

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GESSIEL NEWTON SCHEIDT

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM BIORREATOR DO
TIPO IMERSÃO POR BOLHAS PARA MICROPROPAGAÇÃO DE
PLANTAS**

CURITIBA

2008

GESSIEL NEWTON SCHEIDT

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM BIORREATOR DO
TIPO IMERSÃO POR BOLHAS PARA MICROPROPAGAÇÃO DE
PLANTAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Processos Biotecnológicos.

Área de concentração: Agroindústria
(Biotecnologia Vegetal), Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi

CURITIBA

2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Andrea Lemus Erasmo
Universidade Federal de Tocantins

Dr. João Batista Teixeira
Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa)

Prof^a. Dr^a. Nery Nishimura de Lima
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Prof^a. Dr^a. Adenise Lorenci Woiciechowski
Universidade Federal do Paraná

Co-Orientador – Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi
Universidade Federal do Paraná

Orientador – Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Universidade Federal do Paraná

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese, especialmente, aos meus pais: Dirceu Jonas Scheidt e Lizabeth Cortiano Scheidt, pelos momentos de incentivo e paciência incondicional.

AGRADECIMENTOS

A tese não é o resultado do trabalho de uma só pessoa. Seus autores precisam de apoio, incentivo, sugestões, um espelho a distância e da opinião de alguém muito próximo do manuscrito. Por isso, tenho que agradecer a inúmeras pessoas que me deram tudo isso e fizeram com que esta tese se concretizasse.

A Deus que me deu vida, saúde e força para vencer mais esta etapa, possibilitando conhecer um dos lados mais maravilham o ser humano que é o compartilhamento do conhecimento.

Ao Orientador Professor Doutor Carlos R. Soccol pela oportunidade e orientação.

Ao Co-orientador Professor Doutor Luiz A. Biasi pelas valiosas contribuições na conclusão dessa tese.

Ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná que possibilitou a realização desta tese.

Aos professores: Adenise L. Woiciechowski, Adriane B. P. Medeiros, Luciana P. de S. Vandenberghe, Luis A. Letti, Michele R. Spier e Julio C. de Carvalho. A técnica do laboratório: Mitiyo F. Miyaoka, do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos pelo apoio.

Agradeço a todos os amigos estagiários (a): Jacqueline S. Chimilovski, Antonio M. Júnior e Cleber Alexandre, Ryu Masaki, Bruno M. Nascimento, Luís F. M. Figueiredo, bem como aos amigos pesquisadores da Pós-Graduação em Bioprocessos: Augustus C. Portella, Darcy dos Santos, Jefferson Coral, Rafael M. Albuquerque, Eduardo B. Sydney, Carlos J. Dalmas Neto, Gerson R. Mello, Gabrielle C. Consentino, Marcelo B. A. Fernandes, Francisco M. D. Vitola, Sascha Habu, Caroline Tiemi Y., Lucianna Freitas, quanto da Pós-Graduação em Agronomia: André L. L. da Silva e Yohana de Oliveira que trocaram idéias conosco e compartilharam de seu conhecimento e experiência num campo novo, como são os processos biotecnológicos, em especial para a minha eterna namorada: Andréa H. Arakaki.

A Fundação Araucária e ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa.

A minha família pela amizade, atenção, incentivo e principalmente pelo apoio e amor constante.

A todos aqueles que infelizmente não estão citados aqui, mas que com seu auxílio e colaboração tornou possível a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*"Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade
e perseverança."*

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
<i>Geral</i>	3
<i>Específicos</i>	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO II	15
COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DA CULTURA DO ABACAXIZEIRO	15
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
<i>Fonte de explantes</i>	18
<i>Experimento</i>	18
<i>Variáveis avaliadas</i>	20
<i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	21
CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO III	28
COMPARAÇÃO DE SISTEMAS DE MICROPROPAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ORQUÍDEAS <i>Oncidium leucochilum</i>	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
<i>Fonte de explantes</i>	31
<i>Experimento</i>	31
<i>Variáveis avaliadas</i>	33
<i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO IV.....	41
COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Melaleuca alternifolia</i> CHEEL	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT	42
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS	44
<i>Fonte de explantes</i>	44
<i>Experimento</i>	44
<i>Variáveis avaliadas</i>	46
<i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO V	53
COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> NA MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO DE <i>Eucalyptus saligna</i> SMITH	53
RESUMO.....	53
INTRODUÇÃO	55
MATERIAL E MÉTODOS	56
<i>Fonte de explantes</i>	56
<i>Experimento</i>	56
<i>Variáveis avaliadas</i>	58
<i>Multiplificação</i>	58
<i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO VI.....	66
MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE UM BIORREATOR DE IMERSÃO POR BOLHAS PARA MICROPROPAGAÇÃO.....	66
RESUMO.....	66

