmente fechada) e do temporizador 20 para as válvulas solenoides 13 e 15 (normalmente fechadas) e 14 e 16 (normalmente abertas), para ciclos de imersão de 1 minuto a cada 3 horas e tempo de descanso do meio nos frascos de cultivo por 10 minutos, sendo o cultivo conduzido nos frascos da esquerda – 6, 5 e 4 (Figura 18).

Temporizador 19			
Liga	Desliga	Liga	Desliga
0h	0h01	0h11	0h12
3h	3h01	3h11	3h12
6h	6h01	6h11	6h12
9h	9h01	9h11	9h12
12h	12h01	12h11	12h12
15h	15h01	15h11	15h12
18h	18h01	18h11	18h12
21h	21h01	21h11	21h12
Temporizador 20			
	Liga		Desliga
	0h11		0h13
	3h11		3h13
	6h11		6h13
	9h11		9h13
	12h11		12h13
	15h11		15h13
	18h11		18h13
	21h11		21h13

Os testes de funcionamento do sistema de biorreator, programação do ciclo de imersão/emersão, são feitos antes da inoculação dos explantes. O sistema deve permitir várias possibilidades de programação, sempre com intervalos mínimos de 1 minuto.

A programação mais comum é aquela em que o tempo de imersão é de 1 ou 2 minutos para a transferência do meio dos frascos de meio para os frascos de cultivo, seguido de 1 ou 2 minutos para transferência do meio dos frascos de cultivo para os frascos de meio, ou seja, um tempo de imersão bastante curto. Para garantir que todo o meio de cultura seja transferido dos frascos de meio para os frascos de cultivo e de volta para os frascos de meio,

é importante ajustar a programação das válvulas com a pressão de funcionamento. Com isso, há garantia de que não fique nenhum resíduo de meio nos frascos de cultivo, o que seria indesejável.

A programação exemplificada para dois temporizadores sincronizados basicamente é a mesma para qualquer utensílio programável, como, por exemplo, o controlador lógico programável (CLP).

Preparo, esterilização e montagem dos pares de frascos no biorreator

O preparo dos frascos do biorreator envolve as seguintes fases:

- a) Primeiramente, as mangueiras, em grupo de dez, que unem os frascos aos pares, são reunidas em um saco plástico de PVC suficientemente grande para permitir que elas não fiquem dobradas no seu interior.
- b) Em seguida, as tampas, já conectadas aos filtros de ar e às mangueiras que vão no interior dos frascos, são reunidas em dois grupos de dez e acondicionadas em outro saco plástico de PVC, tomando o cuidado para que não fiquem dobradas.
- c) Os sacos plásticos são fechados com barbante de algodão cru ou qualquer outro material autoclavável, desde que seja de fácil manuseio.

Dessa forma, para cada prateleira – dez pares de frascos – são utilizados três sacos plásticos, um com as mangueiras de conexão e dois com as tampas, conectadas aos filtros de ar e às mangueiras do interior de cada frasco. Se o protótipo for de 50 pares de frascos – cinco prateleiras de dez pares cada –, deverão ser preparados, de uma só vez, 15 sacos plásticos, sendo dez sacos para as tampas com filtro de ar e cinco sacos para as conexões entre os frascos.

As mangueiras de silicone e os sacos plásticos de PVC suportam autoclavagem por 20 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de uma atmosfera.

Os frascos de cultivo e de meio são esterilizados quimicamente em solução de hipoclorito de sódio a 0,06%. O procedimento de esterilização é basicamente o seguinte:

- a) Um volume de água deionizada, preferencialmente autoclavada, de 200 mL é adicionado a cada frasco de 5 L a ser esterilizado. Em seguida, 1,0 mL de hipoclorito de sódio a 12% é adicionado a cada frasco, o que resulta numa solução de hipoclorito de sódio de 0,06%, a qual é suficiente para esterilizar o frasco.
- b) Em seguida, os frascos são tampados com a tampa que acompanha cada frasco no momento da aquisição, normalmente uma tampa azul.
- c) O frasco é, então, colocado em saco plástico virgem de PVC, com volume suficiente para comportar o frasco de 5 L e ser lacrado. Em seguida, o frasco é agitado por alguns segundos para que a solução de hipoclorito entre em contato com toda a superfície interna do frasco. Para se obter a esterilização do frasco, basta que a solução de hipoclorito apenas molhe a superfície interna do frasco por igual.

- d) Após esse tratamento, os frascos são armazenados até o momento do uso, que pode ser na parte da tarde do mesmo dia ou no dia seguinte. Como o número é grande, os frascos devem ser preparados com antecedência, sem os atropelos de última hora.
- e) Imediatamente antes do uso, a tampa do frasco é afrouxada e o frasco emborcado a fim de que a solução de hipoclorito passe do interior do frasco para o interior do saco plástico. Com isso, a solução de hipoclorito entra em contato com a boca e a tampa do frasco. Quando toda a solução de hipoclorito tiver sido transferida para o saco plástico, o frasco é novamente fechado com a mesma tampa azul, agora totalmente estéril.
- f) A solução fora do frasco, mas dentro do saco plástico, é movimentada de tal forma a banhar o frasco pelo lado de fora, completando a esterilização. É importante ressaltar que o saco plástico precisa estar suficientemente lacrado para não ocorrer extravasamento da solução de hipoclorito para a bancada da capela.
- g) Este último procedimento de esterilização pode ser feito fora ou já dentro da capela de fluxo laminar, imediatamente antes do uso dos frascos.
- h) Após a autoclavagem das mangueiras e tampas e esterilização química dos frascos, é feita a montagem dos pares de frascos, imediatamente antes do uso, sendo conduzida na seguinte ordem:
- Os sacos plásticos que contêm as tampas e as conexões são levados para a capela de fluxo laminar.
 - O saco plástico com os frascos é aberto, e o frasco retirado de dentro do saco plástico é colocado sobre a superfície de trabalho da capela de fluxo laminar, para que seja imediatamente montado.
 - O saco plástico com hipoclorito é descartado.
- i) Não é necessário enxaguar o frasco, uma vez que o volume de resíduo de solução de hipoclorito remanescente no frasco é pequena e a concentração de hipoclorito muito baixa, não sendo tóxica para o material vegetal a ser cultivado.
- j) Cada tampa é retirada do saco plástico em que foi autoclavada, tomando-se o cuidado de não tocar os bicos da tampa, bem como a ponta das mangueiras conectadas a cada tampa.
- k) A mangueira que fica no lado inferior da tampa é inserida em um dos frascos e a tampa respectiva rosqueada, sendo o frasco colocado de lado para preparo do frasco parceiro, de forma semelhante.
- l) Após o preparo de dois frascos, a mangueira que une os frascos é retirada do saco plástico respectivo, tomando-se o cuidado de não tocar com as mãos nas extremidades da mangueira conectada ao bico da tampa de um dos frascos. Em seguida, a outra extremidade da mangueira é conectada ao bico da tampa do outro frasco. Assim, a unidade básica do biorreator está pronta e pode ser retirada da capela

de fluxo laminar e armazenada em carrinho ou prateleira, onde permanece até o momento do uso.

O meio de cultura e todos os materiais necessários são esterilizados em autoclave, com pelo menos um dia de antecedência, para haver tempo suficiente para o resfriamento.

Embora o meio de cultura possa ser esterilizado via ultrafiltração, esse método normalmente não é utilizado. O grande volume de meio utilizado, que pode chegar a 50 L por kit de biorreator, torna o processo de ultrafiltração bastante complicado.

Assim, a autoclavagem é o método preferido para esterilização do meio de cultura. Em relação às mangueiras, filtros e tampas, o tratamento com radiação gama pode ser uma boa alternativa, desde que esteja disponível em local próximo e que o custo compense.

Teste de funcionamento em regime de imersão temporária antes da inoculação de material vegetal

Antes da inoculação de material vegetal, o biorreator deve passar pelo teste de funcionamento. Para isso, é feita a montagem com materiais não esterilizados. Os frascos de meio recebem um volume de água equivalente ao volume de meio a ser utilizado para cultivo. Em seguida, é feito o ajuste da pressão do sistema para 10 psi. Essa pressão poderá ser aumentada ou diminuída, a fim de permitir uma troca de meio entre os frascos no tempo esperado.

Utilizando a opção “manual” de funcionamento do temporizador 19, a válvula solenóide 26 é energizada. Com isso, a válvula se abre, libera ar para o sistema e a pressão sobe nos frascos de meio – 3, 2 e 1 (Figura 18). Então o ciclo de imersão/emersão é iniciado.

Como esperado, o meio de cultura deve ser transferido para o frasco de cultivo segundos antes do final do primeiro minuto. Além disso, a transferência do meio para os frascos de cultivo deve ocorrer de forma simultânea para todos os frascos. Caso a transferência do meio não seja simultânea em todos os frascos, algum problema está ocorrendo em um ou mais pares de frascos.

Para que essa pressão seja suficientemente alta e uniforme nos frascos de meio, é necessário que sejam atendidas as seguintes condições:

- a) A pressão precisa estar ajustada em, pelo menos, 10 psi.
- b) Não deve haver vazamento em nenhum ponto do circuito de ar.
- c) A canalização vertical na lateral da estante precisa ter um diâmetro interno maior que a canalização horizontal das prateleiras, para que a pressão seja distribuída de forma simultânea para todas as prateleiras.
- d) Os filtros de ar devem apresentar resistência uniforme ao fluxo de ar.
- e) O grau de saturação das membranas filtrantes deve estar abaixo de um limite aceitável.
- f) O número de autoclavagens dos filtros deve ser de, no máximo, dez.

Em relação aos filtros, os seguintes cuidados adicionais devem ser tomados:

- a) Verificar, mesmo quando novos, a resistência ao fluxo de ar de cada filtro.
- b) Verificar, durante a vida útil, a resistência do fluxo de ar de cada filtro.
- c) Não misturar filtros novos com usados num mesmo kit de biorreator.
- d) Devem-se utilizar, num determinado kit de biorreator, filtros de ar que apresentem resistência similar ao fluxo de ar, sejam novos ou usados.
- e) Não utilizar filtros que apresentem resistência acima de um determinado valor. Tomar como referência a resistência média dos filtros novos.
- f) Datar cada filtro, para que possa ser utilizado sempre dentro de um mesmo grupo.
- g) É fundamental assinalar o número de autoclavagens de cada grupo de filtro de um mesmo kit.

Com o uso, o filtro de ar pode apresentar aumento na resistência à passagem do ar devido à saturação progressiva da membrana filtrante. Assim, é fundamental avaliar esse aumento na resistência para verificar o grau de saturação dos filtros. No caso de aumento da resistência dos filtros, é fundamental ajustar o funcionamento do equipamento referente às transferências do meio de cultura de um frasco para outro. Se houver necessidade, a pressão de funcionamento deve ser aumentada para que o equipamento funcione adequadamente. Certo aumento de resistência ao fluxo de ar é tolerável desde que o aumento da pressão de funcionamento não seja superior a 15 psi.

Outro problema que pode ocorrer é a saturação desuniforme entre os filtros, o que vai criar pontos de maior ou menor resistência à passagem do ar. Nos frascos conectados aos filtros de ar de menor resistência, a movimentação do meio é mais rápida. Com isso, observa-se que, enquanto o meio de um determinado frasco já foi transferido completamente para o frasco gêmeo, em outros frascos a transferência de meio ainda não foi concluída, o que é indesejável.

Se a resistência ao fluxo de ar for muito alta e, sobretudo, desuniforme, o equipamento não funcionará adequadamente, havendo necessidade de substituição dos filtros.

Se a transferência é uniforme para todos os frascos, mas, ao final de 1 minuto, ela não se completar, pode-se aumentar a pressão para até 15 psi, mantendo a mesma programação de 1 minuto para transferência do meio entre os frascos. Se mesmo assim a transferência de meio não se completar, pode-se aumentar o tempo para 2 minutos.

A avaliação da resistência do fluxo de ar num determinado filtro pode ser feita de diferentes formas. Existem diversos modelos de medidor de vazão de ar no mercado que podem ser utilizados. No laboratório ou na biofábrica, é possível montar um aparato bem simples dispondo dos recursos disponíveis. Basta conectar uma bomba de pressão a um medidor de vazão semelhante ao fluxômetro mostrado na Figura 22 e definir um valor de fluxo, por exemplo, de 10 L/min. Em seguida, conecta-se o filtro usado – ou o novo – na saída do fluxômetro e faz-se a leitura do fluxo de ar. Após a medição do fluxo de filtros novos, faz-se a média das leituras e toma-se esse valor como o valor padrão para aquele grupo de filtros

novos. Em seguida, os filtros usados são avaliados e toma-se como referência o valor de vazão de 80% – em relação à média de vazão dos filtros novos – para serem reaproveitados.

Filtros usados e com um aumento aceitável na resistência podem ser reutilizados, mas com a ressalva de que todos os filtros de um mesmo kit apresentem leituras próximas. Eventualmente, haverá necessidade de ajustar a pressão de funcionamento ou alterar o tempo de troca de meio. A primeira opção – aumento da pressão – é a mais fácil de ser feita, desde que a pressão necessária não ultrapasse 15 psi. Os filtros com leitura abaixo de 80% em relação aos filtros novos devem ser descartados.

Funcionamento do biorreator (modelo Embrapa) sob regime de imersão permanente

Para o funcionamento do biorreator (modelo Embrapa) sob imersão permanente, a disposição das conexões das mangueiras de silicone é mostrada na Figura 33. Nesse caso, a mangueira que conduz o ar do compressor toca o fundo do frasco da direita e a mangueira que une os frascos toca o fundo do frasco da esquerda. É importante notar que a direção do fluxo de ar é apenas num sentido – do frasco da direita para o frasco da esquerda. Em hipótese alguma, o fluxo pode ser invertido, a não ser que a posição das mangueiras seja alterada.

Fotos: João Batista Teixeira



Figura 33. Disposição das mangueiras nos frascos para funcionamento do biorreator sob imersão permanente (A) e detalhe da conexão das mangueiras (B).



Para que o biorreator funcione sob imersão permanente com borbulhamento contínuo, basta que a válvula solenoide 26 esteja aberta o tempo todo, ou seja, o temporizador 19 deve estar ligado e as válvulas solenoides 13 e 15 devem ser do tipo normalmente fechadas e as válvulas 14 e 16 normalmente abertas.

Para que o biorreator funcione com imersão permanente e borbulhamento temporário, a programação do temporizador 19 deve ligar e desligar a válvula solenoide 26, no tempo desejado, por exemplo, a cada hora. O tempo de borbulhamento deve ser de 10 minutos, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Programação de horário do temporizador 19 para acionamento da válvula solenoide 26 (normalmente fechada) e válvulas solenoides 13 e 15 (normalmente fechadas) e 14 e 16 (normalmente abertas), com tempo de borbulhamento de 10 minutos em cada hora, cultivo em ambos os frascos e direção do fluxo de ar do frasco da direita para o frasco da esquerda (Figura 18). O temporizador 19 deve permitir, pelo menos, 48 programas e o temporizador 20 deve ficar desligado o tempo todo.

Temporizador 19					
Liga	Desliga	Liga	Desliga	Liga	Desliga
0h	0h10	8h	8h10	16h	16h10
1h	1h10	9h	9h10	17h	17h10
2h	2h10	10h	10h10	18h	18h10
3h	3h10	11h	11h10	19h	19h10
4h	4h10	12h	12h10	20h	20h10
5h	5h10	13h	13h10	21h	21h10
6h	6h10	14h	14h10	22h	22h10
7h	7h10	15h	15h10	23h	23h10

Em ambos os casos, as válvulas solenoides 13, 14, 15 e 16 ficam o tempo todo desligadas. É importante ressaltar que o temporizador deve ter a capacidade para, pelo menos, 48 programas, para a programação mostrada na Tabela 3.

Fatores físicos e químicos que afetam o crescimento do explante em biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa)

O monitoramento físico-químico dos ambientes interno e externo do frasco de biorreator é necessário para que se obtenham plantas saudáveis, com alta qualidade, que resultem em aclimatização bem-sucedida, em condições de casa de vegetação ou telado. Os principais fatores físico-químicos serão discutidos a seguir: temperatura, iluminação, qualidade e intensidade luminosa, fotoperíodo, aeração e homogeneização do meio, tempo de imersão, volume do frasco de cultivo, densidade de inóculo, meio de cultura e nutrição dos explantes.

Temperatura

A faixa ótima de temperatura de cultivo em biorreator é a mesma utilizada no cultivo tradicional – de 24 °C a 28 °C. Para algumas espécies de clima quente, como a cana-de-açúcar, uma faixa de temperatura de 28 °C a 32 °C pode ser melhor. É oportuno lembrar que, em temperaturas mais altas, o crescimento de contaminantes, como bactérias e fungos, também é maior. Além do mais, o borbulhamento pode resultar em perda maior de meio por evaporação durante os ciclos de imersão.

Já, na fase de estabelecimento, o cultivo numa temperatura mais elevada pode ser interessante para estimular o crescimento de eventuais contaminantes e, assim, permitir o descarte mais rápido dos explantes contaminados, desde que essa temperatura mais alta não afete o crescimento do material vegetal. Entretanto, a fase de estabelecimento é conduzida normalmente em frascos convencionais para só então serem transferidos para o biorreator.

Iluminação

A iluminação, mesmo em sistema heterotrófico ou mixotrófico, é fundamental para permitir o bom desenvolvimento das gemas, tanto na fase de estabelecimento quanto nas fases de multibrotação, alongamento e enraizamento.

As lâmpadas mais utilizadas são as fluorescentes, tipo luz do dia, tubulares, de 20 W ou 40 W. Entretanto, o uso desse tipo de lâmpada apresenta uma série de problemas, tais como: aquecimento, da própria lâmpada e principalmente do reator, tempo de vida relativamente curto e contaminação ambiental após o descarte. Nos últimos anos, uma nova alternativa de iluminação – as do tipo LED (*light emission diode*) – surgiu e vem substituindo, com vantagens, as lâmpadas fluorescentes. Esse tipo de lâmpada – na verdade, existem muitas variações de lâmpadas de LED – apresenta uma série de vantagens em relação às antigas lâmpadas fluorescentes. Apresentam menor aquecimento – não utilizam reatores –, têm maior tempo de vida útil, apresentam espectro de emissão de luz constante e consomem menos energia elétrica. Uma gama de modelos já está disponível no mercado para atender aos mais diferentes fins. Atualmente, a grande desvantagem dessas lâmpadas é o alto custo de aquisição, que ainda é algumas vezes maior que o das lâmpadas fluorescentes. Entretanto, com a popularização no uso das lâmpadas de LED, seu custo deverá reduzir significativamente nos próximos anos.

Qualidade, intensidade luminosa e fotoperíodo

O espectro luminoso refere-se à combinação de cores da fonte de luz a ser utilizada. A qualidade do espectro é um fator importante não apenas para a fotossíntese, mas também para o bom desenvolvimento da planta. A fotossíntese requer um espectro com pico na faixa do azul e pico no vermelho, que corresponde ao espectro de absorção das clorofilas a e b. Já o funcionamento dos fitocromos requer comprimentos de onda de luz vermelha – 660 nm – e vermelha distante – 730 nm. O sistema de fitocromos controla uma série de mecanismos na planta, tais como: germinação de sementes, indução de florescimento, desenvolvimento

do cloroplasto, senescência foliar, abscisão foliar, gancho plumular, expansão foliar e alongamento caulinar.

Visando avaliar a aplicação de luz de LED no cultivo *in vitro*, vários autores testaram diferentes comprimentos de onda, ou seja, as diferentes cores das lâmpadas de LED sobre as diferentes fases de crescimento do explante, como estabelecimento, multiplicação de gemas, alongamento e enraizamento e até mesmo aclimatização (Bula et al., 1991; Miyashita et al., 1995; Takana et al., 1998; Hann et al., 2000; Nhut et al., 2003).

Assim, a presença de luz com diferentes cores é fundamental para que a planta tenha crescimento e desenvolvimento normais *in vitro*, mesmo que o cultivo esteja sendo feito na presença de sacarose ou outro açúcar qualquer, isto é, numa condição mixotrófica, quando a energia para crescimento e desenvolvimento do explante vem do açúcar e também, em maior ou menor grau, da fotossíntese.

Para haver alta taxa fotossintética, é necessária alta intensidade de luz, além evidentemente da presença de CO₂. Entretanto, tem sido observado *in vitro* que uma certa taxa fotossintética ocorre mesmo em intensidade de luz mais baixa, justificando o uso do termo "mixotrofia" para esses casos. Para o cultivo mixotrófico, a intensidade luminosa deve estar acima de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Já para o cultivo autotrófico – quando toda a energia para crescimento provém da fotossíntese –, a intensidade luminosa deve ser superior a 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. (Nguyen; Kozai, 2001; Zhang et al., 2009; Xiao et al., 2011).

Atualmente, há poucas informações sobre o uso rotineiro de biorreator foto autotrófico, ou seja, aqueles modelos nos quais é possível cultivar plantas sob condições autotróficas, sob iluminação suficientemente elevada, que permita o funcionamento normal do aparelho fotossintético e o alcance de altas taxas de fotossíntese e crescimento. Entretanto, com o aparecimento das lâmpadas de LED de alta intensidade e adequada qualidade de espectro, o cultivo em biorreator no sistema autotrófico deverá se tornar cada vez mais frequente.

O fotoperíodo é um importante fator relacionado ao regime de luz da sala de cultura. Ele pode interferir significativamente no crescimento e na resposta *in vitro*. Existem basicamente três tipos de plantas em relação à resposta ao fotoperíodo: espécies de dias longos, espécies de dias curtos e espécies indiferentes ou neutras. As plantas de dias longos são aquelas que florescem quando o comprimento do dia é igual ou maior que o valor crítico. Em termos mais precisos, são aquelas espécies que florescem quando o período de escuro contínuo é menor que o período crítico. São exemplos de plantas de dias longos a alface e o trigo. Já as plantas de dias curtos florescem quando o comprimento do dia é menor que o comprimento crítico, ou seja, o comprimento do período de escuro contínuo é maior que o valor crítico. São exemplos de espécies de dias curtos a soja e o morango.

Por sua vez, as plantas indiferentes são aquelas que vegetam e florescem em qualquer época do ano e dependem de outros fatores para a indução do florescimento. São exemplos de plantas indiferentes a banana e o abacaxi. Assim, é importante considerar essas características da espécie para alcançar os melhores resultados no cultivo *in vitro*. Por exemplo, para plantas de dias curtos, como a soja, o cultivo deve ser feito em dias longos – 12 a 16 horas por dia. Já, para o caso das plantas de dias longos como a alface, o cultivo deve ser feito em dias curtos – 12 ou menos horas por dia. Com isso, se inibe a indução de florescimento, que prejudicaria o crescimento do explante *in vitro*, sendo, portanto, indesejável.

A indução do florescimento *in vitro* é influenciado por outros fatores além do comprimento do dia, como, por exemplo, teor de sacarose e combinação hormonal do meio de cultura (Dickens; Staden, 1988; Tee et al., 2008).

Aeração e homogeneização do meio

As plantas requerem oxigênio para o seu crescimento e desenvolvimento. No caso de culturas em biorreatores, a difusão natural do oxigênio é conduzida pela agitação ou pelo arejamento forçado do meio de cultura. Em biorreator de imersão temporária, a troca gasosa é conduzida nos frascos durante os ciclos de imersão/emersão. Assim, após cada ciclo de imersão/emersão, o equilíbrio gasoso no interior dos frascos é restabelecido e fica aproximadamente igual ao do ar atmosférico.

A renovação do ar, feita ao longo do dia, permite também a atualização da concentração de CO₂ no interior dos frascos, o que é essencial para estimular o processo fotossintético, sobretudo se a superfície verde dos explantes for considerável e a intensidade luminosa suficientemente alta. Mesmo na presença de açúcar, é importante estimular a fotossíntese, já que isso pode contribuir para a formação de uma planta mais vigorosa, melhor enraizamento, melhor desenvolvimento do aparelho fotossintético, incluindo os estômatos, e maior percentagem de sobrevivência durante a fase de aclimatização.

O enriquecimento da atmosfera dos frascos com CO₂ só deve ser feito em cultivo autotrófico, na presença de alta intensidade luminosa – acima de 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Para elevar o nível de CO₂, é necessário dispor de uma fonte de CO₂. O uso de um cilindro de ar artificial com a concentração de CO₂ ajustada para o valor desejado – por exemplo, 1.000 ppm ou 1.200 ppm – é uma das formas de fazer isso, desde que o equipamento seja adaptado para permitir a sua injeção automática no interior dos frascos na quantidade desejada. Outra possibilidade é conectar um cilindro de CO₂ puro ao sistema. Entretanto, isso exige a instalação de um mecanismo preciso para injeção de gás em cada frasco, o que vai encarecer desnecessariamente o sistema, já que a demanda por frasco e por ciclo de imersão é pequena, da ordem de 5 mL de CO₂ puro por frasco de 5 L, para atingir a concentração de 1.200 ppm de CO₂.

