

BIORREATORES Aspectos Gerais e sua Utilização para Cultura de Tecidos Vegetais



ISSN 1808-9992

Dezembro, 2008

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Semi-Árido
Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento*

Documentos 214

Biorreatores: Aspectos Gerais e sua Utilização para Cultura de Tecidos Vegetais

Juliana Martins Ribeiro

Débora Costa Bastos

Embrapa Semi-Árido
Petrolina - PE
2008

Esta publicação está disponibilizada no endereço:
<http://www.cpatosa.embrapa.br>

Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semi-Árido

BR 428, km 152, Zona Rural

Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina-PE

Fone: (87) 3862-1711 Fax: (87) 3862-1744

sac@cpatosa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade (Gestão 01/2007-12/2008)

Presidente: Maria Auxiliadora Coelho de Lima

Secretário-Executivo: Eduardo Assis Menezes

Membros: Mirtes Freitas Lima

Geraldo Milanez de Resende

Josir Laine Aparecida Veschi

Diógenes da Cruz Batista

Tony Jarbas Ferreira Cunha

Gislene Feitosa Brito Gama

Elder Manoel de Moura Rocha

Supervisor editorial: Eduardo Assis Menezes

Revisor de texto: Eduardo Assis Menezes

Normalização bibliográfica: Helena Moreira de Queiroga Bezerra

Gislene Feitosa Brito Gama

Tratamento de ilustrações: Háviner Uchoa Pedrosa

Foto(s) da capa: Deivid Costa

Editoração eletrônica: Háviner Uchoa Pedrosa

1ª edição (2008): Formato digital

Todos os direitos reservados.

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

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

CIP - Brasil. Catalogação na publicação

Embrapa Semi-Árido

Ribeiro, Juliana Martins

Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais / Juliana Martins Ribeiro e Débora Costa Bastos. – Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008.

26 p. : il. ; 21 cm. - (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 214)

1. Cultura de tecido. I. Título. II. Série.

CDD21 571.538

© Embrapa 2008

Autores

Juliana Martins Ribeiro
Pesquisadora, Bióloga, D.Sc., Embrapa Semi-Árido
juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br

Dábora Costa Bastos
Pesquisadora, Eng^a. Agrônoma, D.Sc., Embrapa Semi-
Árido.
debora@cpatsa.embrapa.br

Apresentação

Os biorreatores utilizados para a cultura de tecidos vegetais são conceituados como equipamentos para cultivo de células, gemas ou embriões vegetais, compostos de um sistema de frascos, que podem ser de vidro, aço inoxidável, policarbonato, polipropileno ou qualquer outro material que suporte autoclavagem a uma temperatura de 121°C por períodos de tempo de 15 a 30 minutos, onde os materiais a serem multiplicados estão contidos. Apresentam uma série de vantagens quando comparados com a metodologia tradicional de micropropagação, entre elas a aceleração do processo de multiplicação.

Os frascos dos biorreatores são interligados por tubos de borracha flexível, por meio dos quais os referidos materiais recebem ar e meio de cultura por aspersão ou borbulhamento. Os sistemas de imersão do material vegetal no interior dos frascos são divididos em imersão permanente e temporária. No sistema de imersão permanente, o material permanece imerso continuamente no meio de cultura; já no cultivo sob imersão temporária, o material fica temporariamente imerso no meio de cultura (Alvard et al., 1993; George, 1996).

Recentemente, os biorreatores começaram a ser utilizados para o cultivo de células, tecidos, gemas e plântulas, tendo como objetivo final a produção de mudas em larga escala. A utilização da tecnologia dos biorreatores permite às empresas especializadas na produção de mudas acelerar o ciclo de produção, reduzindo os custos e aumentando a produtividade, com preços bastante competitivos.

Diante da importância econômica dos biorreatores para a área de cultura de tecidos, este documento teve como objetivo reunir informações relativas ao funcionamento, aspectos físicoquímicos e utilização desta tecnologia para o cultivo de diferentes espécies vegetais.

Sumário

Pág.

Cultura de Tecidos Vegetais	9
Biorreatores na cultura de tecidos vegetais	9
Vantagens do uso de biorreatores em relação ao processo de micropropagação convencional	10
Problemas no uso de biorreatores e como contorná-los	11
Principais tipos de biorreatores	13
Principais parâmetros físicoquímicos em um biorreator	19
Formas e efeitos da agitação	19
Formas de transferência e efeitos do oxigênio dissolvido	21
Efeitos provocados pelas variações de CO ₂ e pH	22
Considerações finais	23
Referências bibliográficas	23

Biorreatores: Aspectos Gerais e sua Utilização para Cultura de Tecidos Vegetais

Juliana Martins Ribeiro

Débora Costa Bastos

Cultura de Tecidos Vegetais

Técnica que consiste em se cultivar plantas ou partes de plantas, tais como órgãos completos, tecidos ou células *in vitro*. É uma forma de multiplicação assexuada que se baseia na teoria da totipotência das células vegetais, segundo a qual os seres multicelulares possuem, em cada uma de suas células, toda a informação genética necessária para a formação de um indivíduo completo. Por meio da micropropagação, plantas podem ser cultivadas em condições de laboratório, em meio nutritivo específico, sob condições assépticas e ambiente controlado.