ABSTRACT	67
INTRODUÇÃO	68
MATERIAL E MÉTODOS	69
<i>Parte experimental</i>	69
<i>Fonte de explantes</i>	70
<i>Solução nutritiva</i>	71
<i>Respirometria</i>	71
<i>Hidrodinâmica</i>	71
<i>Aeração</i>	72
<i>Variáveis avaliadas</i>	72
<i>Modelo matemático</i>	72
RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	86
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biorreator de imersão por bolhas.....	2
Figura 2: Biorreator ‘column bioreactor’	6
Figura 3: Esquema de um biorreator de imersão permanente BIPER.....	7
Figura 4: Biorreator de imersão temporária “R.I.T.A. [®] ”	8
Figura 5: Sistema de biorreator de imersão temporária, desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia	9
Figura 6: Biorreator de imersão temporária ‘TRI-biorreator’	10
Figura 7: Biorreator de imersão temporária da BioCampo	11
Figura 8: Desenho esquemático dos biorreatores de imersão.	20
Figura 9: Número mediano de brotações com a utilização do biorreator de imersão por bolhas, em três estágios.	22
Figura 10: Explantes de <i>Ananas comosus</i> L. cultivados em sistemas de biorreatores (B.I.B. [®] e R.I.T.A. [®]) e sistema tradicional, após 30 dias de cultivo. Mostrando as fases de (A): Imersão; (B): Emersão.....	25
Figura 11: Desenho esquemático dos biorreatores de imersão.	33
Figura 12: Explantes de <i>Oncidium leucochilum</i> cultivados em sistemas de biorreatores (B.I.B. [®] e R.I.T.A. [®]) e sistema tradicional, após 45 dias de cultivo. (A): Imersão; (B): Emersão.	37
Figura 13: Desenho esquemático dos biorreatores de imersão.	46
Figura 14: Explantes de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel, cultivados em sistemas de biorreatores (B.I.B. [®] e R.I.T.A. [®]) e sistema tradicional, após 21 dias de cultivo.	49
Figura 15: Desenho esquemático dos biorreatores de imersão.	58
Figura 16: Explantes de <i>Eucalyptus saligna</i> Smith cultivados em sistemas de biorreatores (B.I.B. [®] e R.I.T.A. [®]) e sistema tradicional, após 21 dias de cultivo. (A): Imersão; (B): Emersão.	62
Figura 17: Desenho esquemático do biorreator de imersão por bolhas	70
Figura 18: Dados referentes ao consumo de O ₂ , em tempo real desenvolvido com base em plataforma de implementação de supervisórios LAquis (LCDS Brasil, 2008).	75
Figura 19: Dados referentes à vazão de ar em tempo real desenvolvido com base em plataforma de implementação de supervisórios LAquis (LCDS Brasil, 2008).	76