Alternativamente, é possível optar pelo ajuste da concentração de CO₂ de toda a sala de cultivo para valores entre 1.000 ppm e 1.200 ppm. Por exemplo, para uma sala de 4 m x 3 m x 8 m (96 m³), para se elevar a concentração de CO₂ de 400 ppm para 1.000 ppm, são necessários em torno de 57,6 L de CO₂ puro, o que é um volume relativamente pequeno, considerando que o consumo de CO₂ é pequeno e a reposição com baixa frequência. Para manter a concentração de CO₂ na sala de cultivo, basta instalar um mecanismo automático de monitoramento da concentração de CO₂ e reposição automática do CO₂ consumido e difundido para fora da sala.

Tempo e frequência de imersão

Em cultivo sob imersão temporária, o tempo de imersão deve ser determinado de tal forma a permitir boa absorção de nutrientes pelo explante. No entanto, ao mesmo tempo, deve prevenir o aparecimento de qualquer problema, como, por exemplo, hiper-hidricidade

e/ou oxidação fenólica. O tempo de imersão varia consideravelmente para diferentes espécies e para diferentes tipos de explantes. Segundo Etienne et al. (1997), tempos de imersão curtos (1 minuto a cada 12 horas) estimularam a produção de embriões somáticos em café e seringueira. Já Berthouly et al. (1995) mostraram que o tempo de imersão para microestacas de café afetou substancialmente a taxa de multiplicação, como estimado pelo número de nós produzidos, após 6 semanas de cultivo. Tempos de imersão de 1,5 e 15 minutos aplicados a cada 6 horas resultavam em taxas de multiplicação de 3,5; 5,4 e 8,4, respectivamente. Em adição, o tempo ótimo de imersão variava dependendo da espécie de café. Para *Coffea arabica*, era de 15 minutos a cada 6 horas; para microestaca de *Coffea canephora*, apenas 1 minuto a cada 6 horas.

Já para micropropagação de brotos de abacaxi, o tempo de imersão utilizado foi de 2 minutos a cada 3 horas (Escalona et al., 1999); e, para cana-de-açúcar, de 2 minutos a cada 9 horas (Lorenzo et al., 1998). Em ambos os casos, não foi observado o aparecimento de brotos hiper-hídricos.

Segundo Etienne e Berthouly (2002), pelo menos para café, para prevenir o aparecimento de hiper-hidricidade o tempo de imersão é mais importante que a frequência de imersão. Se o tempo de imersão for de 1 minuto, uma alta frequência de imersão não resulta no aparecimento de hiper-hidricidade. Os mesmos autores afirmam que o tempo de imersão e a frequência de imersão são os principais parâmetros a serem considerados para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação por meio de biorreatores de imersão temporária.

Volume do frasco de cultivo

O volume do recipiente a ser utilizado no biorreator tem grande importância, pelo menos no que se refere a alguns aspectos, como, por exemplo, o volume máximo de meio que pode ser utilizado e o espaço livre para o crescimento das mudas. O espaço livre nada mais é do que o volume de ar do frasco de cultivo, após a adição do meio de cultura e dos explantes (*headspace*). Além do mais, o volume total do frasco é importante para haver espaço suficiente para crescimento, evitando a compactação e o estiolamento das mudas. Essa compactação pode levar à inibição do crescimento e resultar em grande número de mudas pequenas e frágeis, que podem não sobreviver à fase de aclimatização. O volume de ar do *headspace* pode ter influência na quantidade de oxigênio disponível para um bom crescimento, além de fornecer espaço suficiente para o crescimento das mudas. Krueger et al. (1991) demonstraram que recipientes maiores (7 L) tiveram efeito positivo na eficiência de micropropagação de *serviceberry* (*Amelanchier x grandiflora* Rehd.), notadamente por evitar a compactação das mudas e estimular o alongamento.

Densidade de inóculo

De modo geral, para a produção de uma quantidade grande de mudas em biorreator, grande quantidade de explantes deve ser preparada como inóculo inicial. Os propágulos mais adequados são as multigemas, os multibrotos, os protocormos, os calos embriogênicos e os embriões somáticos, além de hastes com várias gemas axilares cada.

Em geral, para qualquer tipo de explante a ser cultivado *in vitro*, há sempre uma relação ótima entre a quantidade de material e o volume de meio utilizado, o que normalmente é chamado de densidade de inóculo (Pérez-Alonso et al., 2007). Como em biorreatores são utilizados frascos grandes de 5 L ou mesmo 10 L, a quantidade de explantes por frasco é sempre alta, já que o volume de meio pode chegar a 1 L ou, em casos especiais, a 2 L, diferentemente do que ocorre no processo convencional, com frascos pequenos, em que o volume de meio raramente ultrapassa 50 mL. Assim, a quantidade de material a ser cultivado por frasco é sempre alta e deve-se manter a densidade de inóculo em valores adequados. Lorenzo et al. (1998) determinaram que, em sistema de biorreator de imersão temporária, o volume ótimo de meio por explante de cana-de-açúcar era de 50 mL. Para 5 mL de meio por explante, encontraram uma taxa de multiplicação de 8,3. Já para 50 mL de meio por explante, a taxa de multiplicação foi de 23,9, para um período de 30 dias de cultivo. De forma semelhante, Escalona et al. (1999) determinaram que o volume ótimo para cultivo de brotos de abacaxi era de 200 mL por explante. Entretanto, volumes maiores por broto resultavam numa redução da taxa de multiplicação.

A maneira mais adequada para se determinar a densidade de inóculo ótima é pelo teste de diferentes pesos de explantes para determinado volume de meio. Deve-se evitar conduzir os testes de densidade utilizando o número de explantes por volume de meio, já que a quantidade de material vegetal varia de acordo com o tipo de explantes e com a espécie. Um broto de cana-de-açúcar difere em peso de um broto de abacaxi, diferindo de um broto de banana, e assim por diante.

Entretanto, é importante considerar que não é possível, pelo menos operacionalmente, determinar um valor de densidade de cultivo ótimo para todo o período de cultivo, dado que a densidade aumenta com o cultivo, numa curva semelhante à curva de crescimento sigmoide, observada para o crescimento de qualquer organismo vivo. Assim, o que se determina é a densidade inicial para um determinado período de cultivo.

Se houver variação do período de cultivo, a densidade inicial deverá ser ajustada. Pode-se tomar, como regra geral, que a densidade de inóculo inicial pode ser um pouco menor para períodos longos, e o contrário para períodos mais curtos. Isso parece um contrassenso, mas pode-se explicar da seguinte forma: para períodos de cultivo mais curtos, é importante utilizar maior quantidade inicial de explantes para estimular o crescimento inicial. Como o período de cultivo é mais curto, o meio de cultura será renovado mais frequentemente, não havendo tempo para se exaurir algum nutriente ou acumular alguma substância prejudicial ao crescimento. O contrário acontece para períodos mais longos. Entretanto, é importante ponderar que densidades de cultivo muito altas e muito baixas no início podem inibir o crescimento do explante, inviabilizando o estabelecimento da cultura.

No início do cultivo em biorreator, já na fase de alongamento, a quantidade de inóculo deve ser aquela que irá produzir o número esperado de mudas por frasco, por exemplo, para abacaxi e banana, algo entre 100 e 200 mudas. Assim, a quantidade de material inicial é a que vai resultar em 100 a 200 mudas. O que irá variar será a quantidade de meio inicial, além da frequência de renovação do meio. Tomando como base a determinação do volume por

explante feita por Escalona et al. (1999), que foi de 200 mL, e considerando que, em 200 mL, sejam produzidas de 20 a 40 mudas (100 a 200 mudas por 1.000 mL), o volume por muda corresponde a 10 mL ou 5 mL, o que, grosso modo, está de acordo com a relação broto por volume de meio comumente utilizado. Como os explantes de abacaxi demoram de 45 a 60 dias em biorreator para serem levados para a fase de aclimatização, podem-se fazer duas renovações do meio, em 20 e 40 dias, utilizando 500 mL de meio no primeiro período de cultivo e 1.000 mL no segundo período. Com isso, há economia de meio na primeira fase, ao mesmo tempo em que se estimula o crescimento, com maior densidade de inóculo no início do cultivo. Qualquer outra combinação precisa ser obtida por testes experimentais.

Meio de cultura e nutrição dos explantes

O meio de cultura utilizado em biorreator é basicamente o mesmo utilizado para o cultivo em frascos convencionais. Entretanto, algumas considerações podem ser feitas. A nutrição em meio líquido em frascos de biorreator é feita a partir do contato do meio com toda a superfície do explante. Já no processo convencional, principalmente quando se utiliza meio gelificado, a nutrição do explante se restringe à base do explante, isto é, no ponto de contato deste com o meio de cultura. Com isso, no cultivo em biorreator, a absorção dos nutrientes é maior e mais rápida, o que eventualmente justifica a realização de testes para verificar a necessidade de ajustes, principalmente na composição dos sais do meio básico, normalmente o MS (Murashige; Skoog, 1962). O meio de MS é considerado um meio salino muito concentrado, pelo menos em relação a alguns nutrientes, como nitrogênio e potássio, e menos concentrado em outros, como o fósforo. Dessa forma, os ajustes devem levar em consideração inicialmente os teores desses nutrientes. Entretanto, alterar a formulação salina de determinado meio não é trivial, e os testes devem ser conduzidos com muito critério; do contrário, será uma perda de tempo e esforço, com resultados na maioria das vezes inconsistentes. Antes de qualquer alteração na composição do meio de cultura, os testes devem primeiramente levar em consideração o ajuste do tempo e da frequência dos ciclos de imersão/emersão.

A sacarose e, em menor extensão, a glucose e a frutose são os carboidratos mais utilizados *in vitro*. Em geral, quando a sacarose é fonte única de açúcar, observa-se rápida hidrólise – 6 a 7 dias. A glucose e a frutose são consumidas progressivamente nas 2 a 3 semanas seguintes. Após 4 semanas de cultivo, apenas uma fração da glucose e frutose estará presente no meio de cultura (Gontier et al., 2005). Assim, raramente, a renovação do meio deve passar de um mês.

Eventualmente, ajustes devem ser feitos na concentração de reguladores de crescimento, já que, em cultivo em meio líquido, a absorção e o efeito dessas substâncias sobre o explantes podem ser maiores em comparação com o cultivo em meio gelificado.

Durante o preparo dos meios, alguns cuidados devem ser tomados em relação às soluções de estoque, as quais devem ser expostas à luz pelo tempo estritamente necessário. A luz, invariavelmente, altera os componentes do meio, e umas substâncias são mais

sensíveis do que outras. Da mesma forma, como durante o cultivo o meio fica exposto à luz durante o fotoperíodo (12 a 16 horas), é importante proteger os frascos de meio contra a luz, envolvendo-os com uma película opaca. Não há referência na literatura sobre esse cuidado com o meio de cultura, mas vale a pena ser testado, já que o resultado pode ser significativo. Apenas num cálculo rápido, o tempo exposto à luz para um fotoperíodo de 12 horas é de 720 minutos diários. Caso o frasco de meio esteja protegido, para uma programação de 2 minutos para os ciclos de imersão a cada 2 horas, a exposição total diária será de 24 minutos, ou seja, 3,3% do período total de exposição à luz. Como, em geral, o intervalo entre as imersões é maior que 2 horas, o tempo de exposição à luz será ainda menor. Se o intervalo entre as imersões for de 12 horas, o tempo de exposição do meio de cultura à luz será apenas de 0,56%, caso os frascos de meio estejam protegidos da luz.

Para manter o alto grau de qualidade, o meio de cultura deve ser renovado com a devida frequência, que normalmente varia de 15 a 30 dias, dependendo principalmente da espécie em cultivo. Para espécies de crescimento mais rápido, como a cana-de-açúcar, a renovação do meio deve ser feita a cada 2 semanas. Já para espécies de crescimento mais lento, como a banana e abacaxi, a renovação pode ser feita a cada 3 ou mesmo 4 semanas.

A renovação do meio de cultura deve ser realizada não apenas pela deterioração na presença de luz, mas principalmente porque, durante o cultivo, os nutrientes são absorvidos, atingindo níveis limitantes para o crescimento dos explantes. Além do mais, pode haver acúmulo de substâncias indesejáveis, como os polifenóis oxidados.

Durante os ciclos de imersão, o meio de cultura é borbulhado por maior ou menor período de tempo, dependendo do ajuste do equipamento, sobretudo no que se refere à pressão de funcionamento. Considerando que o oxigênio, que é transferido para o meio de cultura nesse processo, pode alterar o meio de cultura, uma medida para manter a qualidade do meio é a adição de substâncias antioxidantes, como ácido ascórbico, cisteína e glutatiônica, bem como substâncias adsorventes, como o PVP-40 (polivinilpirrolidona) e o PVPP-40 (polivinilpolipirrolidona). O PVP-40 e o PVPP-40 podem ser adicionados separadamente ou em conjunto com os antioxidantes. A adição de PVP-40 e PVPP-40, além de proteger o meio de cultura da ação oxidativa do oxigênio, previne qualquer efeito prejudicial da presença de fenóis oxidados.

O pH inicial de 5,7–5,8 varia durante o cultivo, à medida que os nutrientes vão sendo absorvidos e substâncias orgânicas vão sendo excretadas pelo explante, a despeito de uma certa capacidade tamponante do próprio meio. Inicialmente, o pH tende a cair, principalmente como resultado da absorção preferencial de íons NH_4^+ e da respectiva exsudação de prótons (H^+). Numa segunda fase, o pH volta a subir pela absorção de NO_3^- , devido à exsudação de íons OH^- (Hvoslef-Eide et al., 2005). É oportuno lembrar que a absorção de outros íons também contribui para a variação do pH do meio. O pH pode igualmente variar devido a outros fatores, como o acúmulo de CO_2 no interior do frasco de cultivo (Skirvin et al., 1986). Entretanto, a variação do pH parece não afetar significativamente o crescimento e o desenvolvimento do explante, já que raramente são adicionadas ao meio substâncias tamponantes como forma de impedir essa variação.

Aplicações do biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa)

O biorreator de imersão temporária pode ser empregado em vários tipos de cultivo in vitro. A seguir, alguns desses tipos serão discutidos.

Cultivo de gemas e diferentes propágulos para fins de micropropagação

O biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa) foi desenvolvido, primeiramente, para o cultivo de explantes vegetais, sobretudo gemas e embriões somáticos, visando à micropropagação, ou seja, produção de mudas clonais de alta qualidade, tanto do ponto de vista de sanidade quanto fisiológico.

De acordo com Murashige (1974), a micropropagação envolve, em termos gerais, as seguintes etapas:

- a) Fase de estabelecimento do material in vitro.
- b) Fase de multiplicação ou multibrotação das gemas em cultivo.
- c) Fase de preparo para transferência das mudas para condições ex vitro.

Esta última fase compreende alongamento ou crescimento das gemas, enraizamento e aclimatização (Teixeira, 2006).

Na fase de estabelecimento, diferentes tipos de explantes são utilizados, tais como ápices caulinares, segmentos nodais e segmentos de folhas. Em ambiente de ventilação de ar estéril, os explantes passam por um processo criterioso de desinfestação, antes de serem inoculados em frascos com meio de cultura devidamente esterilizado. O meio de estabelecimento contém os nutrientes minerais e orgânicos, além de substâncias reguladoras de crescimento, os quais são necessários ao crescimento e ao desenvolvimento do material em cultivo. Os frascos com o material vegetal são mantidos em salas de crescimento, sob condições adequadas de temperatura, luminosidade e fotoperíodo. O cultivo requer observações cuidadosas, de tempos em tempos, para selecionar o material sadio, separando-o do material morto ou contaminado. A fase de estabelecimento tem duração de algumas semanas a alguns meses, em razão de vários fatores, entre os quais a espécie que está sendo utilizada, o meio de cultura e as condições de cultivo. Além do mais, o tipo e o tamanho do explante têm influência. Explantes muito pequenos (menos de 1 mm) apresentam crescimento inicial mais lento. Já os explantes grandes (0,5 cm ou mais) podem apresentar maior incidência de contaminação e de oxidação fenólica.

A segunda fase de cultivo é aquela denominada multiplicação ou multibrotação. Durante essa fase, os explantes são cultivados em um novo meio de cultura, que estimula a formação de multigemas ou multibrotos. Multigemas são brotos muito pequenos, que formam agregados de difícil separação. Já os multibrotos são pequenas touceiras de pe-

quenos brotos, que podem ser separados entre si com o auxílio de pinça e bisturi. A formação tanto de multigemas como de multibrotos é obtida pela dosagem de reguladores de crescimento, principalmente citocininas, no meio de cultura. Essa fase normalmente é mais longa do que a fase de estabelecimento, dado que o material deve passar por vários ciclos de multiplicação. Cada ciclo de multiplicação deve durar cerca de 1 mês para a maioria das espécies. Já o número de ciclos de multiplicação depende de cada espécie. Por exemplo, para abacaxi e banana, deve estar em torno de cinco, de tal modo a resultar, para cada gema inicial inoculada, algo entre 300 e 500 mudas ao final do processo. Durante as renovações de meio, normalmente se faz a divisão das multigemas em duas ou mais partes, dependendo do seu tamanho. Para frasco pequeno – de 100 mL a 250 mL – com 20 mL a 50 mL de meio, respectivamente, o cultivo pode ser feito em grupos de até cinco segmentos por frasco, desde que não haja risco de contaminação microbiana cruzada. É importante frisar que todos os explantes em cultivo devem estar livres de contaminantes.

Na terceira fase de cultivo, os explantes (multigemas ou multibrotos) são transferidos para meio com baixo teor ou desprovidos de reguladores de crescimento, a fim de estimular o alongamento das gemas e, simultaneamente, reduzir a formação de novos brotos. No início dessa fase, não se observa um alongamento expressivo devido à presença residual de reguladores de crescimento provenientes da fase anterior. Assim, muitas vezes, é necessário fazer o cultivo nesse meio por alguns meses, para se obter o alongamento desejado. A indução de enraizamento é conduzida em meio de cultura enriquecido com, pelo menos, uma auxina – ácido indolacético ou ácido indolbutírico. Dependendo da espécie, pode ser que não haja necessidade de adição de auxina para se obter o enraizamento desejado, já que o próprio processo de alongamento pode estimular o enraizamento devido à síntese de ácido indolacético pela parte apical da planta, principalmente pelas folhas novas. Da mesma forma, se o meio de multiplicação ou multibrotação contiver auxina – como é o caso do meio para multibrotação de abacaxi –, o enraizamento ocorrerá no meio de alongamento, sem a necessidade de adição de auxina para induzir o enraizamento (Teixeira et al., 2001).

Durante o período de aclimatização, as plantas enraizadas são transferidas para ambiente *ex vitro* para fins de adaptação ao ambiente natural em casa de vegetação ou telado. Esse momento requer inicialmente condições ambientais adequadas, como: temperatura amena (mínima em torno de 20 °C, durante a noite, e máxima por volta de 28 °C, durante o dia), alta umidade relativa do ar (80% a 90%) e baixa luminosidade (30% a 40% da luz solar direta). É fundamental usar substrato de boa qualidade que contenha todos os nutrientes minerais em concentrações adequadas para cada cultura. Para completar o processo de aclimatização, antes de serem levadas para o campo, as plantas são transferidas para um ambiente com maior intensidade (60% a 70%) solar direta, fase essa chamada de rustificação.

O cultivo em biorreator é conduzido normalmente na fase final de alongamento e enraizamento. A fase de estabelecimento normalmente é conduzida em frascos pequenos, já que os explantes precisam ser cultivados de forma individualizada para seleção exaustiva e descarte dos explantes mortos e contaminados. Da mesma forma, as primeiras etapas da fase de multiplicação ou multibrotação podem ser conduzidas em frascos pequenos, já que o número de frascos iniciais ainda é baixo. Além do mais, o material em cultivo deve passar por várias rodadas de seleção dos melhores explantes e livres de contaminação. Eventualmente, a última fase de multibrotação pode ser conduzida já em frascos de biorreator.

A condução da fase de alongamento e enraizamento deve ser feita em biorreator, devido a alguns motivos, tais como:

- a) O número de mudas aumenta significativamente.
- b) O volume do material cultivado aumenta na mesma proporção.
- c) Num único frasco de biorreator, centenas de mudas podem ser cultivadas, dispondo de um espaço razoável para o crescimento.
- d) Há um aumento considerável da superfície verde, o que permite estabelecer um sistema de cultivo autotrófico ou mixotrófico.
- e) Em cultivo em biorreator, é mais fácil introduzir um sistema de enriquecimento de CO₂ para estimular a taxa fotossintética das mudas.
- f) Com menor manipulação das culturas e considerável redução no número de frascos, a chance de misturas varietais é menor.
- g) O envolvimento de mão de obra é muito menor, reduzindo significativamente os custos de produção.

Cultivo de células

O cultivo de células e calos é conduzido, preferencialmente, sob imersão permanente. Como o biorreator desenvolvido pela Embrapa permite o cultivo tanto sob imersão temporária quanto permanente, é possível fazer o cultivo de células, desde que a montagem das mangueiras nos frascos e a programação de funcionamento dos temporizadores sejam devidamente ajustados. Nesse caso, o cultivo é conduzido em todos os frascos e o bombeamento do ar é unidirecional, resultando no borbulhamento do par de frascos ao mesmo tempo.

Para melhorar o borbulhamento, um borbulhador de vidro sinterizado é conectado à extremidade das mangueiras, no interior dos frascos. Caso o borbulhamento permanente seja excessivo, é possível optar pelo borbulhamento temporário. Nesse caso, o borbulhamento é feito por um tempo determinado, por exemplo, 10 minutos, seguido de um período de descanso, por exemplo, de 1 hora; ou qualquer outra combinação que seja a mais adequada ao cultivo.

Durante o cultivo, as células tendem a excretar substâncias orgânicas das mais diversas, resultando em aumento na viscosidade do meio de cultura e, quase sempre, em formação de espuma durante o borbulhamento, sobretudo em borbulhamento permanente. Eventualmente, dependendo do tipo de meio, do tempo de cultivo e do tipo de células, é necessário adicionar substâncias antiespumantes ao meio de cultura, tais como polipropilenoglicol ou Pluronic PE 6100 (Wongsamuth; Doran, 1994). Testes cuidadosos devem ser conduzidos para encontrar a melhor concentração que reduza a formação de espuma e, ao mesmo tempo, não seja tóxico ao material em cultivo.

Cultivo de embriões somáticos

O cultivo de embriões somáticos pode ser conduzido com alta eficiência em biorreator, sobretudo na fase de germinação e regeneração de plantas. No caso de cultivo de embriões somáticos de café, por exemplo, é possível obter centenas de plântulas por frasco de cultivo (Ducos et al., 2007; Teixeira, 2017).

A germinação de embriões somáticos em frascos de biorreator de imersão temporária dá origem a plântulas com algumas características que favorecem a aclimatização, tais como:

- a) Germinação mais uniforme.
- b) Mudanças mais vigorosas.
- c) Melhor desenvolvimento da camada epicuticular das folhas.
- d) Melhor desenvolvimento do aparelho estomático.
- e) Melhor desenvolvimento do aparelho fotossintético.
- f) Mudanças com maior controle de perda de água por transpiração durante a fase de aclimatização.
- g) Maior percentagem de sobrevivência das mudas durante a fase de aclimatização.
- h) Maior taxa de crescimento no início da fase de aclimatização.

Germinação de sementes

A germinação de sementes pode ser conduzida em biorreator de imersão temporária, com algumas vantagens em relação à germinação de forma convencional em laboratório. Durante a germinação em biorreator, é possível utilizar diferentes tratamentos visando, por exemplo, à quebra de dormência. Para além disso, é possível estimular o crescimento pela adição de reguladores de crescimento, sacarose, vitaminas e outras substâncias. Da mesma forma, outros fatores, tais como qualidade e intensidade de luz, fotoperíodo e diferentes temperaturas, podem ser avaliados com maior precisão.

Cultivo de raiz

Embora, o cultivo de raiz *in vitro* venha sendo feito desde a década de 1920 (Bobbins, 1922) e 1930 (White, 1938), essa técnica não se desenvolveu da forma esperada, e o número de espécies cujas raízes podem ser cultivadas *in vitro* ainda não é muito grande.

A partir das décadas de 1980 e 1990, o cultivo de raiz pode ser ampliada para um maior número de espécies, visando à produção de metabólitos secundários (Bensaddek et al., 2008), principalmente após o desenvolvimento da metodologia de transformação genética por *Agrobacterium rhizogenes*. Com essa técnica, foi possível obter segmentos de

raiz com grande capacidade de proliferação, devido à capacidade de produzir os hormônios necessários para o seu crescimento e desenvolvimento (Tepfer, 1990).

Entretanto, segundo Khan et al. (2018), o cultivo de raiz vem sendo feito ainda em pequena escala. O cultivo em larga escala vai depender do desenvolvimento de novos biorreatores ou da eventual adaptação de modelos atualmente disponíveis.

O biorreator desenvolvido pela Embrapa, embora não tenha sido desenvolvido para o cultivo de raiz, apresenta algumas características de construção e funcionamento que possibilitam a sua adaptação para o cultivo de raiz em pequena ou, até mesmo, em média, senão em larga escala, principalmente para raízes transformadas com *A. rhizogenes*.

O cultivo pode ser feito sob regime de imersão temporária ou permanente; neste último caso, com borbulhamento temporário ou contínuo. Em ambos os casos, a intensidade, o tempo e a frequência de borbulhamento são os principais fatores a serem considerados. Outro fator igualmente importante é a densidade inicial de cultivo. Densidades muito baixas inibem o crescimento inicial, resultando em *lag phase* muito longa. Densidades muito altas, ao contrário, estimulam o crescimento inicial, mas encurtam o período de cultivo, requerendo a renovação do meio de cultura num menor tempo.