Biorreatores na cultura de tecidos vegetais

A metodologia tradicional de micropropagação baseia-se em cultivos em pequenos frascos com número reduzido de plântulas por frasco e uso de meio nutritivo semi-sólido ou líquido, o que acarreta intensa manipulação das culturas, aumentando a necessidade de mão-de-obra especializada (Ponce, 1998).

Os primeiros biorreatores utilizados para a cultura de tecidos vegetais surgiram a partir dos equipamentos denominados fermentadores, desenvolvidos há muitas décadas para o cultivo de fungos e bactérias para fins industriais. Os biorreatores utilizados para a produção de embriões ou brotos sofreram modificações, tais como a presença de sensores para monitoramento da temperatura, da velocidade de agitação do meio líquido, do pH, do oxigênio dissolvido, do potencial redox e do dióxido de carbono (Preil, 1991).

Vantagens do uso de biorreatores em relação ao processo de micropropagação convencional

Os biorreatores utilizam meio de cultura líquido que permite a renovação do ar e de nutrientes durante o cultivo e resulta em maior crescimento e multiplicação quando comparado com o meio sólido. Essas condições podem permitir um crescimento ótimo das células vegetais mediante uma regulação precisa dos fatores ambientais e um fornecimento contínuo de água, nutrientes e oxigênio (Perez Ponce, 1998).

Segundo Teixeira (2006), comparada com a tecnologia de micropropagação tradicional, a utilização de biorreatores apresenta uma série de vantagens que tornam esta técnica de extrema importância para a área de cultura de tecidos vegetais, entre elas:

- a) aceleração do processo de multiplicação;
- b) redução significativa dos custos com mão-de-obra;
- c) adaptável a diversas espécies vegetais;
- d) uniformização da produção;
- e) simplicidade de montagem do sistema;
- f) eliminação do estresse gasoso e mecânico;
- g) redução do custo total por unidade produzida.

Além dos fatores supracitados, a utilização de computadores como sistemas de controle dos biorreatores agrega vantagens sobre o sistema convencional de micropropagação em termos de automação e economia de trabalho, resultando em uma redução significativa da mão-de-obra e, conseqüentemente, baixando expressivamente os custos de produção.

Frente aos benefícios proporcionados pela utilização de biorreatores para a cultura de tecidos vegetais, a seguir serão abordados, entre outras informações, os tipos de biorreatores disponíveis atualmente e os parâmetros físicoquímicos que devem ser considerados para um bom desenvolvimento das culturas no interior dos frascos.

Problemas no uso de biorreatores e como contorná-los

Assim como no cultivo de tecidos vegetais tradicional, alguns dos grandes problemas enfrentados com a utilização de biorreatores estão relacionados com a contaminação, oxidação e hiperidricidade de explantes. As contaminações podem ser divididas em dois grupos: contaminações endógenas – tipo de contaminação de difícil detecção pelo fato de ser sistêmica, normalmente causada por bactérias (patogênicas ou não) e vírus - e contaminações exógenas – causadas por microorganismos do solo que se encontram no ambiente, bem como aqueles que fazem parte da flora bacteriana normal do corpo humano, podendo ser fungos ou bactérias. De maneira geral, o controle de ambos os tipos de contaminações pode ser feito por meio de um desenho arquitetônico adequado do local de trabalho; do conhecimento da procedência e da idade das plantas matrizes; da higiene ambiental e pessoal e da habilidade e preparação técnica dos operários.

O controle de contaminações dos explantes se inicia com cuidados com as plantas matrizes, visto que apenas o tratamento desinfestante do explante não garante sua assepsia completa, havendo a necessidade da adoção de medidas complementares que permitam reduzir ao máximo a contaminação prévia do propágulo. Levando-se em consideração que o tratamento desinfestante exclui apenas microorganismos existentes na superfície do explante ou alojados em microcavidades como estômatos, devem ser tomadas medidas quanto às condições culturais das plantas matrizes. As mesmas devem ser mantidas em ambiente protegido, ou seja, um ambiente seco, ventilado, protegido de chuvas, vento e poeira, de modo a mantê-las livres de doenças e pragas. Deve ser realizado um tratamento químico e biológico das mesmas, por meio de aplicações de fungicidas, antibióticos e inseticidas. Além disso, deve-se evitar a irrigação por aspersão, visto que tal procedimento umedece a superfície das plantas, criando um ambiente propício para o crescimento de microorganismos. A água deve ser colocada diretamente sobre o substrato, sem molhar a planta.