Cultivo de bactérias e fungos

Para o cultivo de bactérias e fungos, há uma gama de equipamentos disponíveis no mercado, dos mais diferentes tamanhos, características e preços. Contudo, é possível adaptar o biorreator (modelo Embrapa) para o cultivo de bactérias e fungos de forma semelhante ao que foi descrito para células vegetais. O processo é conduzido sob imersão permanente, com borbulhamento contínuo ou, eventualmente, borbulhamento temporário. Normalmente, o cultivo de bactérias e fungos demanda alta oxigenação do meio. Assim, cuidados redobrados devem ser tomados no intuito de satisfazer essa demanda pelos microrganismos, mas, ao mesmo tempo, evitar o excesso de formação de espuma.

Para otimizar a oxigenação do meio, é fundamental que o ar seja aspergido em pequenas bolhas, o que é conseguido com a instalação de um aerador no ápice das mangueiras feito de vidro sinterizado, semelhante ao que foi citado para o cultivo de células vegetais. Da mesma forma, é fundamental a adição de substâncias antiespumantes ao meio de cultura.

Cultivo de algas

A literatura é bastante rica em informações sobre o cultivo de algas, que, normalmente, é conduzido nos mais diferentes tipos de frascos e biorreatores (Xu et al., 2009). O uso do biorreator desenvolvido pela Embrapa é apenas mais um tipo de equipamento que pode ser adaptado para o cultivo de algas, o que vai depender de ajustes para cada espécie a ser cultivada.

O cultivo de algas nesse biorreator deve ser conduzido sob imersão permanente, com borbulhamento contínuo e, apenas, sob condições assépticas, isto é, na ausência de bactérias, fungos e outras algas não alvo. Um fator essencial para o cultivo de algas, além do

ajuste do meio de cultura, é o uso de alta intensidade luminosa, de tal forma a permitir níveis ótimos de fotossíntese. O borbulhamento durante o período luminoso é fundamental para fornecer CO_2 para a fotossíntese e, no período escuro, fornecimento de O_2 . Para melhorar a taxa de crescimento, pode-se instalar um sistema de enriquecimento de CO_2 no ambiente de cultivo. O enriquecimento de CO_2 do ar, a ser borbulhado durante o período luminoso, pode contribuir para um aumento substancial da taxa fotossintética e, conseqüentemente, da produtividade.

Para o cultivo de algas, bem como para fungos e bactérias, é possível fazer o uso de frascos de 10 L sem haver necessidade de ajustes no kit de 5 L. Nos frascos de 10 L, o cultivo pode ser feito em, no máximo, 8 L de meio. Para um kit de 100 frascos, um volume de 800 L de meio pode ser utilizado para cada ciclo de cultivo. Embora não seja um volume muito grande para fins de produção de algas em larga escala, essa quantidade pode ser suficiente para uma fase de multiplicação inicial de linhagens puras, que serão, posteriormente, utilizadas para produção massal. Esse tipo de biorreator também pode ser utilizado na fase de ajustes e de validação de condições de cultivo e meio de cultura para a produção de algas em larga escala.

O cultivo de algas no presente modelo de biorreator pode apresentar algumas vantagens, tais como:

- a) A manipulação demanda baixo envolvimento de mão de obra.
- b) A manipulação é simples, desde a esterilização dos frascos até a inoculação dos frascos com amostras da linhagem a ser cultivada.
- c) O cultivo pode ser feito em todos os frascos, sob imersão permanente.
- d) O borbulhamento do meio é feito de forma eficiente, utilizando vidro sinterizado nas extremidades das mangueiras no interior dos frascos.
- e) A iluminação é feita com lâmpadas de LED de alta intensidade, a fim de permitir uma alta taxa fotossintética.
- f) O enriquecimento de CO_2 pode ser feito de forma bastante fácil, sem grandes alterações do equipamento.
- g) O descarregamento do material em cultivo é facilmente conduzido.

Essas são as principais aplicações para o biorreator desenvolvido pela Embrapa. Outras aplicações poderão ser avaliadas, como, por exemplo, o cultivo de insetos e outros animais de pequeno porte.

Na patente, apresentada no Anexo 1, foi aventada a possibilidade de cultivo de células animais. Embora não se possa descartar essa possibilidade, o cultivo de células animais demanda um controle ambiental e atmosférico muito mais rigoroso do que o de material vegetal, além de meios de cultura rigorosamente formulados. Além do mais, existem inúmeros tipos de equipamento para o cultivo de células animais que, embora bastante caros, oferecem condições de cultivo muito mais adequadas.

Vantagens do uso de biorreator (modelo Embrapa) na micropropagação

O uso de biorreator apresenta uma série de vantagens na produção de mudas de plantas, quando comparado com o processo convencional, no qual se utilizam frascos pequenos e meio de cultura gelificado. A seguir, são descritas as principais vantagens do uso de biorreator na micropropagação.

Melhor suprimento de nutrientes e reguladores de crescimento

Como a imersão do explante é total, a absorção de nutrientes se dá por toda a superfície, em contraste com o cultivo em meio gelificado, no qual a absorção ocorre apenas na superfície de contato do explante com o meio. Além do mais, a aeração forçada estimula o metabolismo e, com isso, o crescimento do explante. Da mesma forma, a homogeneização do meio impede a formação de gradiente de nutrientes, como ocorre no cultivo em meio gelificado. Nesse caso, há a formação de um gradiente decrescente de concentração de nutrientes, de pontos mais distantes para pontos mais próximos do explante.

Melhor controle das condições de cultivo

Os principais fatores ambientais que influenciam o crescimento do explante são a temperatura, a luminosidade e a troca gasosa. Com o uso de biorreator, é possível dosar a intensidade luminosa sem que haja qualquer interferência, quando comparado com os frascos tradicionais. Com o uso de lâmpadas de LED, é possível aproximar a fonte de luz do frasco ou até mesmo introduzir a fonte luminosa no próprio frasco de cultivo. Além disso, é possível fazer a dosagem de diferentes cores, dependendo da necessidade do cultivo, além da intensidade luminosa. Quanto à troca gasosa, as possibilidades são inúmeras, já que, pela dosagem de uma fonte de ar artificial, é possível disponibilizar para as culturas diferentes combinações de gases, a fim de resultar numa alta taxa de crescimento dos explantes. Da mesma forma, a suplementação com CO₂ pode estimular o processo fotossintético e, com isso, estimular o crescimento do explante, além de melhorar a qualidade da muda produzida.

Redução de hiper-hidricidade dos explantes

Para algumas espécies, e dependendo da composição do meio de cultura e das condições de cultivo, pode ocorrer o que se chama hiper-hidricidade dos explantes (Debergh et al., 1992). Hiper-hidricidade é uma anormalidade fisiológica do explante, em que se observa um crescimento anormal, com aspecto vítreo, o que justificou inicialmente o uso do termo vitrificação para denominar esse fenômeno (Debergh et al., 1981; Kevers et al., 1984). Essa anormalidade pode prejudicar significativamente o processo de produção, já que resulta na formação de mudas anormais, as quais apresentam, entre outras características, maior dificuldade de enraizamento e aclimatização.

Segundo Kevers et al. (2004), o aparecimento de hiper-hidricidade é resultado do cultivo *in vitro* sob condições estressantes, devido ao contato do explante com meio de cultura com alta força iônica, rico em nitrogênio e reguladores de crescimento. Também contribui para o aparecimento dessa anomalia a manutenção dos explantes em ambiente de alta umidade relativa e atmosfera gasosa confinada num pequeno volume.

Pouco se sabe sobre as causas do aparecimento da hiper-hidricidade, mas uma coisa é certa: há influência do genótipo no aparecimento desse fenômeno, e algumas espécies são muito mais suscetíveis que outras. Por exemplo, o cravo (*Dianthus caryophyllus*) é considerado uma das espécies mais suscetíveis ao aparecimento de hiper-hidricidade, quando cultivado *in vitro*, mesmo em meio gelificado (Yadav et al., 2003).

Outro fator que pode influenciar o aparecimento de hiper-hidricidade é a umidade relativa excessivamente alta no interior dos frascos, que chega próximo a 100% na maior parte do tempo no processo convencional. Com baixa ou nenhuma transpiração, alguns íons do meio de cultura – como o Ca^{2+} – são menos absorvidos, levando ao desequilíbrio nutricional do explante.

Além desses fatores, há também o fator relacionado à formulação do meio básico – o meio salino. Por exemplo, a presença de alto teor de nitrogênio, seja na forma amoniacal ou nítrica, exige grande quantidade de energia na forma de ATP e NADH para ser metabolizado. Com isso, as células ficam com baixa disponibilidade energética para os processos de divisão e alongamento celular, o que resulta em uma planta pouco vigorosa (Kevers et al., 2004).

O uso de biorreator de imersão temporária pode reduzir a incidência de hiper-hidricidade na maioria das espécies, dado que a renovação do ar, associada a um ciclo de imersão/emersão adequada, faz com que haja exaustão de gases que podem estar envolvidos no aparecimento desse fenômeno, como, por exemplo, o etileno. Segundo Lai et al. (2005), a hiper-hidricidade pode ser reduzida pela ventilação do frasco de cultivo.

Além do mais, a atmosfera interna dos frascos apresenta uma composição de gases mais próxima da atmosfera do ambiente externo, havendo disponibilidade de O_2 e CO_2 para os processos respiratórios e fotossintéticos. Caso a intensidade luminosa e a qualidade do espectro luminoso sejam adequadas, haverá estímulo ao funcionamento fotossintético e estomático a fim de permitir que as partes verdes fixem energia na forma química e produzam compostos orgânicos diversos, que serão importantes para o adequado crescimento e desenvolvimento do explante, inibindo o aparecimento de hiper-hidricidade.

O uso de biorreator de imersão temporária pode, igualmente, contribuir para redução da umidade relativa do ar no interior dos frascos de cultivo, visto que o ar proveniente do compressor apresenta umidade relativa abaixo da saturação.

Redução da frequência de repicagens, tempo de troca do meio de cultura e etiquetagem

O uso de meio líquido em frascos maiores resulta numa maior facilidade de manuseio em capela. O tempo de trabalho na capela é uma fração do tempo gasto no sistema convencional. Com o uso de meio gelificado, os cuidados com corte, distribuição e orientação

do explante no meio tornam o processo entediante e demorado. No que lhe concerne, no meio líquido, os explantes são introduzidos em uma ação apenas, dispensando a subdivisão.

Uma vez transferidos para os frascos de biorreator, os explantes não passam por nenhuma manipulação a não ser as trocas de meio, em capela de fluxo laminar, quando o meio velho – normalmente após 30 dias de cultivo – é substituído pelo meio fresco. Já, no processo convencional, os frascos com material em cultivo são levados para capela de fluxo laminar, e os explantes retirados, subdivididos e transferidos para novos frascos com meio fresco. Esse tempo de manipulação é bem maior do que quando se usa biorreator. O tempo gasto para manipulação de um par de frascos de 5 L de biorreator demora não mais que 5 minutos, considerando o transporte dos frascos até a capela, a troca de meio e o retorno dos frascos à prateleira. Como a etiquetagem é feita por kit de biorreator, o número de etiquetas é consideravelmente menor. Assim, o tempo gasto para manipulação de 20 a 30 frascos pequenos – o correspondente em mudas por frasco de biorreator – é da ordem de 40 a 60 minutos, ou seja, 8 a 12 vezes o tempo gasto para um único frasco de biorreator.

Redução do número de frascos

Em apenas um frasco de biorreator de 5 L, algo entre 100 e 300 mudas podem ser produzidas, podendo chegar a 500 para algumas espécies. Na micropropagação convencional, de 20 a 30 frascos são necessários para produzir o mesmo número de mudas. Assim, para produção de um milhão de mudas por ano, algo como 50 mil frascos pequenos são utilizados no processo convencional. Já com o uso de biorreatores, esse número cai para 10 mil frascos.

Possibilidade de algum grau de automação

Na cultura de tecidos vegetais na forma convencional, todos os passos do processo são conduzidos manualmente, o que resulta numa atividade altamente demandante de mão de obra. Já com o uso de biorreatores de imersão temporária, algumas fases do processo podem ser automatizadas, como, por exemplo, a exposição temporária dos explantes ao meio de cultivo e a renovação do ar interno dos recipientes. Com o uso de frascos maiores, não é necessário fazer as subculturas e repicagens do material, como são feitas no cultivo em meio convencional. Por exemplo, no modelo de biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa, os multibrotos de abacaxi não precisam ser subdivididos, como é feito no cultivo convencional, basta apenas a renovação do meio a cada 3 ou 4 semanas. Com isso, há uma grande economia de mão de obra e tempo de trabalho, além de redução da possibilidade de misturas varietais.

Embora o grau de automação dos modelos atuais ainda seja relativamente baixo, no futuro poderá ser ampliado (ex.: troca e substituição automática do meio de cultura, determinação e ajuste do pH do meio, variações na intensidade e qualidade de luz, determinação e ajuste do teor de oxigênio e CO₂ dissolvido, identificação de contaminação bacteriana ou fúngica e aplicação de medidas de controle, entre outros, além do cultivo em condições autotróficas).

Alta produtividade e eficiência do processo

Devido ao uso de meio líquido, maior volume de frasco e melhores condições de cultivo, com a renovação do ar no interior dos frascos, o cultivo em biorreator de imersão temporária apresenta produtividade muito maior que aquela conduzida em meio gelificado, em frascos pequenos. Essa produtividade é reflexo da maior taxa de crescimento, melhor alongamento das hastes caulinares e melhor enraizamento. Além disso, pelo cultivo das mudas em ambiente drenado, há melhor desenvolvimento do aparelho estomático e fotossintético, bem como maior deposição de cera na superfície das folhas, resultando em maior percentagem de sobrevivência e melhor crescimento das mudas na fase de aclimatização.

Aumento da escala de produção de mudas

Mais uma vantagem do uso de biorreator de imersão temporária diz respeito ao volume de mudas a serem produzidas num mesmo espaço de laboratório. O uso de frascos convencionais limita o número de mudas produzidas por frascos. Já com o uso de biorreator, centenas de mudas podem ser produzidas por frasco, o que resulta num aumento significativo do número final de mudas produzidas num mesmo espaço de prateleiras. Com isso, uma biofábrica com a mesma estrutura física e de pessoal pode aumentar significativamente o número total de mudas produzidas, no mesmo período e basicamente com a mesma infraestrutura, necessitando apenas de maior espaço nos telados para a fase de aclimatização.

Redução do custo de produção

Vários fatores contribuem para o custo da muda produzida, tais como mão de obra, energia elétrica, reagentes químicos e materiais de laboratório, sem falar dos impostos, do custo do capital investido e dos custos de manutenção de infraestrutura e equipamentos. A mão de obra é a que representa o maior valor, chegando a 60% do custo final da muda (Etienne; Berthouly, 2002). Em segundo lugar, vem o custo da energia elétrica. Dessa forma, qualquer medida que reduza o envolvimento de mão de obra e consumo de energia elétrica vai contribuir significativamente para redução do custo de produção.

O consumo de energia é muito menor quando se usa biorreator, já que os frascos são esterilizados por meio químico, requerendo menor tempo de uso de autoclave, a qual é utilizada apenas para esterilização do meio de cultura, das mangueiras e dos filtros de ar.

O cultivo em biorreator contribui para grande economia de mão de obra, já que frascos maiores (de 5 L ou mesmo de 10 L) podem ser utilizados. Assim, num mesmo período de tempo, um número muito maior de explantes pode ser manipulado em comparação ao cultivo convencional.

Além da economia de mão de obra e energia elétrica, existem outras razões que contribuem para a redução do custo de produção, tais como redução do número de frascos, redução da frequência de repicagens, redução do tempo de troca do meio de cultura e etiquetagem, uso de meio líquido, melhor aproveitamento das mudas, devido a um maior vigor e menor tempo de cultivo na fase de aclimatização.

Desvantagens do uso de biorreator (modelo Embrapa) na micropropagação

O cultivo em biorreator apresenta algumas desvantagens, como as que serão discutidas a seguir.

Maior risco de contaminação microbiana

A contaminação bacteriana e/ou fúngica é um dos maiores (senão o maior) problemas de qualquer biofábrica de produção de mudas por técnicas de cultura de tecidos de plantas, incluindo aquelas que utilizam biorreator (Cassells, 2001; Teixeira, 2010a, 2010b). Isso se deve ao fato de que meios de cultura altamente nutritivos, com a presença de minerais, vitaminas e açúcares, são utilizados no processo. Assim, é de se esperar que qualquer microrganismo – bactéria ou fungo –, uma vez em contato com o meio nutritivo, cresça de forma descontrolada.

Quando se usa meio gelificado, a contaminação pode ficar restrita a um ou outro explante, e os demais podem ser resgatados a tempo de evitar que a contaminação tome conta de todos os explantes. Além disso, a perda de um frasco pequeno incorrerá em perda de um número reduzido de mudas, algo entre 10 e 20 mudas, para a maioria das espécies. Já, com o uso de meio líquido, basta apenas uma célula do contaminante para comprometer todos os explantes de um mesmo frasco. Com o uso de biorreator – meio líquido e aeração forçada do meio de cultura –, o problema é ainda maior. A aeração forçada e a homogeneização do meio de cultura estimulam o crescimento de microrganismos, o que resulta em perda total das mudas do frasco e, conseqüentemente, em perda de centenas de mudas de uma só vez.

Ações de controle da contaminação em biofábricas devem ser conduzidas basicamente tomando como referência os cuidados de assepsia. O uso de antibióticos convencionais não é indicado, pelo menos, por dois motivos. O primeiro é que o uso de antibióticos, de forma sistemática, pode levar ao aparecimento de microrganismos resistentes num prazo relativamente curto. O segundo motivo, não menos importante, é que o uso de antibióticos cria uma falsa segurança, o que pode resultar em desleixo com os cuidados de assepsia e assim agravar o problema. Além do mais, a adição de determinados antibióticos pode ocasionar fitotoxicidade e levar à inibição do crescimento dos explantes, de forma a afetar o processo de produção das mudas.

Embora o problema de contaminação bacteriana seja mais frequente, a presença de fungos – principalmente os unicelulares – pode ser igualmente problemática.

Uma possível alternativa para o controle da contaminação seria o uso de substâncias inibidoras do crescimento microbiano, com modo de ação diferente dos antibióticos e fungicidas convencionais. O uso de tais substâncias reduziria os riscos de aparecimento de indivíduos resistentes e, com isso, poderiam ser utilizados de forma sistemática nos meios de cultura. Até o presente conhecimento, existem apenas dois produtos que foram desenvolvidos com essa finalidade. O primeiro é o produto denominado PPM™ (*plant preservative mixture*), uma mistura de methylisothiazolone e chloromethylisothiazolone

(Paul et al., 2001). Esse produto de fato inibe o crescimento de microrganismos in vitro, entretanto, dependendo da concentração, pode igualmente inibir o crescimento do explante e, por isso, tem sido utilizado com as devidas restrições. O outro produto é o vitrofural (1-[5-bromofur-2-il]-2-bromo-2-nitroethene) (Blondeau et al., 1999; Quiala et al., 2002), cujos resultados iniciais foram bastante promissores, mas que, por alguma razão, não vem sendo utilizado. Mais recentemente, surgiu uma terceira possibilidade de controle microbiano que tem como princípio ativo partículas nanométricas de prata (Spinoso-Castillo et al., 2017). Entretanto, essa alternativa precisa ser avaliada com cuidado, já que o uso de nanopartículas de prata pode ter efeitos indesejáveis ao material em cultivo.

Formação de espuma no meio de cultivo

O cultivo, sobretudo sob imersão permanente e principalmente com borbulhamento contínuo, pode resultar na formação de espuma. Normalmente, isso ocorre pelo aumento da viscosidade do meio devido à exsudação de substâncias de alto peso molecular pelos explantes em cultivo, como as glicoproteínas (Takeichi et al., 1998). Isso pode ser problemático caso a quantidade de material e o volume de cultivo sejam muito grandes, o que resultará em grande quantidade de espuma, podendo ocupar todo o espaço livre do frasco, o que vai dificultar os procedimentos de repicagem, troca de meio, etc. Para contornar esse problema, existem substâncias disponíveis no mercado, com alto grau de pureza, que podem ser utilizadas para reduzir a formação de espuma, que são os conhecidos antiespumantes (Wongsamuth; Doran, 1994). Entretanto, essas substâncias precisam ser testadas antes de serem adicionadas aos meios de cultivo de forma rotineira. Já nos biorreatores de imersão temporária, o tempo de borbulhamento, em geral, é bastante curto, minimizando a formação de espuma.

Recalcitrância de algumas espécies

A produção de mudas em biorreator vem sendo feita para um número de espécies cada vez maior. Entretanto, o número de espécies multiplicadas que utilizam biorreator ainda é relativamente pequeno. Isso se deve, entre outros fatores, ao fato de que nem sempre se dispõe de protocolo para a multiplicação da espécie de interesse.

O desenvolvimento de novos protocolos é feito, primeiramente, por meio do uso de frascos pequenos, meio gelificado ou líquido, de forma experimental. Os testes em frascos pequenos são importantes porque permitem conduzir um número suficientemente grande de experimentos, para que sejam obtidos resultados conclusivos. Após a conclusão dos experimentos em frascos pequenos, são conduzidos os testes para adaptação da metodologia para frascos maiores, em meio líquido, em biorreator.

Oxidação fenólica

O uso de biorreator não necessariamente resulta em maior intensidade de oxidação fenólica. Entretanto, ajustes cuidadosos precisam ser feitos na frequência de imersão, no tempo de imersão e na pressão do ar do sistema.

Esses parâmetros são importantes, pois permitem boa absorção de nutrientes, homogeneização do meio de cultura e aeração adequada dos explantes. Cuidados especiais devem levar em consideração a pressão de ar do sistema. Pressão excessiva resulta em excesso de aeração, além de dano mecânico ao explante por turbilhonamento do meio.

A oxidação fenólica, depois da contaminação microbiana, representa um dos problemas mais sérios no cultivo *in vitro*, especialmente das espécies lenhosas (Ahmad et al., 2013). Os exsudatos podem aparecer devido ao corte e à manipulação dos explantes durante a fase inicial de cultivo ou algum tempo depois. Após a excisão, os explantes podem apresentar exsudatos amarelados logo após a inoculação ou nos dias seguintes, podendo se agravar em função da formulação do meio de cultura e do tipo de explante utilizado. O escurecimento dos explantes e do meio de cultura, principalmente em volta do explante, deve-se à ação de enzimas específicas – as polifenoloxidasas. Essas enzimas oxidam orto-fenóis formando orto-quinonas. Estas últimas apresentam coloração amarela e podem inibir o crescimento ou mesmo levar os tecidos do explante à morte (Compton; Preece, 1988; Ndakidemi et al., 2014).

A oxidação fenólica, em geral, é um grande problema no cultivo *in vitro*, entretanto, para determinados casos, uma oxidação branda pode ter efeitos benéficos, já que pode se contrapor aos problemas relacionados à contaminação por microrganismos, sobretudo à contaminação bacteriana. Em outros casos, a presença de substâncias fenólicas pode ser benéfica ao crescimento do explante (Arencibia et al., 2008). Na maioria dos cultivos *in vitro*, a presença de algum grau de oxidação fenólica ocorre sendo tolerada, já que o prejuízo ao crescimento dos explantes é pequeno, não justificando qualquer tipo de tratamento.

Excesso de crescimento foliar das novas mudas

Um dos problemas que podem aparecer em algumas espécies, como, por exemplo, a banana, é o excesso de crescimento foliar, representado basicamente pelo alongamento excessivo da lâmina foliar, por causa da iluminação deficiente e do sombreamento das mudas mais internas do frasco de biorreator. Com isso, o vigor das mudas pode ser menor, e isso compromete o seu aproveitamento, principalmente devido a perdas na fase de aclimatização. Para amenizar esse problema, novos tipos de frascos precisam ser desenvolvidos e avaliados, dando preferência àqueles que permitam melhor iluminação das culturas. Além do mais, o aumento da intensidade luminosa ou a aproximação da fonte de luz ao frasco de cultivo pode levar a um resultado semelhante.

Igualmente importante é a quantidade de explantes por frasco. Para cada cultura, há uma quantidade adequada de brotos e gemas a serem inoculados por frasco, a fim de que as mudas mais internas recebam a quantidade adequada de luz.

Como o alongamento foliar está, entre outros fatores, relacionado ao teor endógeno de ácido giberélico, uma possível solução para o problema é a adição de paclobutrazol ou ancymidol ao meio de cultura (Ziv; Ariel, 1991; Chen; Ziv, 2001). Essas substâncias são inibidoras da síntese de ácido giberélico (Graebe, 1987; Rademacher, 1989). A aplicação desses produtos irá inibir o crescimento excessivo do limbo foliar, além de atuar na inibição da síntese de etileno (Grossamann et al., 1989), o que poderá trazer benefícios adicionais às mudas, dado que o etileno pode causar vários problemas no cultivo *in vitro*, como inibição do crescimento e senescência, além de estar envolvido no aparecimento dos sintomas de hiper-hidricidade.

Desuniformidade no tamanho das mudas ao final do ciclo de cultivo

Com o uso de frascos de grande volume, de 5 L ou mesmo de 10 L, onde centenas de mudas são produzidas por ciclo de cultivo, é comum o aparecimento de mudas com diferentes tamanhos. Entretanto, isso não constitui um grande problema, visto que as mudas podem ser facilmente classificadas em duas ou três categorias durante a fase de aclimatização, quando serão cultivadas separadamente. Dependendo da espécie e da forma de cultivo, pode ocorrer a formação de pequenas touceiras *in vitro*, para as quais fica difícil a individualização das mudas. Para esses casos (ex.: abacaxi e cana-de-açúcar), as touceiras podem ser levadas para o ambiente de aclimatização e cultivadas intactas em leitos ou em grandes bandejas com substrato, por algum tempo. Ao final de algumas semanas, as mudas serão, então, individualizadas e cultivadas separadamente. Esse artifício não elimina alguma diferença de tamanho, mas permite que mudas muito pequenas tenham a chance de adquirir um tamanho que viabilize sua separação das touceiras, permitindo maior aproveitamento das mudas.

Aparecimento de variantes somaclonais

Embora não seja inerente ao cultivo em biorreator, variações – do tipo genética, epigenética ou fisiológica – podem aparecer e comprometer parte ou todo o lote de mudas que está sendo produzido. Como regra geral, pelo menos duas medidas podem ser adotadas para evitar ou reduzir a chance de aparecimento de variantes somaclonais. A primeira é, sempre que possível, reduzir os teores de reguladores de crescimento utilizados. Já a segunda é utilizar menor número de ciclos de multibrotação, uma vez que essa fase, normalmente, é conduzida em meio de cultura com elevado teor de reguladores de crescimento, principalmente citocinina (Martínez-Estrada et al., 2017).

Alto custo do investimento inicial

Geralmente, biorreatores são equipamentos caros, elevando o valor do investimento inicial. Além disso, considerar os custos de reparo, substituição de peças e atualização dos equipamentos, além do consumo de frascos que, em sua maioria, são descartáveis.

Considerações finais

Desde os primeiros testes conduzidos por Takayama e Misawa (1981), dezenas de modelos de biorreatores, tanto de imersão permanente quanto de imersão temporária, foram desenvolvidos e testados na micropropagação. Os resultados, principalmente para os modelos de biorreator de imersão temporária, têm sido promissores. Entretanto, embora alguns modelos de biorreatores tenham sobressaído, não é possível eleger o melhor ou os melhores, dado que cada modelo tem suas peculiaridades de construção e funcionamento e se adaptam melhor para determinada espécie ou finalidade. Novos modelos de biorreator

de imersão temporária, principalmente no que diz respeito ao tipo de frasco utilizado, têm surgido, com novas possibilidades de uso.

Qualquer modelo que surja deve apresentar, entre outras, algumas características essenciais: baixo custo de aquisição, facilidade de montagem, funcionamento estável – sem requerer ajustes frequentes no seu funcionamento –, facilidade de uso em capela de fluxo laminar, contaminação mínima e baixo consumo de energia elétrica.

Entre os novos modelos, o biorreator do tipo autotrófico é uma possibilidade, pois possui fonte de luz de LED de alta intensidade, com espectro de emissão própria para estimular a fotossíntese, principalmente quando acompanhado de um sistema de suplementação de CO₂. Com a eliminação da sacarose do meio de cultura, é possível obter mudas com características semelhantes às mudas derivadas de sementes, com maior percentagem de sobrevivência e maior taxa de crescimento, sobretudo na fase inicial de aclimatização. A eliminação da fonte de açúcar do meio de cultura contribui também para reduzir os problemas com contaminação microbiana no frasco.

Referências

- AHMAD, I.; HUSSAIN, T.; ASHRAF, I.; NAFEEES, M.; RAFAY, M.; IQBAL, M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. **American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 13, n. 4, p. 539-547, 2013. DOI: [10.5829/idosi.aejaes.2013.13.04.1](https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2013.13.04.1).
- AITKEN-CHRISTIE, J.; DAVIES, H. E. Development of a semi-automated micropropagation system. **Acta Horticulture**, v. 230, p. 81-87, 1988. DOI: [10.17660/ActaHortic.1988.230.7](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.230.7).
- AITKEN-CHRISTIE, J.; JONES, C. Towards automation: radiata pine shoot hedges in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 8, p. 185-196, 1987. DOI: [10.1007/BF00040945](https://doi.org/10.1007/BF00040945).
- AKITA, M.; TAKAYAMA, S. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. **Plant Cell Reports**, v. 13, p.184-187, Jan. 1994. DOI: [10.1007/BF00239889](https://doi.org/10.1007/BF00239889).
- ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 32, p. 55-60, Jan. 1993. DOI: [10.1007/BF00040116](https://doi.org/10.1007/BF00040116).
- ARENCIBIA, A. D.; BERNAL, A.; YANG, L.; CORTEGAZA, L.; CARMONA, E. R.; PÉREZ, A.; HU, C.-J.; LI, Y.-R.; ZAYAS, C. M.; SANTANA, I. New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). **Plant Science**, v. 175, n. 4, p. 487-496, Oct. 2008. DOI: [10.1016/j.plantsci.2008.05.024](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.024).
- ATTREE, S. M.; POMEROY, M. K.; FOWKE, L. C. Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* (Moench. Voss.) synthetic seeds in a bioreactor. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 601-606, Aug. 1994. DOI: [10.1007/BF00232929](https://doi.org/10.1007/BF00232929).
- BENSADDEK, L.; VILLARREAL, M. L.; FLINIAUX, M. Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. **Electronic Journal of Integrative Biosciences**, v. 3, n. 1, p. 2-9, 2008.
- BERTHOULY, M.; DUFOUR, M.; ALVARD, D.; CARASCO, C.; ALEMANO, L.; TEISSON, C. Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 16th, 1995, Kyoto. **Annals...** Paris: ASIC, 1995. p. 514-519.
- BLONDEAU, J. M.; CASTANEDO, N.; GONZALES, O.; MENDINA, R.; SILVEIRA, E. In vitro evaluation of G1: a novel antimicrobial compound. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, v. 2, p. 163-166, Feb.1999. DOI: [10.1016/S0924-8579\(98\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(98)00086-7).

- BOBBINS, W. J. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. **Botanical Gazette**, v. 73, p. 376-390, May 1922.
- BULA, R. J.; MORROW, T. W.; TIBBITS, T. W.; BARTA, D. J. IGNATUS, R. W.; MARTIN, T. S. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. **HortScience**, v. 26, n. 2, p. 203-205, Feb. 1991.
- CABASSON, C.; ALVARD, D.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P.; TEISSON, C. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 50, p. 33-37, July 1997. DOI: [10.1023/A:1005896725780](https://doi.org/10.1023/A:1005896725780).
- CARVALHO, L. C. O.; OZUDOGRU, E. A.; LAMBARDI, M.; PAIVA, L. V. Temporary Immersion system for micropropagation of tree species: a bibliographic and systematic review. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 47, n. 2, p. 269-277, Oct. 2019. DOI: [10.15835/nbha47111305](https://doi.org/10.15835/nbha47111305).
- CASELLS, A. C. Contamination and its impact in tissue culture. **Acta Horticulture**, v. 560, p. 353-359, 2001. DOI: [10.17660/ActaHortic.2001.560.66](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.560.66).
- CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-cultured *Narcissus*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 22-27, Jan. 2001. DOI: [10.1007/s002990000283](https://doi.org/10.1007/s002990000283).
- COMPTON, M. E.; PREECE, J. E. Effects of phenolic compounds on tobacco callus and blackberry shoot cultures. **Journal of American Society of Horticulture Science**, v. 113, n. 1, p. 160-163, 1988.
- DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; ARNOLD, S. von; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 30, p. 135-140, Aug. 1992. DOI: [10.1007/BF00034307](https://doi.org/10.1007/BF00034307).
- DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y.; LEMEURE, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, v. 53, p. 181-187, Oct. 1981. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1981.tb04130.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb04130.x).
- DENCHEV, P. D.; KUKLIN, A. I.; SCRAGG, A. H. Somatic embryo production in bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 99-109, Oct. 1992. DOI: [10.1016/0168-1656\(92\)90071-G](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90071-G).
- DICKENS, C. W. S.; STADEN, J. van. The induction and evocation of flowering in vitro. **South African Journal of Botany**, v. 54, n. 4, p. 325-344, Aug. 1988. DOI: [10.1016/S0254-6299\(16\)31299-6](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(16)31299-6).
- DUCOS, J. P.; LAMBOT, C.; PÉTIARD, V. Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. **International Journal of Plant Developmental Biology**, v. 1, n. 1, p. 1-12, Apr. 2007.
- EMBRAPA. Recursos Genéticos e Biotecnologia. João Batista Teixeira, Luis Pedro Barrueto Cid. **Sistema de biorreatores para o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos por imersão temporária ou contínua utilizando fonte de pressão positiva ou negativa**. BR n.PI 0004185-8, 8 ago. 2000. 12 jan. 2016.
- ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZALEZ, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 9, p. 743-748, 1999. DOI: [10.1007/s002990050653](https://doi.org/10.1007/s002990050653).
- ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 215-231, 2002. DOI: [10.1023/A:1015668610465](https://doi.org/10.1023/A:1015668610465).
- ETIENNE, H.; LARTAUD, M.; MICHAUX-FERRIERRE, N.; CARRON, M. P.; BERTHOULY, M.; TEISSON, C. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 33, p. 81-87, Apr. 1997. DOI: [10.1007/s11627-997-0001-2](https://doi.org/10.1007/s11627-997-0001-2).
- FOWLER, M. W. Process systems and approaches for large-scale plant cell cultures. In: GREEN, C. E.; SOMERS, D. A.; HACKET, W. P.; BIESBOER, D. D. (ed.). **Plant Tissue and Cell Culture**. New York: Alan R. Liss, 1987. p. 459-471.
- GONTIER, E.; PIUTTI, S.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GRABNER, A.; MASSOT, B.; LIEVRE, K.; TRAN, M.; GOERGEN, J. L.; BOURGAUD, F. Development and validation of an efficient low cost bioreactor for furanocoumarin production

- with *Ruta graveolens* shoot cultures. In: HVOSLEF-EIDE, A. K. (ed.). **Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation**. Dordrecht: Sprineger, 2005. p. 509-524.
- GRAEBE, J. E. Gibberellin biosynthesis and control. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 419-465, June 1987. DOI: [10.1146/annurev.pp.38.060187.002223](https://doi.org/10.1146/annurev.pp.38.060187.002223).
- GROSSAMANN, K.; HAUSER, C.; SAUERBREY, E.; FRITSCH, H.; SCHMIDT, O. Plant growth retardants as inhibitors of ethylene production. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 538-543, July 1989. DOI: [10.1016/S0176-1617\(89\)80144-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80144-0).
- HAHN, E.-J.; KOZAI, T.; PAEK, K.-Y. Blue and red light-emitting diodes with or without sucrose and ventilation affects in vitro Growth of *Rehmannia glutinose* plantlets. **Journal of Plant Biology**, v. 43, n. 4, p. 247-250, Dec. 2000. DOI: [10.1007/BF03030425](https://doi.org/10.1007/BF03030425).
- HARRIS, R. E.; MASON, E. B. B. Two machines for in vitro propagation of plants in liquid media. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 63, n. 1, p. 311-316, Jan. 1983. DOI: [10.4141/cjps83-032](https://doi.org/10.4141/cjps83-032).
- HVOSLEF-EIDE, A. K.; OLSEN, O. A. S.; LYNGBED, R. Bioreactor design for propagation of somatic embryos. In: HVOSLEF-EIDE, A. K. (ed.). **Liquid culture systems for in vitro plant propagation**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 41-59.
- ISHIBASHI, T.; ODAWAM, Y.; FUJIWARA, K.; OOKUMA, M. New oxygen supplying method for animal cell reactors. **Hitachi Hyouron**, v. 69, n. 4, p. 301-305, 1987.
- KESSEL, R. H. J.; CARR, A. H. The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. **Journal Experimental Botany**, v. 23, n. 4, p. 996-1007, Nov. 1972. DOI: [10.1093/jxb/23.4.996](https://doi.org/10.1093/jxb/23.4.996).
- KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLES, M. F.; GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, v. 61, p. 69-74, 1984. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1984.tb06102.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb06102.x).
- KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 181-191, May 2004. DOI: [10.1023/B:TICU.0000016825.18930.e4](https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016825.18930.e4).
- KHAN, S. A.; SIDDIQUI, M. H.; OSAMA, K. Bioreactors for hairy roots culture: a review. **Current Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 417-427, 2018. DOI: [10.2174/2211550108666190114143824](https://doi.org/10.2174/2211550108666190114143824).
- KRUEGER, S.; ROBACKER, C.; SIMONTON, W. Culture of *Amelanchier* × *grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 27, p. 219-226, Nov. 1991. DOI: [10.1007/BF00041293](https://doi.org/10.1007/BF00041293).
- LAI, C.-C.; LIN, H.-M.; NALAWADE, S. M.; FANG, W.; TSAY, H.-S. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 3, p. 355-361, Mar. 2005. DOI: [10.1016/j.jplph.2004.07.015](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.07.015).
- LEE, T. S. G.; LEE, L. L. L. Biofábrica de plantas: por que biorreator? In: LEE, T. S. G. (ed.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de Plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 14-31.
- LORENZO, J. C.; GONZÁLEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 197-200, 1998. DOI: [10.1023/A:1006168700556](https://doi.org/10.1023/A:1006168700556).
- LUTTMAN, R.; FLOREK, P.; PREIL, W. Silicone-tubing aerated bioreactors for somatic embryo production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, n. 2, p. 157-170, Nov. 1994. DOI: [10.1007/BF00033923](https://doi.org/10.1007/BF00033923).
- MARGARITIS, A.; WALLACE, J. B. Novel bioreactor systems and their applications. **Bio/Technology**, v. 2, p. 447-453, 1984. DOI: [10.1038/nbt0584-447](https://doi.org/10.1038/nbt0584-447).
- MARTÍNEZ-ESTRADA, E.; CAAMAL-VELÁZQUEZ, J. H.; SALINAS-RUÍZ, J.; BELLO-BELLO, J. J. Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple

sequence repeat (ISSR) markers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, p. 553-560, Sept. 2017. DOI: [10.1007/s11627-017-9852-3](https://doi.org/10.1007/s11627-017-9852-3).

McALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 347-358, 2005. DOI: [10.1007/s11240-004-6658-x](https://doi.org/10.1007/s11240-004-6658-x).

MIYASHITA, Y.; KITAYA, Y.; KOZAI, T.; KIMURA, T. Effects of red and far-red light on the growth and morphology of potato plantlets in vitro: Using light-emitting diodes as a light source for micropropagation. **Acta Horticulture**, v. 393, p. 710-715, 1995. DOI: [10.17660/ActaHortic.1995.393.22](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.393.22).

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-66, 1974. DOI: [10.1146/annurev.pp.25.060174.001031](https://doi.org/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, July 1962. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x).

NDAKIDEMI, C. F.; MNENEY, E.; NDAKIDEMI, P. A. Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in in vitro culture of *Brahylaena huillensis* using nodal segments. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 1, Article ID: 42300, 5 p., 2014. DOI: [10.4236/ajps.2014.51024](https://doi.org/10.4236/ajps.2014.51024).

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T. Growth of in vitro banana (*Musa SPP.*) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **In Vitro Cell and Developmental Biology – Plant**, v. 37, p. 824-829, July 2001. DOI: [10.1007/s11627-001-0137-4](https://doi.org/10.1007/s11627-001-0137-4).

NHUT, D. T.; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; OKAMOTO, K.; TANAKA, M. Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 43-52, 2003; DOI: [10.1023/A:1022638508007](https://doi.org/10.1023/A:1022638508007).

ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y.; HIROSAWA, T. Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, p. 137-145, 1994. DOI: [10.1007/BF00033921](https://doi.org/10.1007/BF00033921).

PAEK, K.-Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J. Application of bioreactor system for large-scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 287-300, 2005. DOI: [10.1007/s11240-004-6648-z](https://doi.org/10.1007/s11240-004-6648-z).

PAEK, K.-Y.; HAHN, E. J.; SON, S. H. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 37, p. 149-157, Mar. 2001. DOI: [10.1007/s11627-001-0027-9](https://doi.org/10.1007/s11627-001-0027-9).

PARK, J. M.; HU, W.-S.; STABA, E. J. Cultivation of *Artemisia annua* L. plantlets in a bioreactor containing a single carbon and a single nitrogen source. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 1209-1213, Nov. 1989. DOI: [10.1002/bit.2603409](https://doi.org/10.1002/bit.2603409).

PAUL, A. L.; SEMER, C.; KUCHARAK, T.; FERL, R. The fungicidal and phytotoxic properties of benomyl and PPM in supplemented agar media supporting g transgenic Arabidopsis plants for a space shuttle flight experiment. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 55, p. 480-485, May 2001. DOI: [10.1007/s002530000521](https://doi.org/10.1007/s002530000521).

PÉREZ-ALONSO, N.; JIMÉNEZ, E.; FERIA, M. de; CAPOTE, A.; BARBÓN, R.; QUIALA, E.; CHÁVEZ, M. Effect of inoculum density and immersion time on the production of potato microtubers in temporary immersion systems and field studies. **Bioteconología Vegetal**, v. 7, n. 3, p. 149-154, 2007.

PREIL, W. Application of bioreactor in plant propagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMANN, R. H. (ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers Group, 1991. p. 425-446.

PREIL, W.; FLOREK, P.; WIX, U.; BECK, A. Towards mass propagation by use of bioreactors. **Acta Horticulturae**, v. 226, p. 99-100, 1988. DOI: [10.17660/ActaHortic.1988.226.9](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.226.9).

QUIALA, E.; JIMÉNEZ, E.; FERIA, M. de; ALVARADO, Y.; CHÁVEZ, M.; AGRAMONTE, D.; RAMIREZ, D.; ACOSTA, M.; PÉREZ, N.; CAPOT, A. Empleo del Vitrofurcal en la esterilización química del endospermo artificial de los

- embriones somáticos encapsulados de *Saccharum* spp. híbrido var Cuba 87- 51. **Biotechnología Vegetal**, v. 2, v. 4. p. 221-226, July-Sept. 2002.
- SIMONTON, W.; ROBACKER, C.; KRUEGER, S. A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 27, p. 211-218, 1991. DOI: [10.1007/BF00041292](https://doi.org/10.1007/BF00041292).
- SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; MANN, M. L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 292-294, 1986. DOI: [10.1007/BF00269825](https://doi.org/10.1007/BF00269825).
- SOCCOL, C. R.; SCHEIDT, G. N.; MOHAN, R. **Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal**. Universidade Federal do Paraná. DEPR. 01508000078, 3 mar. 2008.
- SPINOSO-CASTILLO, J. L.; CHAVEZ-SANTOSCOY, R. A.; BOGDANCHIKOVA, N.; PEREZ-SATO, J. A.; MORALES-RAMOS, V.; BELLO-BELLO, J. J. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 129, p. 195-207, Jan. 2017. DOI: [10.1007/s11240-017-1169-8](https://doi.org/10.1007/s11240-017-1169-8).
- STEWART, F. C.; CAPLIN, S. M.; MILLAR, F. K. Investigations on growth and metabolism of plant cells: I. New techniques for the investigation of metabolism, nutrition and growth in undifferentiated cells. **Annals of Botany**, v. 16, n. 1, p. 57-77, Jan. 1952. DOI: [10.1093/oxfordjournals.aob.a083303](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083303).
- STUART, D. A.; STRICKLAND, S. G.; WALKER, K. A. Bioreactor production of alfalfa somatic embryos. **HortScience**, v. 22, p. 800-803, 1987.
- STYER, D. J. Bioreactor technology for plant propagation. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W. (ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p. 117-130.
- RADEMACHER, W. New plant growth retardants: Biochemical background and possibilities for practical application. **Acta Horticulture**, v. 239, p. 477-484, 1989. DOI: [10.17660/ActaHortic.1989.239.79](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1989.239.79).
- TAKAYAMA, S. Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 17, p. 495-515, 1991.
- TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioreactor techniques for large-scale culture of plant propagules. **Advanced Horticulture Science**, v. 12, p. 93-100, 1998.
- TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of bioreactors used for shoots and embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, p. 147-156, Nov. 1994. DOI: [10.1007/BF00033922](https://doi.org/10.1007/BF00033922).
- TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. **Plant & Cell Physiology**, v. 22, n. 3, p. 461-467, May 1981. DOI: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a076188](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076188).
- TAKAYAMA, S.; SWEDLUND, B.; MIVA, U. Automated propagation of microbulbs of lilies. In: VASIL, I. K. (ed.). **Cell Cultures and Somatic Cell Genetics of Plants**. San Diego: Academic Press, 1991a. v. 8, p. 111-131.
- TAKAYAMA, S.; AMO, T.; FUKANO, M. Rapid clonal propagation of *Hyacinthus orientalis* bulbs by shake culture. **Scientia Horticulturae**, v. 45, n. 3-4, p. 315-321, Jan. 1991b. DOI: [10.1016/0304-4238\(91\)90077-C](https://doi.org/10.1016/0304-4238(91)90077-C).
- TAKEICHI, T.; TAKEUCHI, J.; KANEKO, T.; KAWASAKI, S. Purification and characterization of a galactose-rich basic glycoprotein in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 116, p. 477-483, Feb. 1998. DOI: [10.1104/pp.116.2.477](https://doi.org/10.1104/pp.116.2.477).
- TANAKA, H.; NISHIJIMA, F. SUWA, M.; IWAMOTO, T. Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. **Biotechnology Bioengineering**, v. 25, p. 2359-2370, Oct. 1983. DOI: [10.1002/bit.260251007](https://doi.org/10.1002/bit.260251007).
- TANAKA, M.; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; ENDO, M.; YANAGI, T.; OKAMOTO, K. In vitro growth of *Cymbidium* plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Journal of Horticulture Science Biotechnology**, v. 73, p. 39-44, Nov. 1998. DOI: [10.1080/14620316.1998.11510941](https://doi.org/10.1080/14620316.1998.11510941).
- TAURORUS, T. E.; LULSDORF, M. M.; KIKCIO, S. I.; DUNSTAN, D. I. Bioreactor culture of *Picea mariana* Mill. Black spruce and the species complex *Picea glauca*-engelmann. II. Interior spruce somatic embryos growth parameters. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 38, p. 46-51, Oct. 1992. DOI: [10.1007/BF00169417](https://doi.org/10.1007/BF00169417).

- TEE, C. S.; MAZIAH, M.; TAN, C. S. Induction of in vitro flowering in the orchid *Dendrobium Sonia* 17. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 4, p. 723-726, Nov. 2008. DOI: [10.1007/s10535-008-0139-8](https://doi.org/10.1007/s10535-008-0139-8).
- TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J. V.; ETIENNE, H. In vitro culture by temporary immersion: a new device. **Plantations**, v. 2, n. 5, p. 32-33, 1995.
- TEIXEIRA, J. B. Biorreatores de imersão temporária: o futuro da produção industrial de plantas in vitro. In: LEE, T. S. G. (ed.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de Plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 34-49.
- TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para produção de mudas em larga escala. In: BARRUETO CID, L. P. (ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010b. p. 156-176.
- TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 24, p. 36-41, jan./fev. 2002.
- TEIXEIRA, J. B. Contaminações microbianas em biorreatores. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de Plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010a. p. 393-406.
- TEIXEIRA, J. B. **Mudas clonais de café: produção por meio de embriogênese somática**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017. 188 p.
- TEIXEIRA, J. B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 31 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 180).
- TEIXEIRA, J. B.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. Produção de mudas de abacaxi de alta qualidade através da micropropagação. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 26 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 70).
- TEPFER, D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. **Physiologia Plantarum**, v. 79, n. 1, p. 140-146, May 1990. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1990.tb05876.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05876.x).
- TISSERAT, B.; VANDERCOOK, C. E. Development of an automated plant culture system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 5, p. 107-117, Aug. 1985. DOI: [10.1007/BF00040307](https://doi.org/10.1007/BF00040307).
- TITOV, S.; BHOWMIK, S. K.; MANDAL, A.; ALAM, S.; UDDIN, S. N. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. cv. Kanthali floral bud explants. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 97-104, 2006.
- WAGNER, F.; VOGELMANN, H. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M. H. (ed.). **Plant tissue and its bio-technological application**. New York: Springer Berlin, 1977. p. 245-252.
- WEATHERS, P. J.; ZOBEL, R. W. Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells. **Biotechnology Advances**, v. 10, n. 1, p. 93-115, 1992. DOI: [10.1016/0734-9750\(92\)91353-G](https://doi.org/10.1016/0734-9750(92)91353-G).
- WEATHERS, P. J.; LIU, C.; TOWLER, T.; WYSLOUZIL, B. Mist reactors: principles, comparison of various systems, and case studies. **Electronic Journal of Integrative Biosciences**, v. 3, n. 1, p. 29-37, Oct. 2008.
- WHEAT, D.; BONDRIK, R. P.; NYSTROM, J. Spin filter bioreactor technology as applied to industrial plant propagation. **HortScience**, v. 21, p. 819, 1986.
- WHITE, P. E. Cultivation of excised roots of dicotyledonous plants. **American Journal of Botany**, v. 25, p. 348-356, May 1938. DOI: [10.2307/2436760](https://doi.org/10.2307/2436760).
- WONGSAMUTH, R.; DORAN, P. M. Foaming and cell flotation in suspended plant cell cultures and the effect of chemical antifoams. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 481-488, Aug. 1994. DOI: [10.1002/bit.260440411](https://doi.org/10.1002/bit.260440411).
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, n. 105, p. 149-158, Oct. 2011. DOI: [0.1007/s11240-010-9863-9](https://doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9).
- XU, L.; WEATHERS, P. J.; XUE-RONG, X.; LIU, C. -Z. Microalgal bioreactors: challenges and opportunities. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 178-189, July 2009. DOI: [10.1002/elsc.200800111](https://doi.org/10.1002/elsc.200800111).