Uma vez atendidos os cuidados quanto à planta matriz, devem ser tomadas algumas medidas em relação ao explante. O controle de contaminações exógenas começa com a idade do propágulo, pois órgãos

cronologicamente mais velhos apresentam-se mais contaminados do que os juvenis, devido ao fato de terem sido expostos por mais tempo à penetração dos contaminantes. Quanto ao tamanho dos explantes, quanto menores forem as suas dimensões, mais reduzida será a probabilidade de se levar microorganismos em sua superfície ou em seu interior. Entretanto, devem ser evitadas dimensões muito reduzidas, a fim de não prejudicar o desenvolvimento do explante.

Um outro aspecto que deve ser levado em consideração em relação ao controle de contaminações exógenas no explante são as características morfológicas da espécie, devendo ser evitados órgãos pilosos ou porosos, ou aqueles que oferecem dificuldade à penetração do desinfestante. Da mesma maneira, tecidos protegidos por estruturas especiais são sempre menos passíveis de contaminação. Além das precauções citadas, deve ser realizada a imersão dos explantes em soluções desinfestantes tais como etanol, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, peróxido de hidrogênio, cloro comercial, antibióticos, fungicidas, inseticidas, entre outros.

Por outro lado, o controle de contaminações endógenas em explantes não pode ser realizado por meio de procedimentos de desinfestações superficiais. Neste caso, são necessários procedimentos de desinfecção que envolvam a eliminação cirúrgica de tecidos já invadidos por microorganismos ou a limpeza clonal, técnica destinada à eliminação de microorganismos sistêmicos do propágulo, que pode ser feita por meio de termoterapia, quimioterapia, eletroterapia e cultura de ápices meristemáticos.

A oxidação fenólica se dá por meio da atividade de enzimas oxidativas, como as monofenoloxidasas e as polifenoloxidasas. Estas enzimas e os correspondentes substratos (hidroxifenóis) estão separados em compartimentos diferentes dentro da célula. Por ocasião da excisão do explante, e como consequência da injúria e destruição de algumas células, enzima e substrato são postos em contato entre si e com o oxigênio, resultando na oxidação da hidroxila fenólica, com formação de água e quinona, sendo esta última tóxica a microorganismos e inibidora do crescimento celular. A oxidação fenólica pode ser minimizada com a adoção dos seguintes procedimentos:

- a) A idade do explante, pois explantes juvenis apresentam menos problemas de oxidação quando comparados com os adultos;

- b) Redução dos danos mecânicos e químicos ao explante;
- c) Remoção de substâncias fenólicas por meio da adição de, por exemplo, PVP (polivinilpirrolidona) ao meio nutritivo;
- c) Modificação do ambiente, com cultivo no escuro ou em baixa intensidade luminosa, bem como a variação da composição do meio nutritivo, utilizando-se meios salinos diluídos;
- d) Modificação do potencial redox por meio da lavagem dos explantes com ácido cítrico ou ácido ascórbico;
- e) Redução da atividade da fenolase por meio da adição de inibidores das enzimas oxidativas, como, por exemplo, sulfito, bissulfito e metabissulfito de sódio.

Quanto à hiperhidricidade dos explantes, esta pode ser evitada com a substituição dos biorreatores de imersão permanente por aqueles de imersão temporária, os quais serão descritos a seguir.

Principais tipos de biorreatores

Os biorreatores podem ser conceituados como um sistema de frascos onde os materiais são reproduzidos. Os frascos são interligados por tubos de vidro ou silicone, por meio dos quais os referidos materiais recebem ar e meio de cultura por aspersão ou borbulhamento. O sistema de imersão pode ser realizado de duas maneiras:

- **Biorreatores de imersão permanente:** também conhecidos como BIPER, neste procedimento, o material vegetal (células, tecidos, órgãos ou plantas completas) permanece imerso continuamente no meio de cultura. É mais utilizado para o cultivo de células vegetais do que das plantas propriamente ditas, pois apresenta como principal desvantagem a hiperhidratação dos tecidos, causando ainda sérios distúrbios fisiológicos que irão afetar o crescimento e o desenvolvimento do material em cultivo (Debergh et al., 1981).

Vários trabalhos foram realizados utilizando-se os biorreatores de imersão permanente, entre eles podendo ser citados os seguintes: Kosky et al. (1999) realizaram experimentos visando (i) o estabelecimento de suspensões celulares embriogênicas, utilizando como explantes calos