YADAV, M. K.; GAUR, A. K.; GARG, G. K. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 153-156, 2003.

DOI: [10.1023/A:1022236920605](https://doi.org/10.1023/A:1022236920605).

YOUNG, R. E.; HALE, A.; CAMPER, N. D.; KEESE, R. J.; ADELBERG, J. W. Approaching mechanization of plant micropropagation. **Transactions of American Society of Agricultural Engineers**, v. 34, n. 1, p. 328-333, 1991. DOI: [10.13031/2013.31666](https://doi.org/10.13031/2013.31666).

ZHANG, M.; ZHAO, D.; MA, Z.; LI, X.; XIAO, Y. Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **Horticulture Science**, n. 44, p. 757-763, June 2009. DOI: [10.21273/HORTSCI.44.3.757](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.3.757).

ZIV, M.; ARIEL, T. Bud proliferation and plant regeneration in liquid-culture *Philodendron* treated with ancymidol and paclobutrazol. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 10, p. 53-57, 1991.

DOI: [10.1007/BF02279311](https://doi.org/10.1007/BF02279311).

ZIV, M.; RONEN, G.; RAVIV, M. Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for large-scale micropropagation of plants. **In vitro Cell Developmental Biology – Plant**, v. 34, p. 152-158, Apr. 1998. DOI: [10.1007/BF02822781](https://doi.org/10.1007/BF02822781).

Glossário

Ácido indolacético: hormônio vegetal; foi a primeira auxina natural identificada.

Ácido indolbutírico: substância sintética; apresenta na planta efeitos característicos de auxina.

Ácido naftalenoacético: substância sintética; apresenta na planta efeitos característicos de auxina.

Aclimatização: processo de adaptação gradual da plântula do cultivo in vitro para o cultivo ex vitro.

Ágar: substância gelificadora utilizada no preparo de meio de cultura; é extraída de algas marinhas.

Ancymidol: substância inibidora da síntese de ácido giberélico.

Antibiótico: substância que mata ou inibe seletivamente o crescimento de outros organismos, sobretudo os microrganismos.

Antiespumante: substância que impede a formação de espuma em uma solução aquosa sob agitação.

Ar artificial: mistura de oxigênio, nitrogênio e gás carbônico, em concentrações semelhantes às daquelas do ar atmosférico.

Assepsia: tratamento que visa eliminar a presença de microrganismos num determinado local ou material.

Autoclavagem: esterilização por vapor d'água à temperatura de 121 °C e pressão de $1,05 \times 10^5$ KPa, por períodos de 10 a 30 minutos, dependendo do material.

Automação: processo de cultivo in vitro no qual algumas operações são conduzidas por um sistema elétrico ou eletrônico de controle, sem interferência externa.

Auxina: classe de hormônios vegetais e reguladores de crescimento que induzem o alongamento e a divisão celular e/ou outros efeitos fisiológicos relacionados aos do ácido 3-indolilacético (AIA).

Biofábrica: no contexto do presente trabalho, é a empresa que produz e comercializa mudas de plantas produzidas em condições especiais nos laboratórios de cultivo in vitro.

Biorreator: no contexto do presente trabalho, é um equipamento para cultivo in vitro com algum grau de automação, sob imersão temporária ou permanente de células, gemas, embriões ou qualquer tipo de propágulo vegetal, para diferentes fins, incluindo a micropropagação.

Biorreator de imersão temporária: tipo de biorreator no qual o cultivo é feito em um compartimento, enquanto o meio de cultura fica armazenado em outro. De tempos em tempos, de acordo com a programação desejada, o meio de cultura é transferido para o compartimento em que se encontra o material em cultivo, permanecendo aí pelo tempo desejado, normalmente alguns minutos a cada 1 a 12 horas, retornando em seguida ao compartimento de armazenamento de meio.

Biorreator Rita (*réceptif à immersion temporaire automatique*): modelo de biorreator desenvolvido pelo Cirad (Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), na França.

Bulbos: são os caules subterrâneos reduzidos e achatados. O caule do tipo bulbo geralmente apresenta folhas modificadas e sem clorofila, denominadas catafilos, podendo ser do tipo tunicado (disco pouco desenvolvido com catafilos internos suculentos e externos secos), escamoso (disco pouco desenvolvido com catafilos espessos) e sólido ou corno (disco bastante desenvolvido com catafilos membranáceos).

Calo: crescimento celular desorganizado, ou seja, fora dos padrões de crescimento e desenvolvimento de um órgão, como raiz, gema ou embrião, em função dos vários fatores presentes no meio de cultura.

Calo embriogênico: calo constituído de células embriogênicas, que se forma normalmente após o crescimento de calo primário.

Capela de fluxo laminar: equipamento que produz um fluxo de ar laminar estéril. A direção do fluxo do ar pode ser horizontal ou vertical.

Carvão ativado: carvão vegetal triturado que foi tratado com ácido e base, a fim de substituir os íons nele adsorvidos por radicais H^+ ou OH^- .

Citocinina: classe de hormônio vegetal ou regulador de crescimento, que induz a divisão celular, modifica a dominância apical, promove o crescimento de gemas laterais, retarda a senescência foliar, regula o crescimento de caules e raízes, promove o desenvolvimento de cloroplastos e controla a morfogênese in vitro, entre outros efeitos fisiológicos semelhantes à zeatina.

Condição asséptica: ausência de microrganismos, tais como fungos, algas e bactérias.

Contaminação microbiológica: presença de microrganismos na superfície ou na parte interna do explante. Neste último caso, é chamado de contaminação endógena ou endofítica.

Cormos: estrutura de reprodução de certas espécies, como palma-de-santa-rita e açafraão.

Cultivo autotrófico: cultivo no qual uma planta depende totalmente da luz para crescimento e desenvolvimento.

Cultivo em camada fina: cultivo sob camada fina de meio líquido, com menos de 1 cm de profundidade, a fim de minimizar a anaerobiose.

Cultura de tecidos de plantas: processo de cultivo in vitro de segmentos ou plantas em meio de cultura apropriado, sob condições assépticas e em ambiente controlado, sobretudo no que diz respeito à iluminação e temperatura.

Cultivo in vitro: cultivo em vidro ou qualquer frasco, sob condições assépticas, ou seja, livre de contaminantes superficiais e sob condições ambientais controladas.

Cultura semissólida: cultura feita em meio de cultura gelificado.

Densidade de cultivo: quantidade de explante por volume de meio.

Densidade de inóculo: quantidade de explante no início do cultivo, por volume de meio.

Desinfestação: processo de eliminação de microrganismos na superfície da fonte de explante, utilizando soluções desinfestantes, tais como álcool etílico e hipoclorito de sódio.

Distúrbios metabólicos: qualquer alteração no metabolismo da planta em decorrência de uma situação de estresse, como, por exemplo, estresse hídrico, nutricional, ataque de pragas e doenças, entre outros.

Dominância apical: dominância exercida pela gema apical de um broto ortotrópico ou galho sobre as gemas laterais, impedindo o seu desenvolvimento.

Embrião somático: embrião derivado de células somáticas, seguindo os padrões de desenvolvimento do embrião zigótico.

Embriogênese somática: processo de formação de embrião a partir de células somáticas.

Encapsulamento de embrião: envolvimento do embrião com uma cápsula gelatinosa suficientemente endurecida de tal forma a conferir a ele uma certa proteção.

Estado fisiológico: característica metabólica do explante no momento em que é excisado, que reflete as características metabólicas da planta matriz.

Etileno (C₂H₄): hormônio vegetal produzido em quase todas as partes da planta, das quais as regiões meristemáticas e a região dos nós são as mais ativas na sua biossíntese. Está envolvido, entre outros processos, na senescência, na abscisão foliar e no amadurecimento de frutos.

Excisão: remoção, por meio de cortes, de parte da planta ou órgão.

Explante: segmento de tecido ou órgão vegetal retirado do seu sítio natural e utilizado para iniciar uma cultura in vitro.

Ex vitro: literalmente “fora do vidro” (do latim). Termo normalmente utilizado para contrastar com processos efetuados in vitro (dentro do vidro).

Fase de estabelecimento: fase inicial do cultivo in vitro de explantes em meio de cultura apropriado, que dura alguns dias ou semanas e resulta na sua sobrevivência e início de crescimento.

Fermentador: equipamento utilizado para o cultivo de fungos e bactérias em meio líquido.

Filtro de ar: filtro constituído por membrana com poros suficientemente pequenos que impedem a passagem de microrganismos, mas permitem a passagem do ar.

Filtro de óleo: aparato que permite a passagem do ar, mas impede a passagem de qualquer tipo de substância oleaginosa.

Fito-hormônio: substância orgânica produzida pela planta que, em pequenas concentrações, promove, inibe ou modifica os processos fisiológicos, geralmente em locais diferentes daqueles onde foi produzido.

Fluxômetro: pequeno aparato que mede o fluxo de ar num sistema.

Fonte de explante: qualquer órgão ou partes de uma planta que é utilizada para retirada de explantes.

Fotoperíodo: duração diária do período de cultivo na presença de luz.

Gelificação: processo de formação de gel. Por sua vez, o gel é um tipo de suspensão coloidal, onde um sólido se encontra disperso em um líquido, formando uma malha permanente, que lhe confere alto grau de viscosidade.

Gemas nodais: gemas presentes nas axilas das folhas.

Giberelina: hormônio vegetal pertencente à classe de ácidos diterpenoides tetracíclicos, constituídos de cinco unidades de isopreno. As giberelinas estão envolvidas com a estimulação de divisão e/ou alongamento celular, entre outros processos.

Hiper-hidratação dos tecidos: hidratação excessiva dos tecidos do explante ou da planta.

Hiper-hidricidade: desordens morfológicas e fisiológicas que podem ocorrer em plantas micropropagadas, caracterizadas pela hiper-hidratação dos tecidos e inibição da síntese de celulose e lignina, levando à vitrificação. As plantas com essa anormalidade apresentam hipertrofia do parênquima lacunoso, reduzido número de células do parênquima paliçádico, mesófilo com grandes espaços intercelulares, entre outros.

Hipoclorito: substância à base de cloro, com características esterilizantes, devido a suas propriedades oxidativas.

Imersão permanente: cultivo no qual os explantes permanecem imersos no meio de cultura o tempo todo.

Imersão temporária: cultivo no qual os explantes são imersos no meio de cultura de tempos em tempos (por exemplo, 1 minuto a cada 3 horas), sempre de forma automatizada.

Indexação: processo de detecção de patógenos em plantas ou culturas, visando à identificação de plantas saudáveis.

Inoculação: ato de colocar um explante em meio nutritivo, no qual será cultivado.

Inóculo: aquilo que se inocula; em plantas, o mesmo que explante.

In vitro: literalmente “no vidro” (do latim). Termo aplicado para designar crescimento de células, tecidos ou órgãos vegetais em meio de cultura, em diferentes tipos de frascos, sob condições assépticas.

Lag phase: fase de crescimento inicial durante a qual o número de células permanece relativamente constante. Nessa fase, o explante, recém-inoculado em meio fresco, adapta-se ao novo ambiente e se prepara para entrar em divisão celular.

Lâmpada de LED ou do tipo LED (*light emission diodes*): tipo de luz emitida por diodo, composto de cristal semicondutor de silício ou germânio. Geralmente, as lâmpadas do tipo LED consomem menos energia, esquentam menos e têm maior durabilidade que as lâmpadas fluorescentes.

Lavador de ar: pequeno aparato no qual o ar é borbulhado em água para que partículas presentes no ar possam ficar retidas na água.

Meio de cultura: substância líquida ou gelatinosa utilizada para cultivo do explante. Contém todos os nutrientes e reguladores de crescimento necessários ao seu crescimento e desenvolvimento.

Meio de cultura gelificado: meio de cultura contendo ágar ou qualquer outra substância que induza a gelificação do meio.

Meio nutritivo: o mesmo que meio de cultura.

Micorriza: fungo capaz de colonizar as raízes de uma planta e estabelecer com ela uma associação mutualística do tipo simbiótica. O fungo contribui para aumentar a superfície radicular da planta e, com isso, aumentar a absorção de água e nutrientes enquanto a planta fornece fotoassimilados para o seu crescimento.

Micropropagação: produção de mudas ou qualquer material propagativo por meio da cultura de tecidos ou cultivo in vitro.

Microtubérculo: pequeno tubérculo produzido in vitro sob condições especiais, que estimulam a formação deste tipo de material propagativo em grande quantidade, em determinadas espécies, como a batata (*Solanum tuberosum*).

Morfogênese: processo de formação de novos órgãos e seus arranjos durante o ciclo de vida que resulta nas características de tamanho, forma e estrutura de uma planta.

Multibrotos: brotos formados em decorrência do cultivo in vitro na presença de reguladores de crescimento ou fito-hormônios, principalmente de citocinina.

Multigemas: explantes que apresentam múltiplas gemas formadas em decorrência do cultivo in vitro, na presença de reguladores de crescimento ou fito-hormônios, principalmente de citocinina.

Nutrientes minerais: substâncias inorgânicas requeridas pelas plantas. São classificados em macro e micronutrientes, de acordo com a concentração exigida.

Nutrientes orgânicos: substâncias orgânicas presentes no meio de cultura e que são essenciais ou contribuem para o crescimento do explante em cultivo, tais como vitaminas e açúcares.

Paclobutrazol: substância inibidora da síntese de ácido giberélico.

Phytigel™: agente gelificante extraído da bactéria *Sphingomonas elodea* e utilizado para gelificação de meio de cultura.

Propágulo: estrutura usada para propagação ou multiplicação vegetativa de uma planta. O mesmo que explante ou inóculo quando esses regeneram um indivíduo completo.

Recalcitrância: característica inerente a um determinado explante em não responder a determinado estímulo quando em cultivo in vitro, por exemplo, indução de formação de raiz na presença de uma auxina.

Segmento nodal: segmento do caule com, pelo menos, uma gema axilar.

Semente sintética: embrião somático que passou pelo processo de encapsulamento, capaz de dar origem a uma planta equilibrada, ou seja, com raiz, caule e folha, após o processo de germinação.

Sistema heterotrófico: sistema no qual uma planta depende da presença de substâncias orgânicas, principalmente açúcares, para crescimento e desenvolvimento.

Sistema mixotrófico: sistema no qual uma planta se nutre de modo autotrófico e heterotrófico.

Substância gelificante: substância capaz de induzir a gelificação do meio de cultura.

Substância reguladora de crescimento: substância sintética que, quando aplicada à planta em quantidades diminutas, estimula, inibe ou modifica o crescimento ou o desenvolvimento, com efeitos semelhantes aos dos fito-hormônios.

Substrato: suporte físico utilizado para cultivo de plantas.

Temporizador: aparelho utilizado para ligar e desligar outros aparelhos, tendo como base a programação em intervalos de minutos, horas e dias.

Ultrafiltração: processo de filtração por ultrafiltros.

Ultrafiltros: filtros com poros suficientemente pequenos para impedir a passagem de partículas ultrafinas, da ordem de micra de diâmetro ou menos. Por exemplo, a filtração por osmose reversa impede a passagem de partículas dissolvidas em água e constitui um tipo extremo de ultrafiltração.

Válvula solenoide: sistema de abre-fecha comandado pela corrente elétrica.

Variação epigenética: variação fenotípica observada nas mudas produzidas, mas que não tem origem em alterações no genoma da planta.

Variação genética: variação fenotípica que tem origem em alterações no genoma da planta.

Variação fisiológica: variação devido a fatores fisiológicos. Essas variações tendem a desaparecer caso a planta seja cultivada em condições favoráveis ao crescimento.

Variação somaclonal: variação genética ou epigenética observada nas mudas clonais.

Vidro sinterizado: frasco, disco ou qualquer utensílio feito a partir de pequenas esferas de vidro soldadas entre si pelo efeito de alta temperatura, formando poros com tamanhos proporcionais ao diâmetro das esferas utilizadas.

Viscosidade: característica de qualquer mistura entre substâncias que resulta na redução da sua fluidez.

Anexo 1 – Carta de concessão e descrição da patente



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0004185-8

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0004185-8

(22) Data do Depósito: 28/08/2000

(43) Data da Publicação do Pedido: 24/04/2001

(51) Classificação Internacional: C12M 3/00; C12M 1/04; C12M 1/12; C12M 1/24; C12M 1/36; A01H 4/00; C12N 5/02; C12R 1/91; C12R 1/00

(54) Título: SISTEMAS DE BIORRATORES PARA O CULTIVO DE CÉLULAS, TECIDOS OU ÓRGÃOS VEGETAIS OU ANIMAIS OU DE CÉLULAS DE MICROORGANISMOS POR IMERSÃO TEMPORÁRIA OU CONTÍNUA UTILIZANDO FONTE DE PRESSÃO POSITIVA OU NEGATIVA

(73) Titular: EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Endereço: Parque Estação Biológica-PqEB - Av. W/3 Norte (Final), Brasília, Distrito Federal, Brasil (BR/DF), CEP: 70770-901.

(72) Inventor: JOÃO BATISTA TEXEIRA; LUIS PEDRO BARRUETO CID

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 12/01/2016, observadas as condições legais.

Expedida em: 12 de Janeiro de 2016.

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patentes



**SISTEMA DE BIORREADORES PARA O CULTIVO DE CÉLULAS, TECIDOS
OU ÓRGÃOS VEGETAIS OU ANIMAIS OU DE CÉLULAS DE
MICROORGANISMOS POR IMERSÃO TEMPORÁRIA OU CONTÍNUA
UTILIZANDO FONTE DE PRESSÃO POSITIVA OU NEGATIVA**

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um sistema para cultivo de células, órgãos e tecidos vegetais ou animais ou de células de microrganismos, sob regime de imersão temporária (intermitente) ou imersão contínua (permanente), com possibilidade de borbulhamento temporário ou contínuo.

10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Biorreatores são equipamentos amplamente utilizados para produção industrial de metabólitos de origem microbiana, animal e vegetal. Recentemente, os biorreatores começaram a ser utilizados para cultivo de células, tecidos, órgãos e plântulas para produção de mudas em larga escala.

15 O uso de biorreatores para propagação vegetal foi primeiramente relatado por Takayama & Misawa (Takayama, S. & Misawa, M. 1981. "Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture". Plant & Cell Physiol. 22(3):461-467) para propagação de begônia. Esta técnica foi adaptada para uma série de outras espécies vegetais (Akita, M & Takayama, S. 1994. "Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control". Plant Cell Rep. 13:184-187; Noriega, C. & Söndahl M.R. 1993. "Arabic coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. Biotechnologie ASIC, 15° Colloque, Montpellier).

Os biorreatores são aplicados à produção de embriões somáticos (Taurus, T.E.; Lulsdorf, M.M.; Kikcio & Dunstan, D.I. 1992. "Bioreactor culture of *Picea glauca- engelmannii* (interior spruce) somatic embryos. Growth parameters". Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:46-51; Denchev, P.D.; Kuklin, A.I. & Scragg, A.H. 1992. "Somatic embryo production In bioreactors. J. Biotechnol. 26:99-109) e para produção de mudas ou semente sintética (Attree, S.M.; Pomeroy, M.K. & Fowke, L.C. 1994. "Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss.) sunthetic seeds In a
25
30 bioreactor". Plant Cell Rep. 13:601-606).

A constituição básica dos biorreatores usados para cultura de embrião e hastes

2 /17

caulinares é fundamentalmente a mesma dos equipamentos utilizados para cultivo de fungos, bactérias, células animais e células vegetais (Takayama, S. & Akita, M. 1994. "The types of bioreactors used for shoots and embryos". Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39:147-156).

5 Basicamente, os biorreatores tradicionais apresentam os seguintes componentes: frasco de cultivo, motor elétrico ligado a um eixo que se estende até o interior do frasco, bomba compressora de ar, sensores de temperatura, pH, oxigênio, etc.

O frasco de cultivo geralmente é desenhado de tal forma a permitir uma ótima aeração do meio bem como uma homogeneização satisfatória com um mínimo de dano
10 mecânico do material em cultivo. Os frascos podem ser feitos de vidro, aço inoxidável, policarbonato, polipropileno ou qualquer outro material que suporte a autoclavagem a uma temperatura de 121 °C durante 15 a 30 minutos. Frequentemente, o frasco de cultivo apresenta um envoltório metálico em forma de jaqueta, por onde circula água com temperatura pré determinada, para controle da temperatura de cultivo.

15 A homogeneização do meio de cultura e aeração do material de cultivo são feitas de diversas formas, sendo mais comum a injeção de um fluxo de ar a uma determinada pressão combinada com o movimento de uma hélice no interior do frasco de cultivo.

Visando sua esterilização, o ar é forçado a passar através de uma membrana com poros de 0,22 a 0,44 micra de diâmetro.

20 O tamanho do frasco de cultivo normalmente varia entre 1 e 20 litros, embora volumes menores como 250 e 500 ml ou maiores, 20 litros ou mais já tenham sido utilizados. Entretanto, a maioria dos frascos utilizados está na faixa de 1 a 4 litros.

Existem, já relatados alguns frascos para cultura, ou processos de cultivo de plantas, mas pouca informação é encontrada sobre equipamentos completos para esse fim.

25 A patente GB 2 301 374 descreve um recipiente para cultura de tecidos compreendendo um tubo cilíndrico transparente com tampa de rosca, contendo um tubo lateral que permite recarga ou troca do meio líquido, com pequena possibilidade de contaminação. O tubo lateral está conectado ao cilindro principal por dois orifícios, que permitem a entrada ou saída de ar, decorrente da colocação ou retirada do meio que é feita
30 com uma seringa. A manipulação do meio de cultura neste sistema, embora seja feita sem necessariamente mexer com os explantes não é tão simples e segura, uma vez que envolve várias conexões.

3 /17

A contaminação microbiana é um dos maiores problemas no uso de biorreatores segundo Manfredini et al. (Manfredini, R. ; Saporiti, L.G. & Cavallera, V citados por Takayama & Akita (Takayama, S. & Akita, M. 1994. "The types of bioreactors used for shoots and embryos". Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39:147-156).

5 Os fatores que devem ser levados em consideração para prevenir a presença de contaminantes tipo bactéria, fungos e leveduras são: tipos de materiais utilizados, válvulas e anéis de vedação, filtragem adequada do ar, facilidade de carga e descarga e de troca do meio de cultura. Desta forma, na construção de um equipamento, principalmente no que se refere ao tamanho, conexão entre as partes e manuseabilidade são fundamentais para
10 minimizar os riscos de contaminação microbiana.

Vários tipos de biorreatores têm sido desenvolvidos e utilizados ou têm potencial de uso em cultivo de plantas e embriões. Estes biorreatores são classificados pelo tipo de agitação e construção do frasco. (Takayama, S. & Akita, M. 1994. "The types of bioreactors used for shoots and embryos". Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39:147-
15 156).

Biorreatores do tipo aerador agitador ("aeration agitation bioreactor") são equipados com diferentes tipos de hélices e borbulhadores de ar e são basicamente utilizados para cultivo de células e embriões somáticos (Kessel, R.H.J. & Carr, A.H. 1972. "The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*)
20 tissue". J. Exp. Bot. 23:996-1007). A grande desvantagem deste modelo de biorreator é que, para haver uma boa homogeneização do meio, é necessário que a hélice gire em velocidades relativamente elevadas, o que, regra geral, causa dano mecânico acentuado ao material em cultivo.

Em outro tipo, o de tambor rotatório ("roller drum bioreactor"), o frasco de cultivo
25 gira suavemente em círculos sobre dois eixos. Neste tipo de biorreator, o dano mecânico é mínimo e é adequado ao cultivo de embriões e plantas. Entretanto, o nível de oxigenação do meio pode ficar prejudicado (Tanaka, H.; Nishijima, F. Suwa, M. & Iwamoto, T. 1983. "Totating drum fermentor for plant cell suspension cultures". Biotechnol. Bioeng. 25:2359-2370).

30 O biorreator com filtro rotatório ("spin filter bioreactor") apresenta um filtro conectado a um eixo, por onde o meio de cultura é descarregado (Styer, D.J. 1985. "Bioreactor technology for plant propagation. In: Henke, R.R. & Hughes, K.W. (Eds.).

Tissue Culture In Forestry and Agriculture (pp. 117-130). Plenum Press, New York.) Este elemento é responsável igualmente pela homogeneização, bem como pela aeração do material em cultivo. Este tipo de biorreator funciona satisfatoriamente bem para propagação via embriogênese somática.

5 O biorreator com borbulhamento (“air driven bioreactor”) é de constituição muito simples e a homogeneização do meio, bem como a aeração são feitas pelo borbulhamento de ar no fundo do frasco.