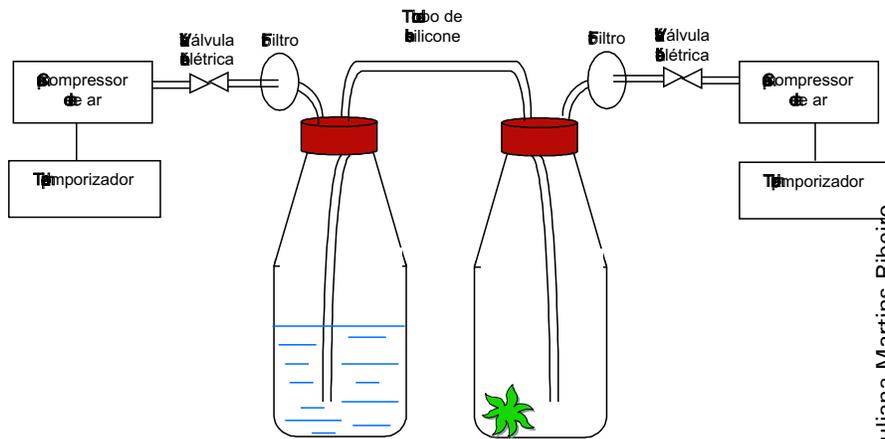
embriogênicos de banana cv. FHIA 18; (ii) multiplicação de embriões somáticos em biorreatores com meio líquido, e (iii) obtenção de embriões somáticos maduros e a sua posterior regeneração em plantas completas. Os resultados obtidos demonstraram a possibilidade do estabelecimento de suspensões de células embriogênicas utilizando cultura de FHIA 18. Também foi observado que a redução de oxigênio dissolvido no meio promoveu um aumento da quantidade de embriões somáticos no estado maduro e, conseqüentemente, uma diminuição daqueles no estado globular. Em relação ao pH, resultados demonstraram que uma maior quantidade de embriões somáticos foi obtida com o pH 3,8. Como continuação do experimento, parte dos embriões somáticos obtidos foi transferida para um biorreator de imersão temporária, regenerando plantas completas que foram, posteriormente, transferidas para meio MS (Murashige e Skoog, 1962) sólido.

Cid e Cruz (2001), trabalhando com micropropagação usando biorreator de imersão permanente (BIPER) de brotos de café (*C. arabica*) cv. Catuaí vermelho 81, em meio líquido suplementado com 0, 12 e 24 μM de BAP (6-benzilaminopurina), nos quais foram inoculados 16 brotos por tratamento por biorreator, ao final de 45 dias de cultivo em BIPER, constataram incremento significativo na massa, no número de brotos e na altura destes no tratamento de 24 μM de BAP, o que representa uma taxa de multiplicação oito vezes superior à do controle e duas vezes em relação ao outro tratamento (12 μM de BAP).

Pereira e Fortes (2003) realizaram experimentos visando estabelecer um protocolo para a multiplicação de material propagativo de batata, cv. Eliza, em meio de cultura líquido. Os melhores resultados foram obtidos quando o material foi cultivado em meio MS líquido, acrescido de ácido pantotênico (5,0 mg L⁻¹), tiamina (1,0 mg L⁻¹), ácido giberélico (0,25 mg L⁻¹) e sacarose (20,0 g L⁻¹), sob agitação constante.

• **Biorreatores de imersão temporária:** procedimento no qual o material vegetal fica temporariamente imerso no meio de cultura. Pode ser constituído de frascos dispostos lado a lado (Fig. 1), ou por frascos sobrepostos (Fig. 2), embora o primeiro seja o mais utilizado. Esse sistema é constituído por dois frascos transparentes, tubos autoclaváveis, filtros de ar hidrofóbicos, válvulas elétricas e compressores de ar. Um frasco contém o meio líquido e o outro contém as plantas que serão cultivadas.

Ambos os frascos são conectados pelo tubo, que pode ser de silicone ou de vidro, e a esterilidade do ambiente é mantida pelos filtros hidrofóbicos. Neste tipo de biorreator, a abertura da válvula elétrica faz com que o meio de cultura seja impulsionado pelo ar comprimido para o frasco que contém o material vegetal. Após a imersão do material vegetal no meio, o meio de cultura retorna ao frasco original.



Desenho: Juliana Martins Ribeiro

Fig. 1: Esquema ilustrativo de um biorreator de imersão temporária composto de frascos dispostos lado a lado.

Desenho: Juliana Martins Ribeiro

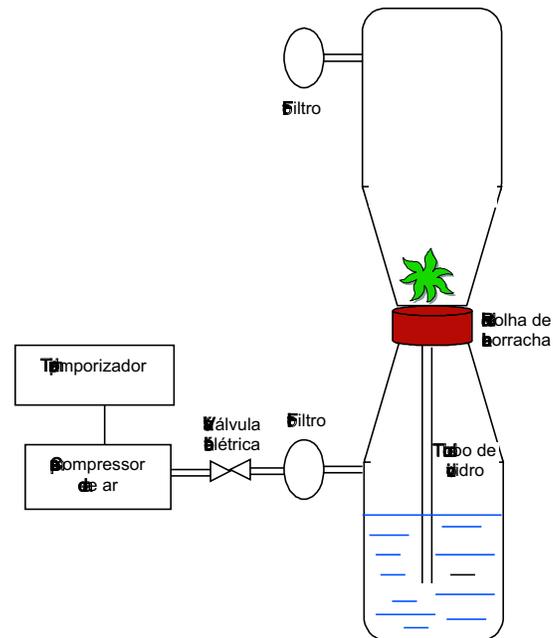


Fig. 2: Esquema ilustrativo de um biorreator de imersão temporária composto de frascos sobrepostos.