Os biorreatores de aeração simples e coluna de bolha (“bubble column bioreactor”) são diferenciados pela relação altura/diâmetro. Quando de 1 a 2 são definidos
10 como biorreatores de aeração simples e se a relação é de 3 ou acima, são considerados do tipo coluna de bolha. Estes modelos apresentam bons resultados no cultivo de hastes caulinares, bulbos, cormos e tubérculos (Takayama, S. & Misawa, M. 1981. “Mass propagation of *Begonia x hiemalis*) plantlets by shake culture”. Plant & Cell Physiol. 22(3):461-467).

15 No biorreator do tipo levantamento de ar (“air lift bioreactor”) o meio de cultura é movido em decorrência da aeração que é feita de baixo para cima dentro de um tubo. As bolhas de ar se movem de baixo para cima gerando um fluxo de meio na mesma direção. Este modelo apresenta bons resultados, uma vez que há uma boa aeração e homogeneização do meio de cultura e pouco dano mecânico ao material em cultivo (Park,
20 J.M. ; Hu, W-S. & Staba, E.J. 1989. “Cultivation of *Artemisia annua* L. plantlets in a bioreactor containing a single carbon and a single nitrogen source”. Biotechnol. and Bioeng. 34:1209-1213).

O biorreator do tipo fase gasosa (“gaseous phase bioreactor”) é equipado com um suporte perfurado sobre o qual o material em cultivo é colocado. O meio de cultura é
25 pulverizado sobre o material em cultivo. O meio é drenado pela base de suporte e novamente bombeado e pulverizado sobre o material a intervalos pré estabelecidos (Ushiyama et al., citados por (Takayama, S. & Akita, M. 1994. “The types of bioreactors used for shoots and embryos”. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39:147-156). Este tipo de biorreator apresenta excelentes resultados no cultivo de células, tecidos e órgãos porque
30 não há dano mecânico, nem agitação via borbulhamento. O inconveniente deste modelo é a não renovação do ar interno, o que pode ser contornado com a inclusão de um sistema de aeração via injeção de ar estéril.

No biorreator de aeração por membrana porosa ao oxigênio (“oxygen permeable membrane aerator bioreactor”), o frasco de cultura contém uma canalização fina, em espiral, feita de material poroso ao oxigênio, que pode ser teflon, silicone, policarbonato ou polipropileno, através do qual o oxigênio passa para o meio de cultura. Este modelo de biorreator não apresenta dano mecânico, porque não há nenhum tipo de agitação, entretanto, a homogeneização do meio de cultura fica prejudicado (Luttman, R.; Florek, P. & Preil, W. 1994. “Silicone-tubing aerated bioreactors for somatic embryo production” Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39(2):157-170).

No biorreator do tipo sobre-aeração (“overlay aeration bioreactor”) a aeração é feita soprando o ar estéril sobre o meio de cultura. Eventualmente este tipo de aeração pode ser combinada com agitação suave do meio (Ishibashi, T.; Odawara, U.; Fujiwara, K. & Ookuma, M. 1987. citado por Takayama & Akita (Takayama, S. & Akita, M. 1994. “The types of bioreactors used for shoots and embryos”. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39:147-156). Este modelo apresenta deficiência na aeração, o que pode comprometer o crescimento de células e tecidos.

Em todos os modelos descritos anteriormente, com exceção daquele que utiliza um sistema de pulverização de meio, o material em cultivo permanece imerso continuamente no meio de cultura. Esta imersão contínua no meio de cultura causa problemas de hiperhidratação em tecidos, órgãos e plântulas. Dependendo da espécie e do tipo de meio utilizado, a hiperhidratação dos tecidos pode causar distúrbios fisiológicos sérios, que irão afetar o crescimento e desenvolvimento do material em cultivo.

Visando minimizar esse problema Harris & Mason (Harris, R.E. & Mason, E.B.B. 1983. “Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid medium. Can. J. Plant Sci. 63:311-316) descreveram o princípio da imersão temporária para cultivo de fragmentos vegetais relativamente grandes utilizando máquinas para cultivo de explantes de uva em meio líquido, em frascos tipo Erlenmeyer. Durante o cultivo, o frasco era movimentado de tal forma que em determinada posição o explante se encontrava submerso e em outra, não submerso. O estoque inicial de explantes era obtido através do cultivo por 28 dias em meio com agar. Após 90 dias de cultivo em meio de imersão temporária, a produção de brotos foi sete vezes superior quando comparada à obtida pelo mesmo período em meio com agar. Dessa forma os autores demonstraram também as vantagens do cultivo em meio líquido sobre o meio sólido (com agar).

6 /17

Em 1985, Tisserat & Vandercook (Tisserat, B.; Vandercook, C.E. 1985. "Development of an automated plant culture system". Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 5:107-117), buscando automatizar o sistema, desenvolveram um sistema de cultivo em imersão temporária que consistia de uma grande câmara de cultura, a qual era periodicamente cheia de meio de cultura. Embora, o controle da troca gasosa e do pH fossem insatisfatórios, este método de cultivo por imersão temporária mostrou ser muito superior aos cultivos em agar.

Posteriormente, foi desenvolvido um modelo de biorreator chamado de imersão temporária (Alvard, D.; Cote, F. & Teisson, C. 1993. "Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32:55-60, 1993; Teisson, C.; Alvard, D.; Berthouly, M.; Cote, F.; Escalant, J.V. & Etienne, H. 1995. "In vitro culture by temporary immersion: a new device. Plantations 2(5):32-33), onde o meio de cultura permanece em contacto com o explante por um período pré determinado. Este modelo é constituído por um frasco de dois compartimentos: um superior e um inferior conectados entre si. O meio de cultura é colocado no compartimento inferior enquanto que o material a ser cultivado, no superior. O meio de cultura passa do compartimento inferior para o superior pela injeção de ar no compartimento inferior. Quando todo o meio passa para o compartimento superior, ocorre borbulhamento e aeração do meio em contato com o material em cultivo. O ar é expelido através de um orifício na tampa do compartimento superior. Após um período pré estabelecido, a pressão do ar no compartimento inferior é aliviada, o que, por gravidade, faz com que o meio retorne ao compartimento inferior, permanecendo aí até que o ciclo recomece. Neste sistema, a troca de meio, atividade inerente a toda cultura, é bastante trabalhosa e há risco de contaminação. Outras limitações do sistema são o volume pre-determinado de meio e do espaço determinado ao crescimento das células. Apesar disto, esse modelo é o tipo mais utilizado comercialmente até o momento.

Uma modificação mais recente do modelo de biorreator de imersão temporária foi feito por Lorenzo et al (Lorenzo, J.C.; Gonzalez, B.L.; Escalona, M.; Teisson, C. ; Espinosa, P. & Borroto, C. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54:197-200) para micropropagação de gemas de cana de açúcar. Este sistema utiliza dois frascos, sendo um para cultivo do material vegetal e outro para estocagem do meio de cultura. O meio de cultura é transferido de um frasco para o outro por meio de um vácuo de 250 mm de Hg, o

que permite a automatização do sistema. A limitação porém, consiste no fato de não apresentar controle da aeração do meio, não sendo possível ajustar as condições de cultivo às células que necessitem de composições de ar específica.

A técnica da imersão temporária é amplamente utilizada no cultivo de diferentes células e ou tecidos. Os ajustes de tempo de imersão e aeração do meio devem ser feitas para cada material a ser cultivado. Da mesma forma, o modo como é feita a movimentação do meio deve ser a mais eficiente ao sistema como um todo. Quando se utiliza ar comprimido ou ar artificial para mover o sistema, deve-se considerar a composição dos gases, que pode influenciar o resultado final. É sabido que muitas células requerem condições específicas, como por exemplo, atmosfera rica em CO₂, para se desenvolverem. Em outros casos, a presença de determinados gases no ambiente de cultivo melhora a produção de células ou sua qualidade.

A patente EP 574 283 refere-se a um processo para formação de tubérculos de batata, onde fica destacada a influência da composição gasosa. Neste processo, o cultivo das plantas é feito num dispositivo que consiste de um primeiro recipiente, fechado e estéril, contendo o meio de cultura, o qual está contido num segundo recipiente, maior, deixando um espaço entre os dois frascos, por onde é feita a circulação de água que visa controlar a temperatura. A característica definida como aperfeiçoamento é o fato do dispositivo contar com meios de ventilação forçada de ar, contendo de 1 a 10% de CO₂, feita pela parte superior do primeiro frasco, o que resulta em uma taxa mais elevada de crescimento da planta e um aumento do teor protéico do tubérculo. A desvantagem deste dispositivo de cultura reside na pouca praticidade de manuseio tanto do material cultivado, como do meio de cultura, especialmente se for utilizado meio líquido.

O sistema ora proposto soluciona de uma única vez, vários problemas e entraves freqüentemente observados em cultura de células e tecidos. Trata-se de um sistema prático e versátil, que permite o total controle das condições de cultivo e, portanto, ajuste a diferentes necessidades. Essa invenção pode trabalhar em imersão temporária ou contínua; permite o controle de temperatura, pH, luminosidade, volume de meio e a alteração da composição do ar empregado, como também pode utilizar diferentes sistemas para movimentação ou aeração do meio. Além disso, a operação de troca de meio é extremamente simples e praticamente sem risco de contaminação.

SUMARIO DA INVENÇÃO

O objetivo da presente invenção é o de fornecer um sistema de biorreatores versátil e intercambiável, de uma para outra forma de imersão temporária e contínua, no cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos utilizando tanto fonte de pressão positiva como negativa imersão contínua e tendo provisão para borbulhamento temporário ou contínuo.

Uma das concretizações relaciona-se com um sistema de biorreatores para o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos por imersão temporária utilizando fonte de pressão negativa (22) e de ser constituído por pelo menos um par de frascos, sendo um (1, 2 ou 3) para o cultivo e outro (4, 5 ou 6) para o armazenamento do meio de cultura.

Uma segunda concretização diz respeito a um sistema de biorreatores para o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos por imersão temporária utilizando uma fonte (22, 25) de pressão positiva e de ser constituído por pelo menos um par de frascos, sendo um (1, 2 ou 3) para o cultivo e outro (4, 5 ou 6) para o armazenamento do meio de cultura.

Uma terceira concretização se refere a um sistema de biorreatores para o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos por imersão contínua utilizando uma fonte (22) de pressão negativa e de ser constituído por pelo menos um par de frascos de cultivo (1, 2, 3, 4, 5 ou 6) e por um meio (17) de purificação do ar que entra no sistema.

Uma quarta concretização relaciona-se com um sistema de biorreatores para o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos por imersão contínua utilizando uma fonte (22, 25) de pressão positiva e de ser constituído por pelo menos um par de frascos de cultivo (1, 2, 3, 4, 5 ou 6).

Uma quinta concretização diz respeito a um sistema de biorreatores para o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos por imersão contínua utilizando uma fonte (22) de pressão negativa e de ser constituído por pelo menos um par de frascos de cultivo (1, 2, 3, 4, 5 ou 6), sendo simplificado pela eliminação dos meios de restrição (13, 14, 15, 16) para o controle da entrada e/ou saída de ar do sistema.

Uma sexta concretização relaciona-se com um sistema de biorreatores para o cultivo

de células, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos por imersão contínua utilizando uma fonte (22, 25) de pressão positiva e de ser constituído por pelo menos um par de frascos de cultivo (1, 2, 3, 4, 5 ou 6), sendo simplificado pela eliminação dos meios de restrição (13, 14, 15, 16) para o controle da entrada e/ou saída de ar do sistema.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Esquema do sistema de cultivo por imersão temporária utilizando pressão negativa para movimentação do meio líquido.

Figura 2: Esquema do sistema de cultivo por imersão temporária utilizando pressão positiva (compressor de ar) para movimentação do meio líquido.

Figura 3: Esquema do sistema de cultivo por imersão temporária utilizando pressão positiva (tanque de ar comprimido/ar artificial) para movimentação do meio líquido.

Figura 4: Detalhe das alterações decorrentes da modificação do sistema para utilização em imersão contínua, com borbulhamento contínuo ou temporário do meio líquido.

Figura 5: Esquema do sistema para utilização em imersão contínua, empregando pressão negativa para borbulhamento do meio de cultura.

Figura 6: Esquema do sistema para utilização em imersão contínua, empregando pressão positiva para borbulhamento do meio de cultura.

Figura 7: Esquema do sistema para utilização em imersão contínua, empregando pressão positiva (compressor de ar ou tanque de ar comprimido) para borbulhamento do meio de cultura.

Figura 8: Esquema do sistema para utilização em imersão contínua, simplificado empregando pressão negativa para borbulhamento do meio de cultura.

Figura 9: Esquema do sistema para utilização em imersão contínua, simplificado, empregando pressão positiva (compressor de ar) para borbulhamento do meio de cultura.

Figura 10: Esquema do sistema para utilização em imersão contínua, simplificado, empregando pressão positiva (tanque de ar comprimido/ar artificial) para borbulhamento do meio de cultura.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O sistema da presente invenção é muito prático e altamente versátil na medida em

10 / 17

que, mantendo praticamente a mesma estrutura, é possível processar o cultivo de células ou tecidos de vegetais, animais ou microrganismos por imersão temporária ou contínua, utilizando pressão positiva ou negativa para a movimentação do meio de cultura. As alternativas propostas permitem o cultivo aperfeiçoado de células e tecidos por evitar
5 algumas limitações dos equipamentos já conhecidos.

Os meios de transporte de líquido e de ar, de controle de vazão ou de tempo, os sensores e os materiais utilizados nos sistemas de cultivo da presente invenção são selecionados de acordo com a disponibilidade e necessidade de adequação às características das condições gerais e específicas de cultivo de células e tecidos. Mais adiante, são
10 fornecidas as alternativas possíveis.

Como mencionado anteriormente, os modelos de biorreatores de imersão temporária e contínua existentes no estado da técnica apresentam, em termos gerais, as seguintes características:

- a) São equipamentos complexos do ponto de vista de montagem e funcionamento;
- 15 b) São equipamentos que se destinam ao cultivo sob condições de imersão contínua ou imersão temporária, não permitindo versatilidade no seu uso, por ex., transformação de um modelo de imersão contínua para imersão temporária e vice-versa;
- c) São equipamentos de difícil manipulação durante as fases de esterilização, carga,
20 descarga e troca do meio de cultura;

Em resumo, os sistemas da presente invenção apresentam as seguintes características não encontradas nos outros modelos de biorreatores do estado da técnica:

- a) O equipamento pode utilizar diferentes tipos de frascos, que podem variar em tamanho, formato, constituição, tipo de tampa, transparência, etc.;
- 25 b) A montagem do sistema é simples e os componentes (válvulas solenóides, temporizadores, fonte de ar comprimido, filtros de ar, medidor de vazão, conexões metálicas, mangueiras de silicone, etc.) estão disponíveis.
- c) O sistema foi desenhado para comportar quantidade variável de frascos de cultivo. O limite do número de frascos é determinado pela extensão das
30 tubulações bem como pela potência do compressor ou da fonte de ar comprimido;
- d) O sistema pode ser montado em diferentes ambientes de intensidade de luz,

11 / 17

fotoperíodo e temperatura;

- e) O sistema pode ser utilizado para cultivo em regime de imersão temporária ou contínua. No regime de imersão contínua, o equipamento pode funcionar sob regime de borbulhamento contínuo com diferentes fluxos de ar ou sob borbulhamento temporário, cujo período pode ser definido pelo temporizador. Para isto, são necessários pequenos ajustes no equipamento;
- f) O equipamento permite fazer, ainda, uso de uma fonte de ar artificial com dosagens específicas de oxigênio, nitrogênio e gás carbônico.

Na primeira concretização da invenção, mostrada na Figura 1, o sistema é constituído de frascos de cultivo (1,2,3), frascos de armazenamento de meio (4,5,6), filtros de ar, com tamanho de poros igual ou menor que 0,44 micra (7,8,9,10,11,12), válvulas solenóides (13,14,15,16), frascos de borbulhamento com carvão ativo em suspensão aquosa (17,18), temporizadores (19,20), medidor de vazão (21), fonte de pressão negativa (22) e sensores do tipo eletrodo, para monitoramento do meio (27, 28 e 29).

Numa segunda concretização, para utilização de pressão positiva através de compressor de ar, o equipamento recebe algumas modificações como mostra o diagrama da Figura 2. O compressor de ar (22) é conectado a um dispositivo de filtragem de ar (23). Nessa construção, o ar proveniente do dispositivo de filtragem passa pelo medidor de vazão (21) e é borbulhado em frasco contendo suspensão aquosa de carvão ativado (24).

Alternativamente, de acordo com a Figura 3, o sistema utiliza tanque de ar comprimido (22) ou cilindro de ar artificial (25), o equipamento agrega mais uma válvula solenóide (26), que é ligada ao temporizador (19), com a finalidade de regular a entrada de ar no sistema.

As concretizações anteriores referem-se ao funcionamento em modo de imersão temporária. Para o funcionamento em modo de imersão contínua, quer seja com borbulhamento contínuo ou temporário, são necessárias algumas modificações nos sistemas de imersão temporária, mostrados nas Figuras 1 a 3. Na Figura 4 são mostrados os detalhes modificados no sistema para adaptação ao método de cultivo por imersão contínua. A primeira modificação refere-se aos tubos de movimentação de fluidos, ar (composição atmosférica ou modificada) e meio de cultura. Pode ser verificado na Figura 4, imersão contínua, que os tubos com extremidade inferior imersa no meio de cultura têm a função exclusiva de borbulhamento. Dessa forma, a disposição dos tubos (A) e (B) é a mesma para

12 / 17

ambos os sistemas, utilizando pressão positiva e negativa. Deve ser ressaltado que no sistema de imersão temporária, Figuras 1 a 3, a disposição dos tubos (A) e (B) é resultante da necessidade de atender às duas funções, isto é movimentação do meio de cultura e borbulhamento. Uma segunda diferença é o fato de que no sistema de imersão contínua os recipientes 1 a 6 são todos frascos de cultivo, tanto no caso de pressão positiva quanto no de pressão negativa. Assim, o diagrama completo para uso no modo de imersão contínua utilizando pressão negativa fica como o mostrado na Figura 5, e para pressão positiva (compressor de ar) como o mostrado na Figura 6. No caso de se dispor de duas fontes alternativas de pressão positiva, o sistema completo tem a estrutura mostrada na Figura 7.

10 A terceira modificação, quando se utiliza pressão negativa (Figura 5), é a retirada de um dos frascos de borbulhamento, já que a direção do fluxo de ar é única.

A automatização do sistema é feita através de meios de controle atuando na aplicação de pressão positiva ou negativa ao sistema. No presente caso, são providos conjuntos de válvulas solenóides do tipo “aberta e fechada”, acopladas a temporizadores.

15 No entanto, dispositivos equivalentes podem ser utilizados. Na Figura 5, caso do sistema utilizando pressão negativa, as válvulas solenóides 13 e 15 permanecem abertas enquanto que as de número 14 e 16 ficam fechadas. O contrário deve ser observado quando se utiliza pressão positiva, como mostrado nas Figuras 6 e 7, isto é, as válvulas de número 13 e 15 permanecem fechadas e as de número 14 e 16, abertas.

20 Alternativamente, como mostrado na Figura 8 (para uso com pressão negativa), Figura 9 (para uso com compressor de ar) e Figura 10 (provisão de 2 fontes alternativas com tanque de ar comprimido/ cilindro de ar artificial ou compressor de ar), a construção do equipamento de cultivo no modo imersão contínua, com borbulhamento temporário ou contínuo, pode ser simplificado, eliminando as válvulas solenóides 13, 14, 15 e 16 da Figura

25 5.

A tubulação pode ser feita de material flexível ou rígido apropriado, por exemplo, plástico, vidro ou metal, desde que não produza qualquer tipo de contaminação, inclusive gases tóxicos. A tubulação em contato com os frascos deve suportar autoclavagem a cerca de 121 °C por um período de ao redor de 30 minutos, ou outro tipo de esterilização, como por exemplo, por produtos químicos ou radiação.

30

Os frascos devem ser feitos de material apropriado, preferencialmente transparente, como por exemplo, de vidro ou plástico, desde que resistam aos tratamentos de

13 / 17

esterilização acima mencionados.

O frasco de limpeza do ar é provido de meio adequado para garantir a pureza e esterilidade necessárias ao processo. Borbulhamento do ar em suspensão de carvão ativado, filtro de ar de carvão ativado seco ou qualquer outro material que retire partículas sólidas, óleo e substâncias voláteis tóxicas presentes na atmosfera ou no ar borbulhado, são alguns de exemplos de meios de purificação e esterilização do ar que alimentará o sistema.

O temporizador é constituído de dispositivo mecânico, elétrico ou eletrônico, podendo ser automatizado através de microprocessador ou microcomputador.

O tanque de ar artificial pode conter diferentes combinações de oxigênio, nitrogênio e gás carbônico e outros gases, de acordo com a necessidade das células em cultivo. Esta é uma das principais características de flexibilidade do sistema da presente invenção que utiliza a pressão positiva, seja no cultivo por imersão temporária, seja no de imersão contínua. O cultivo de células ou tecidos de batata é um dos exemplos em que a modificação da composição do ar a ser usado no sistema, pelo aumento da proporção de teor de CO₂, resulta em propriedades melhoradas nos tubérculos produzidos (ver EP 574 283).

O biorreator deve ser instalado em ambiente apropriado, sob condições de luz e temperatura total ou parcialmente controladas, tais como câmaras de fluxo laminar, câmaras de crescimento ou mesmo em casa de vegetação e viveiros (telados).

Na extremidade da tubulação (B) dos frascos de cultivo, existe um meio de restrição tal como malha feita de algodão, fibra sintética ou metal, suficientemente fina para reter a passagem de agregados celulares, quando o meio é bombeado do frasco de cultivo para o frasco de armazenamento de meio, quando em funcionamento no modo de imersão temporária.

Em um modo preferido da invenção, sensores podem ser conectados aos frascos de armazenamento de meio (27, 28 e 29 – Figuras 1, 2 e 3, em imersão temporária) ou frasco de cultivo (27, 28 e 29 – Figuras 4 a 10, em imersão permanente) para monitorar a temperatura, o potencial hidrogeniônico do meio (pH), níveis de oxigênio dissolvido, níveis de potássio, sódio e outros componentes que podem estar presentes no meio de cultura. A determinação do gás carbônico pode ser feita através de sensores do tipo eletrodos instalados em frascos acoplados na saída de ar do sistema, já que este tipo de dispositivo não pode ser submetido a alta temperatura, durante o procedimento de esterilização.

Os modelos esquematizados nas Figuras 1 a 10 apresentam seis frascos conectados em paralelo à fonte de pressão negativa ou positiva. Entretanto, dependendo da necessidade, o número de frascos é de no mínimo dois e pode ser aumentado para algumas dezenas ou mais, desde que a fonte de pressão negativa ou positiva seja devidamente ajustada.

A programação do período de imersão/emersão, no sistema de imersão temporária, e do borbulhamento de ar, nos sistemas de imersão temporária ou contínua, é feita de acordo com o tipo de material em cultivo, uma vez que células, embriões, tecidos ou órgãos requerem tempos distintos de períodos de imersão e emersão ou de borbulhamento de ar, bem como diferentes composições de ar.

O funcionamento dos sistemas da presente invenção é detalhado a seguir.

No caso do sistema de cultivo por imersão temporária utilizando pressão negativa (vácuo), como mostrado na Figura 1, o material a ser cultivado é colocado nos frascos 1, 2 e 3 e o meio de cultura nos frascos 4, 5 e 6. Para imersão do material em cultivo, a bomba de vácuo é acionada pelo temporizador (19). A programação do temporizador é função do tipo de material em cultivo. Quando o temporizador está ligado, a bomba de vácuo entra em funcionamento exercendo uma pressão negativa no interior do sistema. O valor do vácuo aplicado deve ser suficientemente alto para permitir a movimentação do meio de cultura entre os recipientes e possibilitar o borbulhamento de ar no frasco de cultivo, mas deve ser suficientemente baixo para impedir danos ou perda do material cultivado. Apropriadamente, o vácuo aplicado fica entre 100 e 300 mm Hg, correspondendo a 660 a 460 mm Hg no interior do sistema. No momento zero, as válvulas solenóides do tipo “duas posições” (abre-fecha) 13 e 15 estão fechadas e as válvulas 14 e 16, também do tipo “duas posições” estão abertas. No momento em que a bomba de vácuo é acionada, o ar começa a ser retirado dos frascos de cultivo. Com a formação de vácuo nesses frascos, ocorre transferência do meio de cultura dos frascos de armazenamento (4, 5 e 6) para os frascos de cultura (1, 2 e 3). O meio permanece nos frascos de cultivo em contato com o material até o momento em que o temporizador (20) for acionado. Quando isto ocorre, as válvulas 13 e 15 (Figura 1) se fecham e as de número 14 e 16 se abrem. Neste instante, o vácuo passa a ser feito nos frascos de armazenamento de meio (4, 5 e 6), o que faz com que o meio de cultura seja sugado dos frascos de cultivo interrompendo a imersão do material em cultivo. Após um período pré determinado, a bomba de vácuo é desligada pela atuação do temporizador 19, o

15 / 17

que interrompe a geração de vácuo pela bomba. Para finalizar, o temporizador 20 permanece ligado por alguns minutos até que o vácuo tenha sido reduzido a zero, ou seja, a pressão interna do sistema seja a atmosférica. Neste momento, o temporizador 20 desliga as válvulas permanecendo assim até que o ciclo recomece. O ar atmosférico entra no sistema por duas vias alternativas, pelos frascos de borbulhamento 17 ou 18. O medidor de vazão 5 conectado ao frasco 17 mede o fluxo de ar que entra no sistema durante o momento em que o meio está sendo transferido do frasco de cultivo para os frascos de armazenamento de meio.