A Fig. 3 mostra o cultivo de cana-de-açúcar em um biorreator de imersão temporária, ressaltando o frasco contendo o meio nutritivo e o tubo que promove a passagem do meio para o frasco onde está contido o material vegetal, conforme descrito na Fig. 1.



Fotos: Deivid Costa

Fig. 3: Ilustração de um sistema automático de imersão temporária com cultivo de cana-de-açúcar.

A Fig. 4 mostra fotos de biorreatores de imersão temporária sendo utilizados para o cultivo de banana e orquídea.

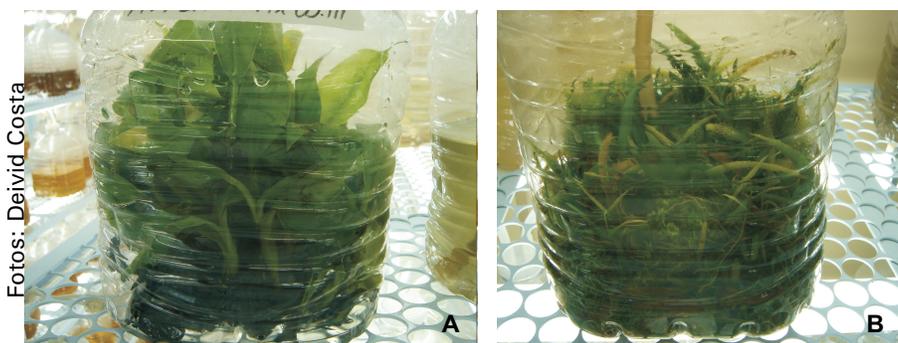


Fig. 4: Ilustração de biorreatores de imersão temporária sendo utilizados para o cultivo de banana (A) e orquídea (B).

Vários trabalhos foram realizados utilizando-se os biorreatores de imersão temporária para o cultivo de tecidos vegetais, podendo ser citados os seguintes exemplos: Pérez et al. (1999) realizaram experimentos com microtubérculos de batata, visando comparar o comportamento das plantas no campo oriundas de tubérculos cultivados *in vitro* no sistema tradicional e as resultantes do cultivo de tubérculos com a utilização do sistema de biorreatores de imersão temporária. Os resultados obtidos em condições de campo indicaram que microtubérculos obtidos pelo cultivo em sistema de imersão temporária apresentaram 89% de brotações em 15 dias, enquanto aqueles resultantes do cultivo *in vitro* no sistema tradicional apresentaram 74% de brotações no mesmo período de tempo. Além disso, tubérculos cultivados em sistema de imersão temporária apresentaram peso (g) por planta e diâmetro e comprimento (cm) maiores do que aqueles oriundos de tubérculos cultivados *in vitro* no sistema tradicional. Dessa forma, pode-se definir a utilização desta tecnologia como uma alternativa para a obtenção de mudas de batata em larga escala com elevada qualidade fitossanitária.

Escalona et al. (1999) analisaram os fatores relacionados com a propagação de abacaxi em biorreatores de imersão temporária. Para esse estudo, foram considerados os seguintes fatores: efeito do Paclobutrazol (PBZ) na fase de proliferação e a frequência de imersão no meio nutritivo (4 minutos a cada 3 horas; 4 minutos a cada 12 horas, e 4 minutos a cada

24 horas). Os resultados indicaram que houve uma maior porcentagem de brotações e de sobrevivência dos brotos nos tratamentos em que foi adicionado o PBZ ao meio nutritivo, com sistema de imersão de 4 minutos a cada 3 horas.

García et al. (1999), em experimentos visando a otimização de metodologia de micropropagação de manga, observaram que houve um aumento significativo na fase de multiplicação de brotos axilares quando os explantes foram colocados em biorreatores de imersão temporária.

Lemos et al. (2001) realizaram a micropropagação de bananeiras cv. Terra, utilizando biorreatores de imersão temporária, com o objetivo de aumentar a taxa de multiplicação e diminuir os custos de produção das mudas. Observaram que o ciclo de imersão de 4 horas e a renovação do meio de cultura aos 30 dias foram essenciais para uma maior produção de biomassa e crescimento dos explantes. A composição do meio de cultura também influenciou o desenvolvimento dos explantes de banana cultivados nos biorreatores. Explantes cultivados em meio MS + 3,0 mg L⁻¹ de BAP, com renovação para MS após 30 dias, apresentaram maior produção de biomassa e alta taxa de multiplicação. Comparando o biorreator de imersão temporária com o sistema tradicional em semi-sólido, observou-se que, no primeiro, as microplantas apresentaram maior comprimento, produção de biomassa de 2,86 vezes maior e 2,20 vezes mais brotos do que no sistema tradicional.