Alternativamente, o sistema de imersão temporária da presente invenção utiliza 10 pressão positiva como mostrado nas Figuras 2 e 3.

No cultivo por imersão temporária com pressão positiva, o procedimento é semelhante ao descrito para cultivo por imersão temporária com pressão negativa como mostrado na Figura 1. A pressão aplicada deve ser controlada para evitar danos ou perda do material que está sendo cultivado. Pressões positivas na faixa de 300 a 500 mm Hg, 15 correspondendo a pressões de 1060 a 1260 mm Hg no interior do sistema, são apropriadas.

Na Figura 2, é mostrado o diagrama do sistema de imersão temporária utilizando compressor de ar e na Figura 3, o diagrama do sistema de imersão temporária utilizando tanque de ar comprimido ou cilindro de ar artificial.

No primeiro caso (Figura 2), o ar é bombeado pelo compressor de ar (22), que entra 20 em funcionamento de acordo com a programação do temporizador 19. O ar passa por um filtro de ar seco (23), para remoção de óleo e partículas sólidas e, em seguida, passa pelo medidor de vazão (21) antes de ser borbulhado no frasco 24. Este frasco contém carvão ativado suspenso em água deionizada, para uma segunda filtragem e umidificação do ar. As válvulas 13 e 15 encontram-se abertas enquanto que as de número 14 e 16 estão 25 fechadas. Com isto, a pressão é exercida nos frascos de armazenamento de meio (4, 5 e 6), o que impele o meio destes frascos para os frascos de cultivo (1, 2 e 3), resultando na imersão do material em cultivo. Quando as válvulas solenóides são acionadas pela ação do temporizador 20, ocorre fechamento das válvulas 13 e 15 e abertura das válvulas 14 e 16, e, com isto, o meio retorna ao frasco de armazenamento, interrompendo o período de imersão 30 do material. Após a transferência completa do meio, o compressor é desligado por ação do temporizador 19 e alguns minutos após, quando a pressão do sistema for a atmosférica, as válvulas solenóides são desligadas pelo temporizador 20, permanecendo assim até que o

ciclo ~~recomeça~~.

No segundo caso (Figura 3), quando se utiliza tanque de ar comprimido ou cilindro de ar artificial como fonte de pressão positiva, a única alteração refere-se à introdução da válvula solenóide (26), com a finalidade de liberar a passagem de ar do tanque (22) ou cilindro (25) para o sistema.

Na concretização da presente invenção relacionada com o cultivo por imersão contínua, com borbulhamento temporário ou contínuo, utilizando bomba de vácuo, como mostrado nas Figuras 4 e 5, o sistema requer alteração do tubo de borbulhamento dos modelos mostrados nas Figuras 1, 2 e 3. Como mostra o diagrama da Figura 4, os frascos de armazenamento de meio passam a ser igualmente frascos de cultivo. A Figura 5 mostra o sistema de biorreatores de imersão temporária convertido para cultivo de imersão contínua utilizando bomba de vácuo. Foi eliminado um frasco de borbulhamento (frasco 18 da Figura 1) já que a direção de fluxo do ar é única. Durante o funcionamento, o vácuo é feito nos frascos 3, 4 e 5, já que as válvulas solenóides 13 e 15 estão abertas e as de número 14 e 16, fechadas. Assim o ar segue o sentido mostrado pelas setas, ocorrendo borbulhamento do meio em todos os frascos. Neste caso, o temporizador (20) permanece desativado. Para funcionamento em modo de borbulhamento temporário basta programar o funcionamento da bomba de vácuo por meio do temporizador 19.

O cultivo por imersão contínua, com borbulhamento temporário ou contínuo, pode ser feito utilizando pressão positiva. A Figura 6 mostra o sistema de biorreatores de imersão temporária convertido para cultivo por imersão contínua utilizando compressor de ar como fonte de pressão positiva. O ar é injetado nos frascos 1, 2 e 3 como mostra o sentido das setas. Com isso há borbulhamento do meio de cultura em todos os frascos. Para que isto aconteça, as válvulas solenóides 13 e 15 devem estar fechadas e as de número 14 e 16, abertas. O borbulhamento contínuo ou temporário vai depender da programação do temporizador 19.

Alternativamente, o sistema de cultivo por imersão contínua, com borbulhamento temporário ou contínuo, pode utilizar tanque de ar comprimido ou cilindro de ar artificial, como fonte de pressão positiva.

A Figura 7 mostra um sistema de biorreatores de imersão temporária convertido para cultivo por imersão contínua utilizando tanque de ar comprimido (22) ou cilindro de ar artificial (25). O sentido do fluxo de ar está representado pelas setas. Desta forma, há

borbulhamento do meio toda vez que a válvula solenóide (26) estiver aberta, cujo controle é feito pelo temporizador 19. Para que o sentido do fluxo de ar seja este, é necessário que as válvulas solenóides 13 e 15 estejam sempre fechadas e as de número 14 e 16, sempre abertas.

5 Em uma concretização adicional da presente invenção, o sistema de cultivo por imersão contínua, com borbulhamento temporário ou contínuo, pode ser simplificado.

Na construção simplificada do sistema de cultivo por imersão contínua, as válvulas solenóides 13, 14, 15 e 16 (presentes nos sistemas das figuras 1 a 7) podem ser eliminadas. Na Figura 8, uma bomba de vácuo é utilizada como fonte de pressão negativa. Na Figura 9,
10 a fonte de pressão positiva é um compressor de ar, e, alternativamente, na Figura 10, um tanque de ar comprimido ou cilindro de ar artificial.

No funcionamento com bomba de vácuo, faz-se o vácuo nos frascos 4, 5 e 6 (ver Figura 8), ocorrendo borbulhamento nestes frascos e também nos frascos 1,2 e 3. O ar que entra no sistema é pré-filtrado pelo frasco de borbulhamento 17. O funcionamento com
15 borbulhamento contínuo ou temporário depende da programação do temporizador 20.

No funcionamento com compressor de ar (ver Figura 9), o funcionamento é semelhante ao descrito quando se usa bomba de vácuo, havendo, no entanto, uma mudança na conexão para permitir a aplicação da pressão positiva.

Quando se utiliza tanque de ar comprimido ou cilindro de ar artificial (Figura 10),
20 semelhante ao sistema mostrado na figura 9, a pressão é positiva. A única alteração é feita pela programação da válvula solenóide 19, que controla o regime de borbulhamento dos frascos, se contínuo ou temporário.

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema de biorreatores para o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos por imersão temporária ou contínua utilizando fonte de pressão positiva ou negativa caracterizado por compreender:
 - (a) pelo menos um par de frascos (1, 2, 3, 4, 5, 6) para o cultivo ou um para o cultivo e outro para armazenamento do meio de cultura;
 - (b) uma fonte de pressão positiva ou negativa (22, 25);
 - (c) filtros de ar (7, 8, 9, 10, 11, 12) com tamanho de poros igual ou menor que 0,44 micra;
 - (d) opcionalmente, meios de restrição (13, 14, 15, 16) para o controle da entrada e/ou saída de ar do sistema;
 - (e) meios (17, 18, 23, 24) de purificação do ar que entra no sistema;
 - (f) opcionalmente, meios (19, 20) de controle de tempo de movimentação de meio e/ou de regulação de aeração, por borbulhamento, do meio de cultura;
 - (g) medidor de vazão (21) para permitir o ajuste da pressão interna do sistema a um valor predeterminado;
 - (h) meios (27, 28, 29) de monitoramento das condições de cultivo;
 - (i) tubos de alimentação (C) ou retirada do ar do sistema e de conexão (A, B) dos frascos (1, 2, 3, 4, 5, 6) de cultivo ou de cultivo e armazenamento do meio de cultura.
2. Sistema de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato dos meios de restrição para o controle da entrada e/ou saída de ar do sistema serem válvulas solenoides.
3. Sistema de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do monitoramento das condições de cultivo ser feito pelo controle da temperatura, do pH do meio, dos níveis de oxigênio, potássio, sódio e componentes presentes no meio de cultura.
4. Sistema de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato dos meios de purificação do ar que entra no sistema serem constituídos de recipientes contendo suspensão aquosa de carvão ativado.
5. Sistema de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do cultivo ser feito por imersão temporária utilizando fonte de pressão negativa (22) e de ser

2 / 3

constituído por pelo menos três pares de frascos, sendo um par (1, 2, 3) para o cultivo e outro (4, 5, 6) para o armazenamento do meio de cultura.

6. Sistema de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo fato da pressão aplicada ser um valor de vácuo de 100 a 300 mm Hg.
7. Sistema de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do cultivo ser feito por imersão temporária utilizando uma fonte (22, 25) de pressão positiva e de ser constituído por pelo menos três pares de frascos, sendo um par (1, 2, 3) para o cultivo e outro (4, 5, 6) para o armazenamento do meio de cultura.
8. Sistema de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pelo fato da pressão aplicada estar compreendida entre 300 e 500 mm Hg.
9. Sistema de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pelo fato da fonte de pressão positiva ser um compressor de ar (22) e de conter, adicionalmente, um dispositivo de filtração de ar (23) para eliminação de partículas sólidas e de óleo do ar a ser alimentado ao sistema.
10. Sistema de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pelo fato da fonte de pressão positiva ser um tanque de ar comprimido de composição atmosférica (22) ou enriquecida com gases (25) que promovam um cultivo específico e, tendo, adicionalmente, um sistema de regulação da entrada de ar no sistema constituído de uma válvula solenoide (26) e um temporizador (19).
11. Sistema de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do cultivo ser feito por imersão contínua utilizando uma fonte (22) de pressão negativa e de ser constituído por pelo menos três pares de frascos de cultivo (1, 2, 3, 4, 5, 6) e por um meio (17) de purificação do ar que entra no sistema.
12. Sistema de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato da pressão aplicada ser um valor de vácuo de 100 a 300 mm Hg.
13. Sistema de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato da disposição dos tubos (A) e (B) ser modificada para ter como única função o borbulhamento, contínuo ou intermitente, de ar no meio de cultura.
14. Sistema de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do cultivo ser feito por imersão contínua utilizando uma fonte (22, 25) de pressão positiva e de ser constituído por pelo menos três pares de frascos de cultivo (1, 2, 3, 4, 5, 6).

15. Sistema de acordo com a reivindicação 14 caracterizado pelo fato da disposição dos tubos (A) e (B) ser modificada para ter como única função o borbulhamento, contínuo ou intermitente, de ar no meio de cultura.
16. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 5, 7, 11, 14, 16 e 17 caracterizado pelo fato de ser utilizando para o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais.
17. Sistema de acordo com a reivindicação 18 caracterizado pelo fato da composição do ar alimentado ao sistema ser ajustado de acordo com a espécie vegetal cultivada.