Rodrigues et al. (2006), em estudos com um biorreator "artesanal" de imersão temporária, utilizando explantes de *Heliconia champneiana* Griggs cv. Splash, submetidos a três subcultivos com quinze minutos de imersão em intervalos de uma hora (T1), quatro horas (T4), seis horas (T6) e oito horas (T8), verificaram que o melhor resultado ocorreu no tratamento T1, sendo inviável o tratamento T8 para esse tipo de cultura. Na comparação com o método convencional (C), os tratamentos T1 e T4 demonstraram melhor eficiência da imersão temporária na produção de brotos.

Silva et al. (2007) verificaram que o uso de biorreatores foi eficiente para a propagação de plântulas de abacaxizeiro em larga escala, produzindo, em média, 19 brotos por explante e até 200 mudas aos 45 dias de cultivo em recipientes de 1.000 mL. O sistema de imersão temporária acionada a cada 2 horas apresentou-se melhor do que os cultivos em biorreatores de imersão permanente.

Principais parâmetros físicoquímicos em um biorreator

Os aspectos mais influentes sobre o ambiente no interior dos frascos de um biorreator que, conseqüentemente, podem afetar a multiplicação e desenvolvimento de embriões somáticos e órgãos (sem sentido), são os sistemas de agitação e aeração (Perez Ponce, 1998).

Formas e efeitos da agitação

A agitação do meio nutritivo é necessária em biorreatores de imersão permanente, vez que nos biorreatores de imersão temporária, a própria passagem do meio de um frasco para outro já promove sua agitação. Considerando os sistemas de agitação, os biorreatores utilizados para o cultivo de células de plantas podem ser classificados em dois tipos, segundo Preil (1991):

. **Biorreatores agitados por fluxo de ar:** dentre os tipos de biorreatores agitados pneumaticamente, a forma mais utilizada para dispersão de ar comprimido é feita por meio de tubos que estabelecem correntes de ar no interior do frasco (Fig. 5), havendo, assim, estabilização dos padrões de circulação do líquido, resultando em um fluxo bem definido. Basicamente, este sistema consta de um recipiente de vidro ou plástico, cuja tampa apresenta dois orifícios, um para a entrada do ar e outro para a saída, ambos providos de dutos de aço inox com filtro Millipore ($0,2\mu\text{m}$ de poro), a fim de evitar a contaminação do meio nutritivo. O ar é introduzido no frasco por meio de um microcompressor e é conduzido ao fundo do recipiente por um tubo de silicone. Com exceção da borracha que liga o filtro de entrada ao compressor de ar, todos os componentes do sistema são autoclaváveis (120°C e 20 minutos).

Desenho: Juliana Martins Ribeiro

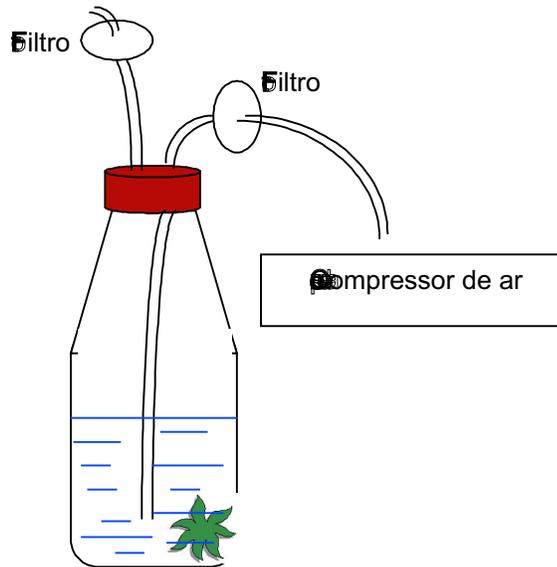


Fig. 5: Esquema ilustrativo de um biorreator de imersão permanente agitado por fluxo de ar por meio de tubos de silicone.

Biorreatores agitados pneumaticamente também são muito utilizados para o cultivo de células vegetais visando a produção de metabólitos secundários. Vários trabalhos já foram publicados nesse sentido, entre eles a utilização desse tipo de biorreator para a produção de ácidos benzóicos (Liau & Ibrahim, 1973); antocianinas (Harborne et al., 1970; Ibrahim et al., 1971; Stickland & Sunderland, 1972), carotenóides (Williams & Goodwin, 1965), entre outros.

. **Biorreatores com agitação mecânica:** são mais utilizados para o cultivo de suspensões celulares. Dentre os tipos mais comuns de biorreatores com agitação mecânica, estão aqueles compostos de pás giratórias (Fig. 6 A), ou balões volumétricos rotacionados em sentido orbital (Fig. 6 B).

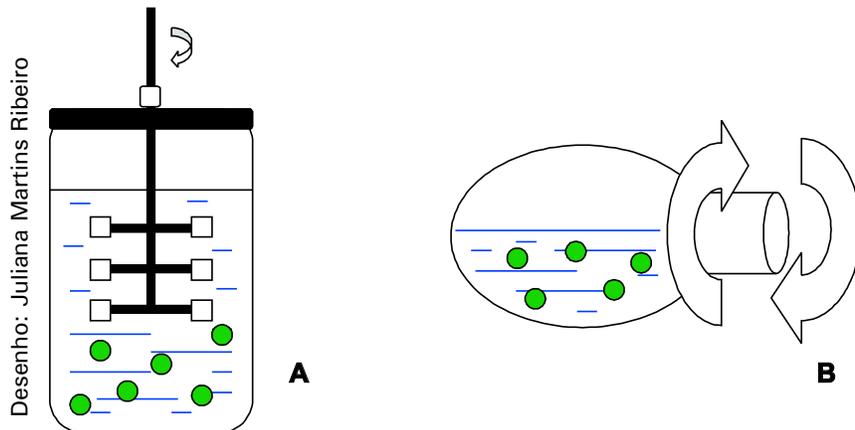


Fig. 6: Esquema ilustrativo de biorreatores de imersão permanente agitados mecanicamente, sendo (A) agitação feita por pás giratórias e (B) agitação com balões volumétricos rotacionados em sentido orbital.

Um dos principais problemas do cultivo de células em suspensão é a formação de agregados celulares, devido ao fato de os mesmos afetarem negativamente o processo de agitação em si. Para controlar esse problema, existe um sistema de agitação específico que promove vibrações que evitam sua formação. Além de controlar a formação de agregados celulares, esse sistema de vibração demonstra ser satisfatório, por não causar nenhum dano na célula cultivada. Entretanto, apresenta a desvantagem de aumentar a viscosidade do meio de cultura, diminuindo, assim, a eficiência de agitação (Preil, 1991).

Formas de transferência e efeitos do oxigênio dissolvido

A quantidade de oxigênio dissolvido pode ser medida por meio de eletrodos, que devem ser calibrados depois da esterilização e antes da inoculação no biorreator, e pode ser controlada regulando-se a velocidade de agitação e o fluxo de ar (Preil, 1991). Entretanto, em biorreatores para o crescimento de células vegetais, o controle de oxigênio dissolvido no meio não pode ser feito por meio de velocidade de agitação e fluxo de ar, por causarem danos nas células.

Para o cultivo de células em biorreatores, a manutenção da quantidade de oxigênio dissolvido deve ser realizada por meio de equipamentos compostos de válvulas elétricas que ajustam a quantidade do gás no interior do biorreator de acordo com um valor fixado, ou seja, aumentam ou diminuem sua quantidade em relação ao “set point”. Por meio desse sistema de controle de gases, pode-se manter valores mínimos de agitação que não causem danos nas células (Preil et al., 1988; Preil, 1991; Jay et al., 1992; Jiménez et al., 1994). O oxigênio não é completamente solúvel em água, sendo rapidamente consumido quando seu fornecimento é interrompido, especialmente em uma alta densidade celular. Sendo assim, a concentração de oxigênio dissolvido do meio líquido está diretamente relacionada com a taxa de crescimento das células e/ou tecidos no meio nutritivo.

O oxigênio dissolvido influencia fortemente a atividade mitótica das suspensões celulares e, em altas concentrações, é responsável por aumentar significativamente a concentração de células no meio de cultura. Entretanto, a formação e o desenvolvimento embriões somáticos são superiores em concentrações mais baixas de oxigênio dissolvido. De maneira geral, ao se controlar a quantidade de oxigênio dissolvido em biorreatores, pode haver a limitação na formação de biomassa não diferenciada e uma maior produção de embriões somáticos em baixas concentrações de oxigênio (Perez Ponce, 1998).

Efeitos provocados pelas variações de CO₂ e pH

A concentração de CO₂ influencia diretamente o pH do meio. Uma alta aeração pode resultar em uma rápida renovação de gases e substâncias voláteis, como CO₂, etileno e etanol. Logo, a alta taxa de aeração reduz consideravelmente a concentração de CO₂ nas culturas. Além disso, parece haver uma relação entre a formação de embriões somáticos e o aumento do pH do meio de cultura. Sendo assim, o pH pode ser explorado para indução da formação de embriões somáticos em diferentes espécies de plantas (Perez Ponce, 1998).

Considerações finais

A utilização de meio de cultura líquido nos biorreatores permite a renovação do ar e nutrientes durante o cultivo e resulta em maiores crescimento e multiplicação quando comparado com o cultivo em meio sólido. Além disso, a utilização de computadores como sistemas de controle resulta na automação e economia de trabalho, gerando uma redução significativa da mão-de-obra, baixando expressivamente os custos de produção de mudas em biorreatores, quando comparados com a técnica de micropropagação convencional.