Figura 1

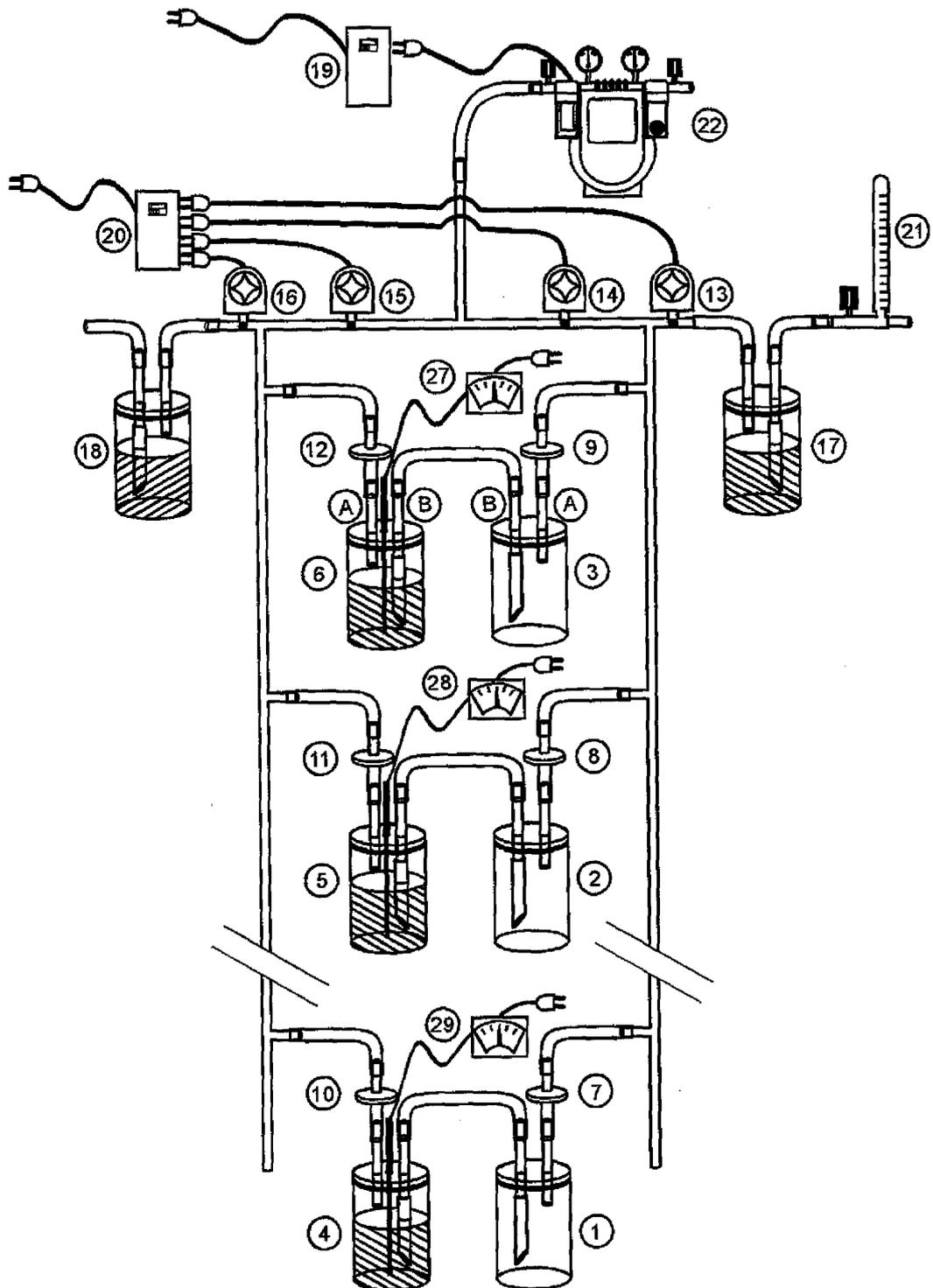


Figura 2

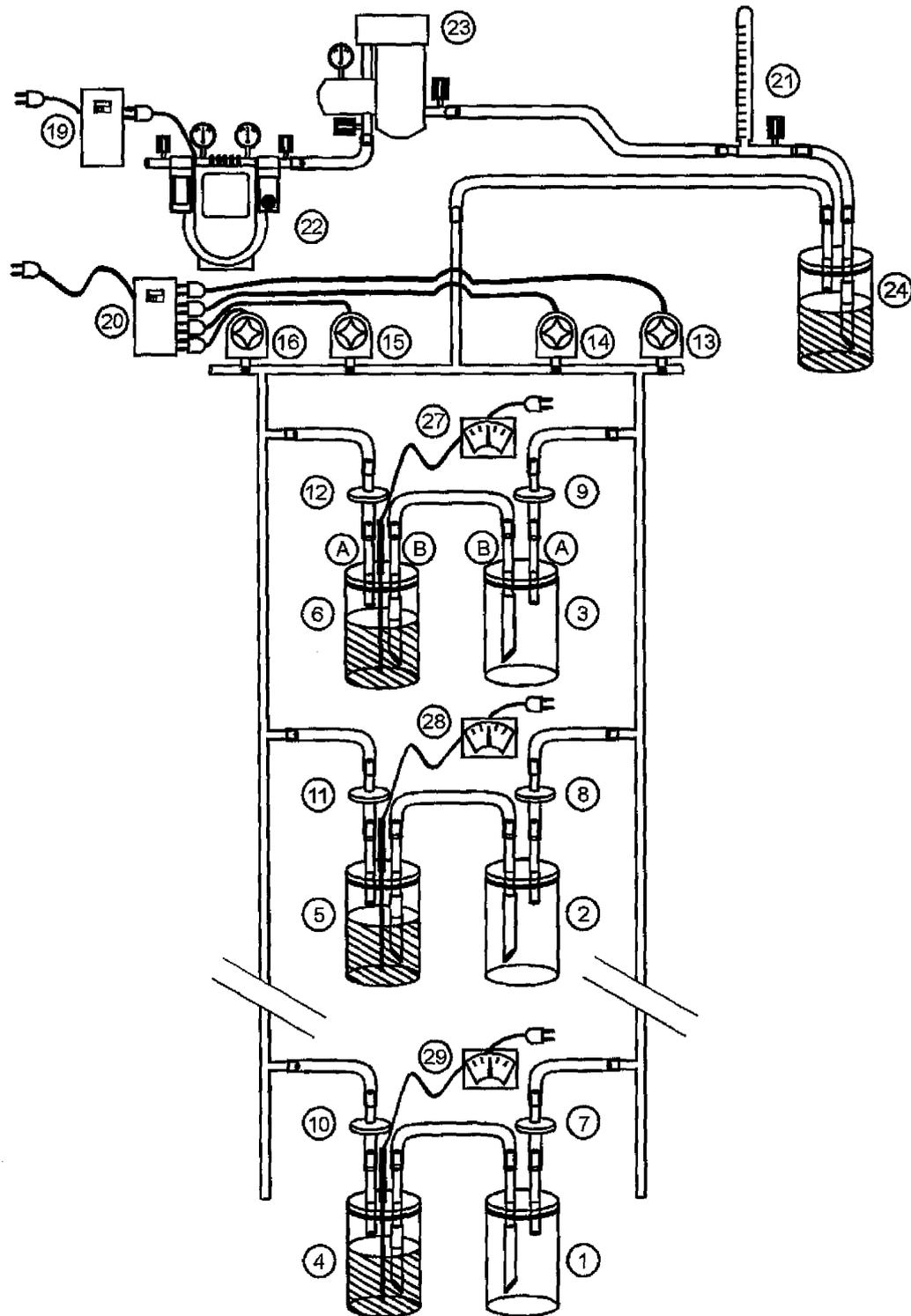


Figura 3

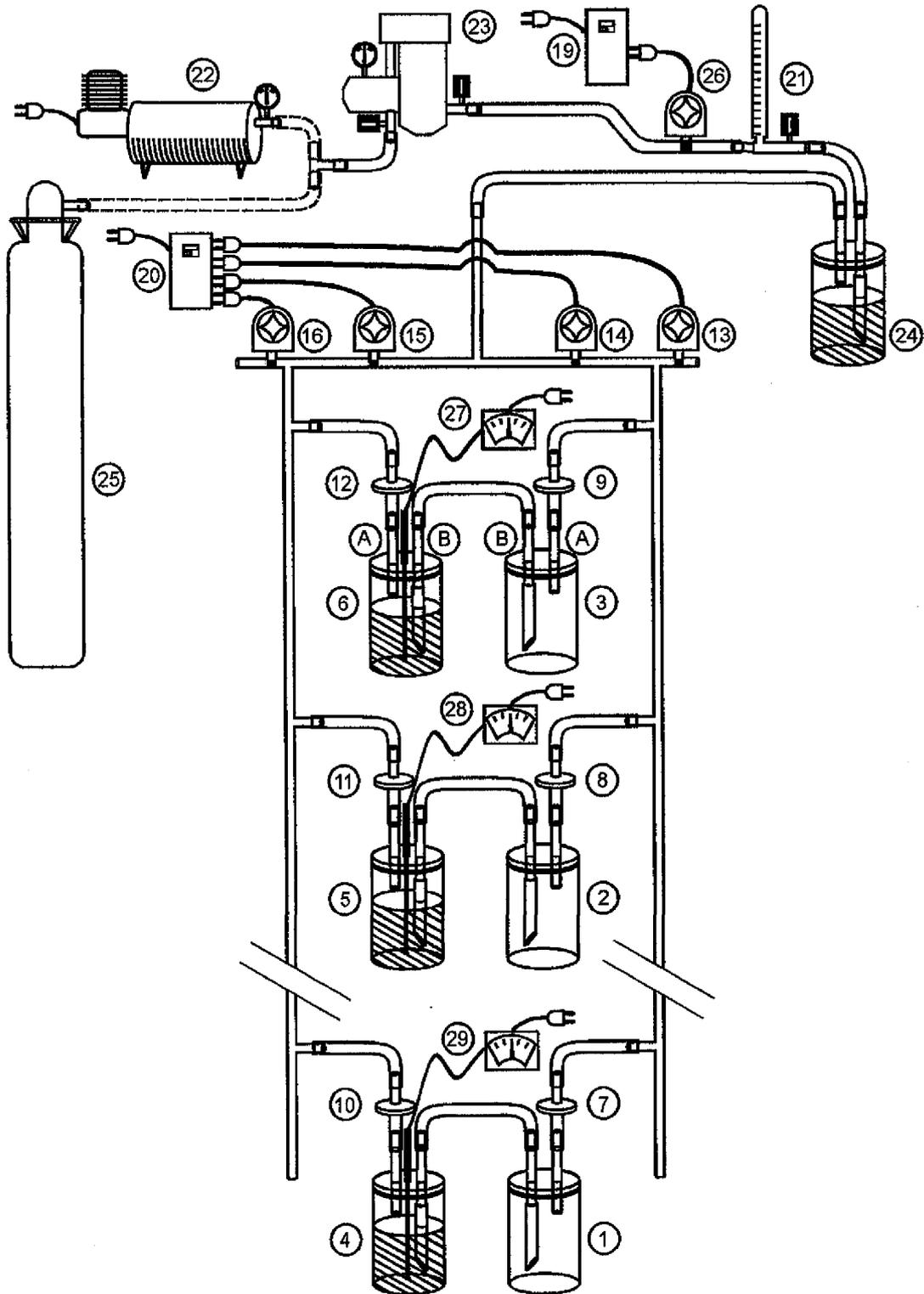


Figura 4

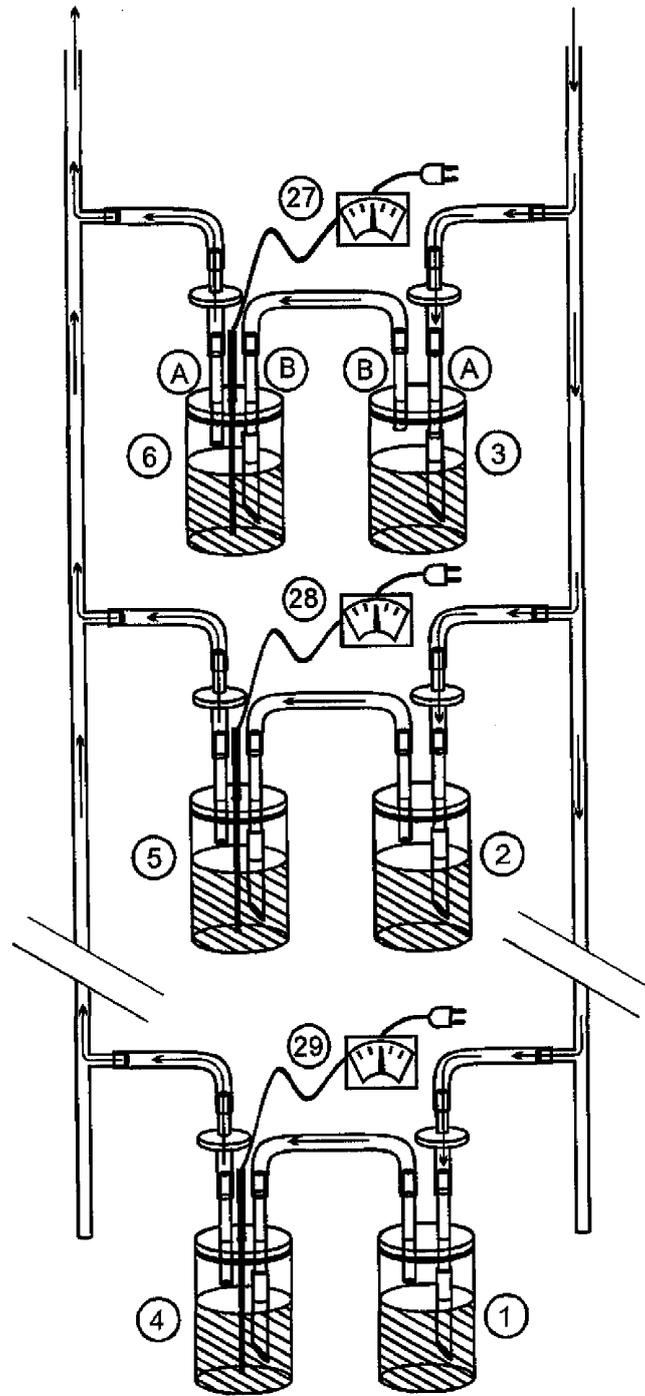


Figura 5

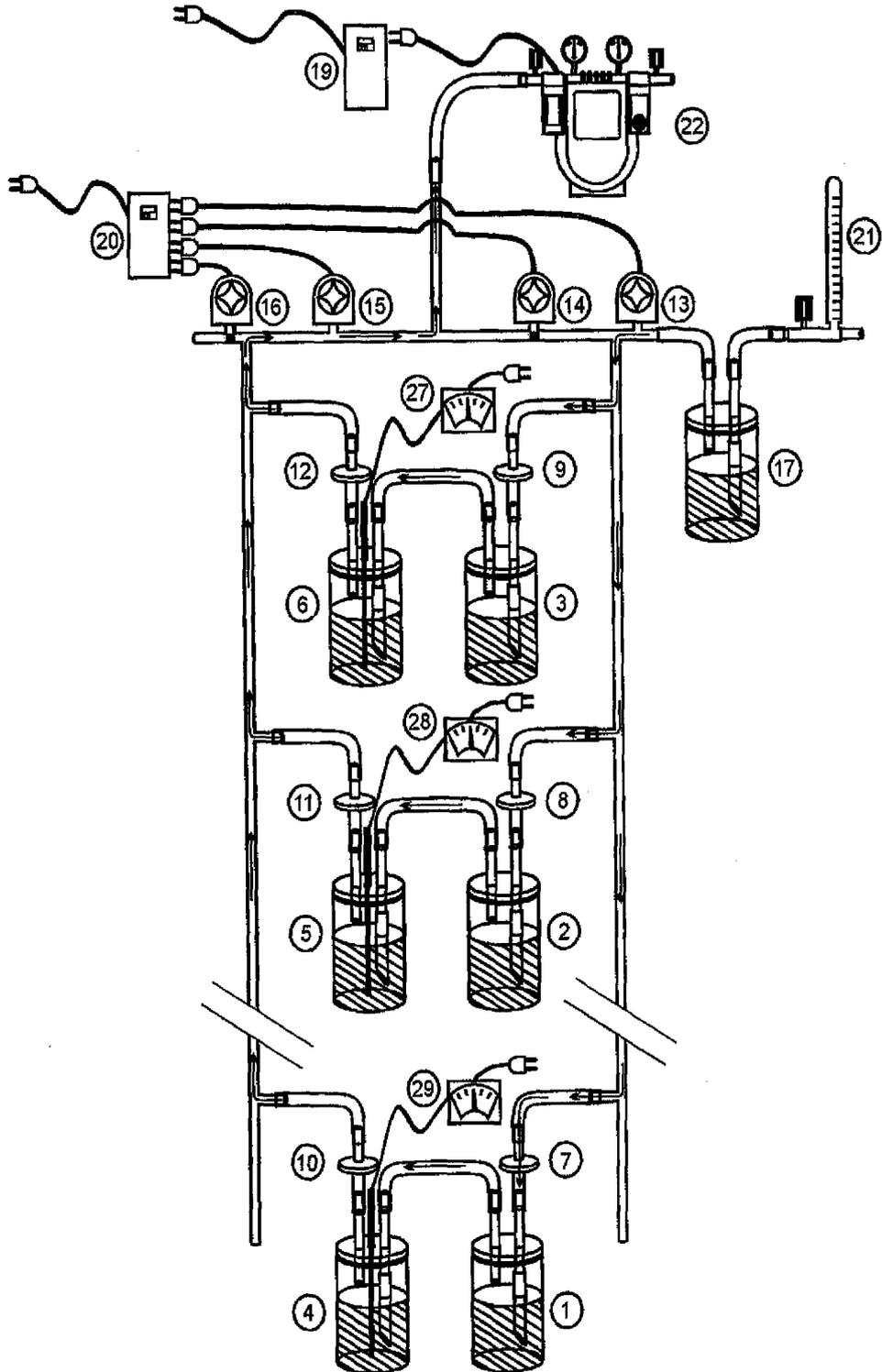


Figura 6

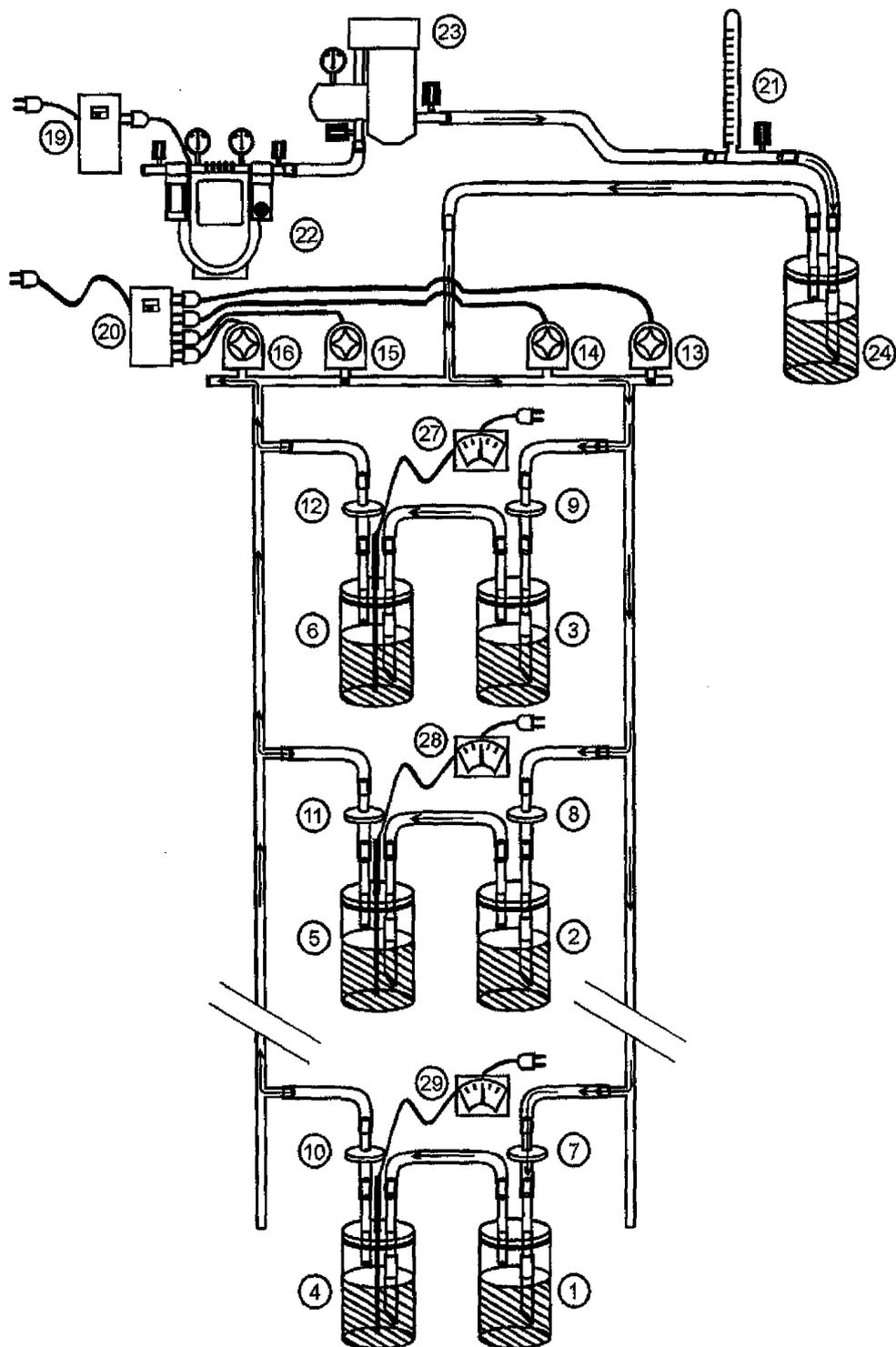


Figura 7

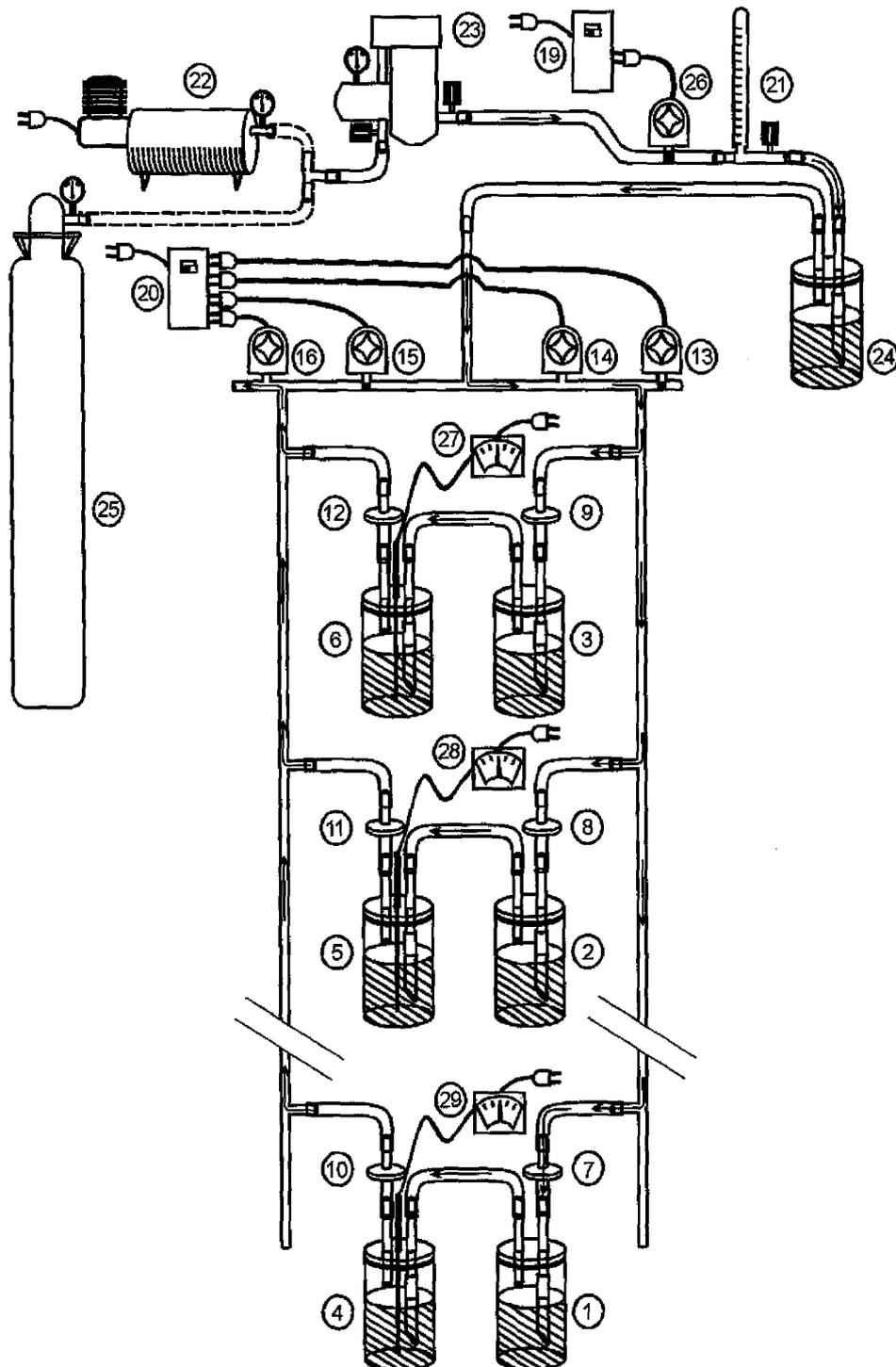


Figura 8

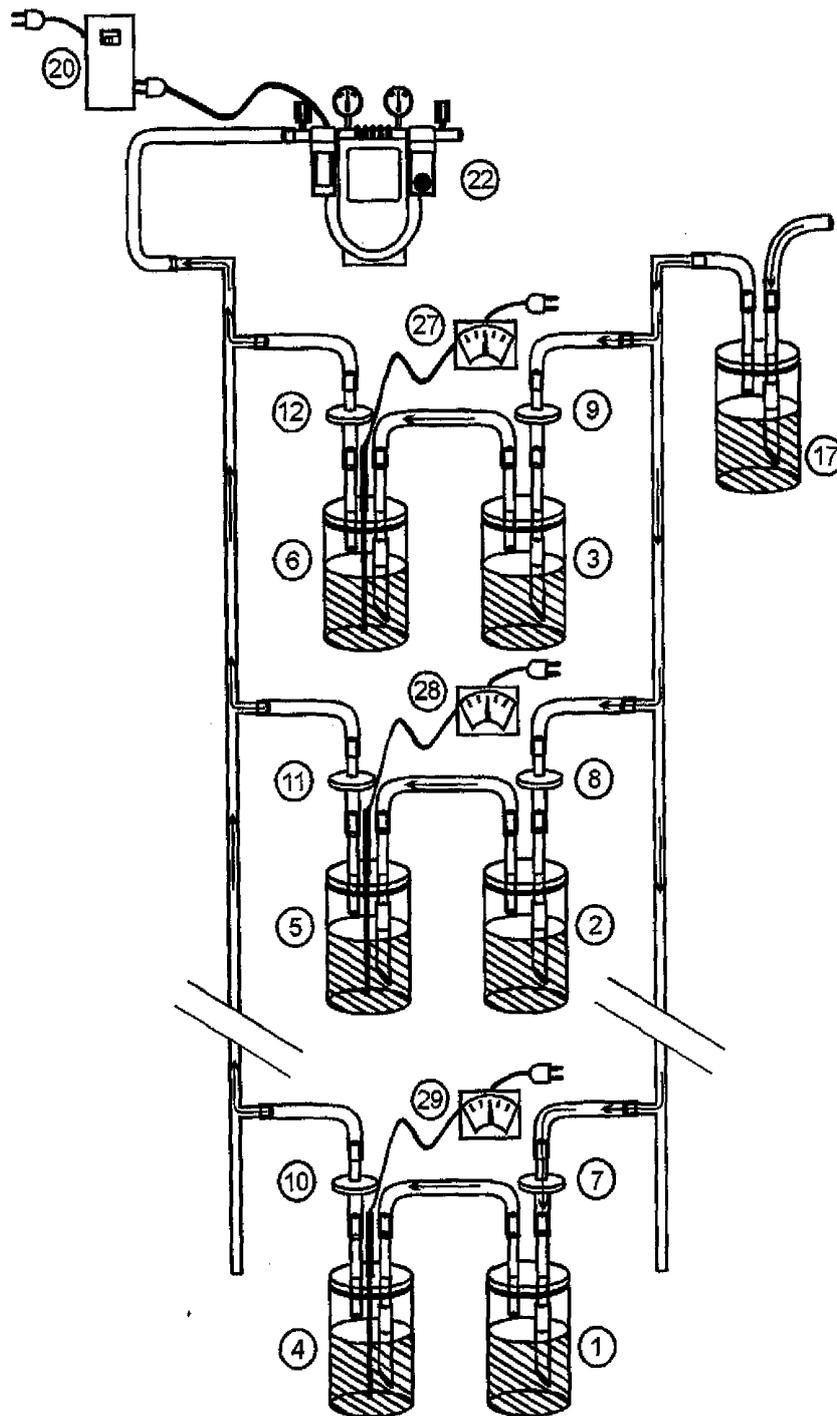


Figura 9

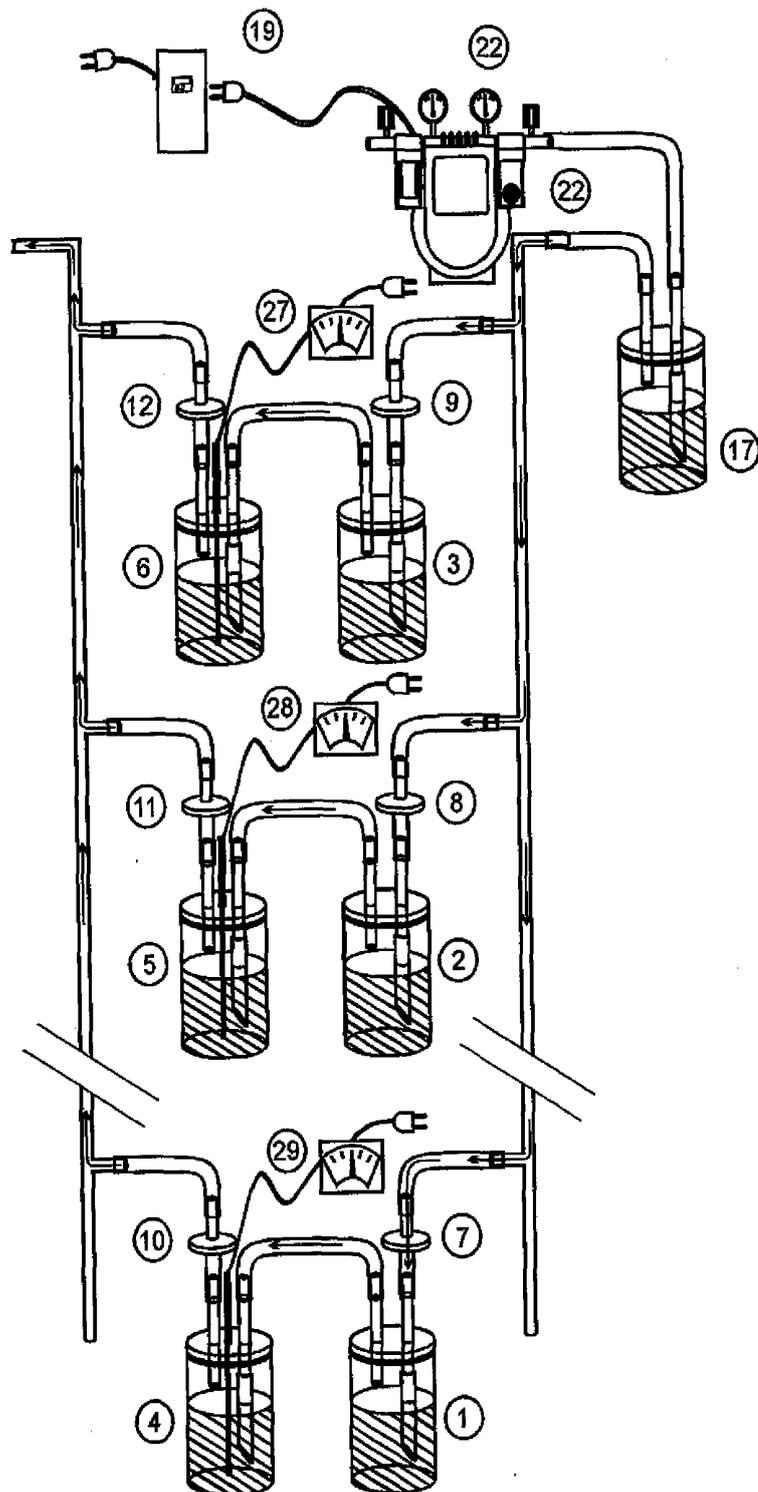
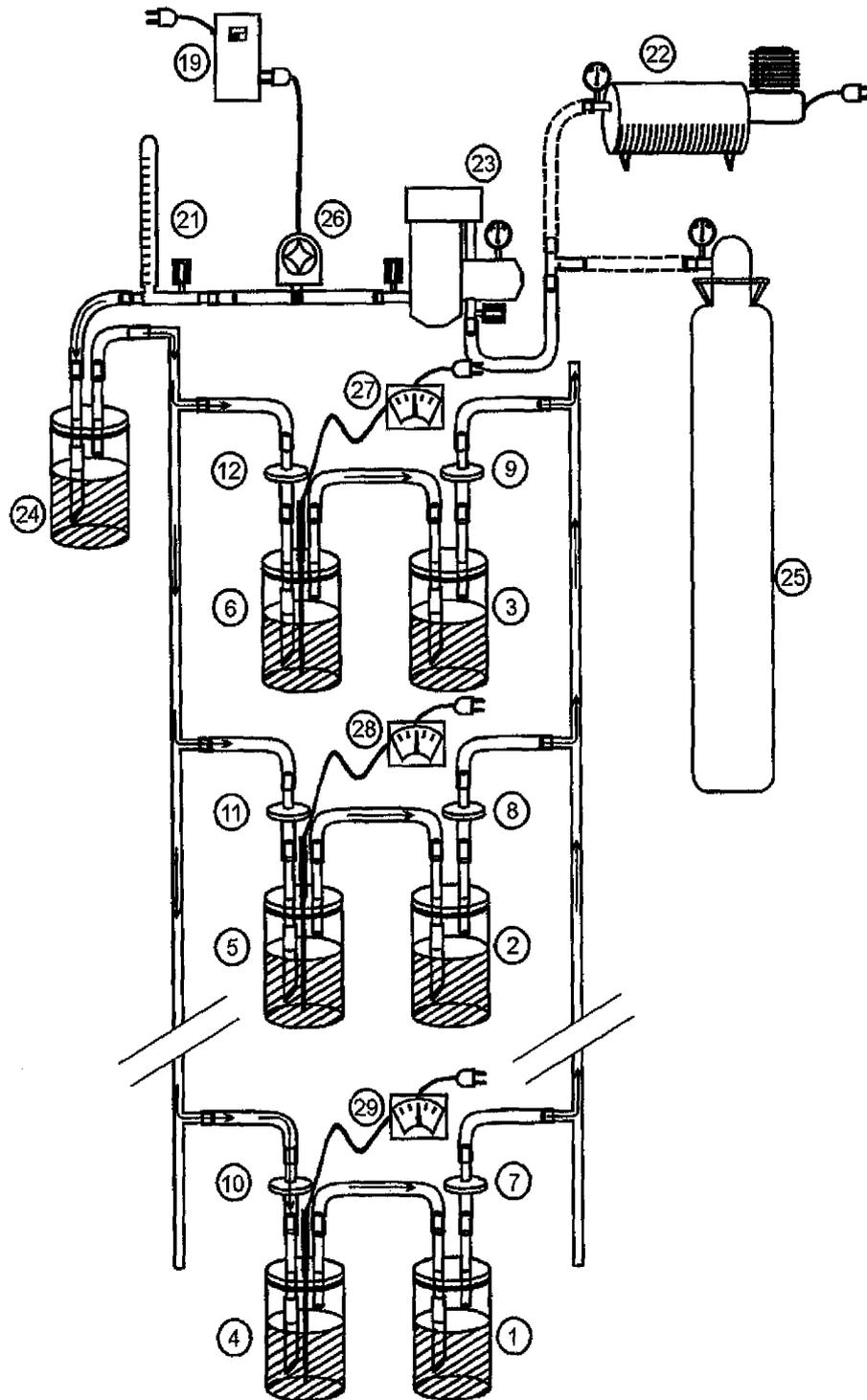


Figura 10



RESUMO

**SISTEMA DE BIORREADORES PARA O CULTIVO DE CÉLULAS, TECIDOS
OU ÓRGÃOS VEGETAIS OU ANIMAIS OU DE CÉLULAS DE
MICROORGANISMOS POR IMERSÃO TEMPORÁRIA OU CONTÍNUA
5 UTILIZANDO FONTE DE PRESSÃO POSITIVA OU NEGATIVA**

Trata-se a presente invenção de um sistema de biorreatores versátil e intercambiável, que permite o total controle das condições e ajuste a diferentes necessidades para o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais ou animais ou de células de microorganismos.

10 Uma concretização relaciona-se com o cultivo de células por imersão temporária, utilizando fonte de pressão negativa (bomba de vácuo) ou positiva (compressor de ar ou cilindro de ar comprimido ou ar artificial) e de ser constituído por pelo menos um par de frascos, sendo um para o cultivo e outro para o armazenamento do meio de cultura.

15 Uma outra concretização se refere ao cultivo por imersão contínua, utilizando fonte de pressão negativa ou positiva e de ser constituído por pelo menos um par de frascos de cultivo e por um meio de esterilização do ar que entra no sistema.

Apresenta ainda possibilidade de simplificação dos modelos pela eliminação dos meios de controle da entrada e/ou saída de ar do sistema.



Recursos Genéticos e Biotecnologia

Este livro apresenta uma nova metodologia de produção de mudas em laboratório, ou seja, aquela que utiliza equipamentos denominados biorreatores. Para situar o leitor nessa nova tecnologia, o autor faz uma revisão dos tipos de biorreatores desenvolvidos e presentes na literatura científica, para fins de micropropagação, ou seja, para a produção de mudas em laboratório.

Além de descrever com bastante detalhe os modelos de biorreatores de imersão permanente e de imersão temporária, incluindo desenhos esquemáticos, o autor apresenta, de forma didática e detalhada, o sistema de biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa.

Aqui os leitores interessados na produção de mudas em laboratório poderão encontrar informações básicas sobre o desenho, a construção e o funcionamento do biorreator de imersão temporária (modelo Embrapa), além de suas aplicações nos diferentes tipos de cultivo em laboratório.

Graças ao grande número de informações apresentadas, este livro será, sem dúvida, de grande valia para aqueles que tenham interesse ou desejem se aprofundar no assunto.

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA



ISBN 978-65-89957-73-7

9 786589 957737

CGPE 018054