De maneira geral, devem ser evitados os danos mecânicos, causados por altas velocidades de agitação, e a limitação de oxigênio, favorecida pelas baixas velocidades de agitação, em virtude de ambos os fatores serem determinantes para o rendimento final de biomassa e para a produção total de embriões somáticos.

Variáveis como o tipo de biorreator, o volume e a composição do meio de cultura, o fluxo de ar, a forma como os eletrodos de oxigênio são calibrados e a forma utilizada para controlar a concentração de oxigênio dissolvido, CO₂ e pH são de grande importância para o desenvolvimento adequado da cultura e variam de acordo com a espécie vegetal que será utilizada.

Referências bibliográficas

ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 32, n.1, p. 55-60, 1993.

CID, L. P. B.; CRUZ, A. R. R. Indução de multibrotação em *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho 81, usando diferentes concentrações de BAP em bioreator de imersão permanente (BIPER). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2001. p. 33.

DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y.; LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiology Plantarum**, Belgium, v. 53, n. 2, p.181-187, 1981.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; DAQUINTA, M.; GONZÁLEZ, J. L.; CID, M.; FUNDORA, Z.; BORROTO, C. G. Factores relacionados con la propagación de la piña (*Ananas comosus* L. Merr) en Sistemas de Inmersión Temporal. In: COLOQUIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL. 5., 1999, Santa Clara. **Libro de reportes cortos...** Santa Clara, Cuba: Impresiones GEO, 1999. p. 160-162.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: in practice.** Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia:** cultura de tecidos vegetal. Florianópolis: UFSC, Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, 2006. 41 p. Disponível em: <www.cca.ufsc.br/ldg/v/Apostila.htm> . Acesso em: 27 set. 2007.

HARBORNE, J. B.; ARDITTI, J.; BALL, E. A. The anthocyanins of callus culture of the stem of *Dimorphotheca auriculata* (Cape marigold, Compositae). **American Journal of Botany**, Bronx, v. 57, n. 6, p. 763, 1970.

IBRAHIM, R. K.; THAKUR, M. L.; PERMANAND, B. Formation of anthocyanins in callus tissue cultures. **Lloydia**, Cincinnati, v. 34, p. 175-182, 1971.

JAY, V.; GENESTIER, S.; COURDUROUX, J. C. Biorreactors studies on the effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota* L.) cell cultures. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n. 12, p. 605-608, 1992.

JIMENEZ J., E.; FERIA S., M. DE; BARBON R., R.; CAPOTE, A.; CHAVEZ, M. : Empleo de biorreactores para la producción masiva de embriones somáticos de café (*Coffea arabica*/ cv. Catimor). **Cultivos Tropicales**, La Habana, v.15 n.3, p.94, 1994.

KOSKY, R. G.; DE FERIA, M.; POSADA, L.; REYES, M.; GILLIARD, T.; CHAVEZ, M.; QUIALA, E. Somatic embryogenesis in liquid media and scale up in biorreactor of hybrid cultivar FHIA 18 (AAAB). In: COLOQUIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL. 5., 1999, Santa Clara. **Libro de reportes cortos...** Santa Clara, Cuba: Impresiones GEO, 1999. p. 106-109.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001.

LIAU, S.; IBRAHIM, R. K. Biochemical differentiation in flax tissue culture: phenolic compounds. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 51, n. 4, p. 820-824, 1973.

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

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.

PÉREZ, N.; FERIA, M.; JIMÉNEZ, E.; CAPOTE, A.; CHÁVEZ, M.; QUIALA, E. Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L. var. Atlantic) em sistemas de inmersión temporal y estudio de su comportamiento em campo. In: COLOQUIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, 5., 1999, Santa Clara. **Libro de reportes cortos...** Santa Clara, Cuba: Impresiones GEO, 1999. p. 142-144.

PEREZ PONCE, J. N. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1998. p. 207-224.

PREIL, W., FLOREK, P.; WIX, U.; BECK, A. Towards mass propagation by use of bioreactors. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.1, n. 226, p. 99-105, 1988.

PREIL, W.; BECK, A. Somatic embryogenesis in biorreactor culture. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 289, p. 179-192, 1991.

RODRIGUES, P.H. V.; TEIXEIRA, F.M.; LIMA, A.M.L.P.; AMBROSANO, G.M.B. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2006.

SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J.B.; ARAÚJO, A.G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, 2007.

STICKLAND, R. G.; SUNDERLAND, N. Production of anthocyanins, flavonols and chlorogenic acids by cultured callus tissues of *Haplopappus gracilis*. **Annals of Botany**, London, v. 36, n. 3, p. 443-457, 1972.

TEIXEIRA, J. B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 27 p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 180).

WILLIAMS, B. L.; GOODWIN, T. W. The terpenoids of tissue cultures of Paul 's Scarlet Rose. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 4, n. 1, p. 81-88, 1965.



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



CGPE 7410