Figura 20: Dados referentes à altura da solução nutritiva como função da vazão Q (L/min), e da concentração de Tween [®] 20 (mg/L) monitorados através de fluxímetro.	77
Figura 21: Dados referentes à condutividade elétrica do primeiro estágio como função da aeração e do tempo de aeração, foram monitoradas por um multímetro digital (Minipa ET-1001).....	78
Figura 22: Dados referentes à condutividade elétrica do primeiro estágio como função da aeração e do tempo de aeração, foram monitoradas por um multímetro digital (Minipa ET-1001).....	79
Figura 23: Dados referentes à transferência de massa entre os estágios ou compartimentos como função da aeração e do tempo de aeração.....	81
Figura 24: Dados referentes à concentração de sal.	82
Figura 25: Dados referentes à concentração de solutos nos estágios.....	83
Figura 26: Dados referentes ao número total de brotações.	84
Figura 27: Dados referentes à cinética de massa fresca (g) utilizando o modelo exponencial.	84
Figura 28: Dados referentes à cinética da altura da parte aérea (cm) utilizando o modelo simplificado.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número total de brotações (NTB), número médio de lançamentos foliares (NMLF), número médio das raízes (NMR) e altura média das plantas (AMP) de <i>Ananas comosus</i> L. Merrill após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes sistemas.	21
Tabela 2: Massa fresca total (MFT), massa seca total (MST) e incremento da massa fresca (IMF) de <i>Ananas comosus</i> L. Merrill após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes sistemas.	23
Tabela 3: Número total de brotos (NTB), massa fresca total (MFT), massa seca total (MS), incremento da massa fresca (IMF) de <i>Oncidium leuchochilum</i> após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes sistemas.	34
Tabela 4: Altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), comprimento das raízes (CR), e comprimento da maior raiz (CMR) de <i>Oncidium leuchochilum</i> após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes sistemas.	35
Tabela 5: Valores médios da massa fresca total (MFT), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR) e incremento da massa fresca (IMF) de <i>Melaleuca alternifolia</i> após 21 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes sistemas.	47
Tabela 6: Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR) e massa seca total (MST) de <i>Melaleuca alternifolia</i> após 21 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes sistemas.	48
Tabela 7: Valores médios do comprimento total das raízes (CTR), volume das raízes (VR), número de raízes (NR), altura da parte aérea (APA) e comprimento médio das raízes (CMR) de <i>Melaleuca alternifolia</i> após 20 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes sistemas.	49
Tabela 8: Número de brotos por plantas (NBP), massa fresca total (MFT), incremento de massa fresca (IMF), massa seca total (MST), incremento de massa seca (IMS), número de brotos g^{-1} de inoculo (NBI) e taxa de crescimento relativo $mg.g^{-1}$ dia (TCR) de <i>Eucalyptus saligna</i> Smith após 21 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes sistemas.	60
Tabela 9: Número total de brotos (NTB), Comprimento do maior broto (CMB), Comprimento médio dos três maiores brotos (CM3>B), altura média dos brotos (AMB) e número de brotos g^{-1} (NB g^{-1}) de <i>Eucalyptus saligna</i> Smith após 21 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes sistemas.	62
Tabela 10: Parâmetros otimizados para os modelos da cinética de massa fresca (MS) de <i>Oncidium leuchochilum</i> após 30 dias de cultivo no biorreator de imersão por bolhas.	83
Tabela 11: Parâmetros otimizados para os modelos da cinética de altura da parte aérea (APA) de <i>Oncidium leuchochilum</i> após 30 dias de cultivo no biorreator de imersão por bolhas.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANA:** *Acido naftaleno-acético;*
- BAP:** *6-Benzilaminopurina;*
- B.I.B.[®]:** *Biorreator de imersão por bolhas;*
- B.I.T.[®]:** *Biorreator de imersão temporária;*
- BIPER:** *Biorreator de imersão permanente;*
- R.I.T.A.[®]:** *Recipiente de imersão temporária automatizada;*
- MS:** *Solução nutritiva (MURASHIGE e SKOOG 1962);*
- g:** *Grama;*
- mL:** *Mililitro;*
- mg:** *Miligrama;*
- mm:** *Milimetro;*
- μL:** *Microlitro;*
- μmol:** *Micromolar;*
- cm:** *Centímetro.*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um biorreator do tipo imersão por bolhas (B.I.B.[®]) para micropropagação e cultura de células vegetais, bem como facilitar o trabalho rotineiro e melhorar as condições ambientais e assépticas para as culturas que desempenham interesse agrônômico. Contudo, a biotecnologia vegetal tem sido empregada como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de equipamentos eficazes na propagação clonal de diversas espécies. O desenvolvimento de novos protótipos de imersão temporária e/ou permanente, bem como o estudo de seu funcionamento em diferentes culturas é fundamental para tentar reduzir custos, aumentar a produtividade e manter a qualidade genética do material vegetal submetido a essa técnica. Neste sentido, a propagação vegetativa em biorreatores de imersão por bolhas temporária e/ou permanente, consiste no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em uma solução nutritiva apropriada e asséptica. A vantagem deste método é que se trabalha somente com células vegetais desejáveis, desenvolvem-se com rapidez e com alto coeficiente de multiplicação e como técnica de multiplicação e conservação de patrimônio genético, formando milhões de outras células ou milhões de outras plantas. Para tanto, o crescimento e/ou desenvolvimento *in vitro* das plântulas de abacaxi, orquídeas, melaleuca e eucalyptus foram desenvolvidos em sistemas de biorreatores (B.I.B.[®] e R.I.T.A.[®]) com ciclo de imersão contínua e/ou permanente e o sistema tradicional em frascos de 200 mL. Todos os sistemas de cultivo, utilizou solução nutritiva líquida (MS), suplementado com 0,3 a 0,5 µL de Tween[®] 20, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 120°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, temperatura controlada de 25±2°C, sob luz branca fria (35 µmol.m⁻².s⁻¹), com 16 horas de fotoperíodo, o delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e três repetições. O futuro é promissor com as atuais contribuições da biotecnologia vegetal, no tocante a micropropagação em biorreatores. Acredita-se que ela dará importante contribuição aos pesquisadores, no seu propósito de suprir a demanda de alimentos, fármacos, fibras, energia e na produção de mudas melhoradas. Portanto, o biorreator de imersão por bolhas torna-se uma alternativa viável e eficaz na produção de mudas e metabólitos secundários em larga escala.

Palavras-chave: Biorreatores, micropropagação, larga escala.

ABSTRACT

This work had as its main objective the development of a bioreactor-type immersion by bubbles (B.I.B.[®]) for the techniques of micropropagation and culture of plant cells, and to facilitate the work routine and to improve environmental and aseptic conditions and techniques for crops which have agronomic interest. However, the plant biotechnology has been used as an assisting tool in the development of effective equipment in clonal propagation of various species. The development of new prototypes of temporary and/or permanent immersion and the study of their operation in different cultures is essential to reduce costs, increase productivity and to maintain the genetic quality of the plant material subjected to this technique. Hence, the vegetative propagation in bioreactors of immersion by bubbles continuous and/or permanent submersion is the growing of organs, tissues or plant cells in a nutrient and appropriately aseptic solution. The advantage of this method is that it works only with desirable plant cells, they grow quickly and with a high coefficient of multiplication. It is also advantageous as a technique of multiplication and conservation of genetic heritage, allowing to form millions of other cells or millions of other plants. For this purpose, growth and/or development *in vitro* of pineapple, orchids, eucalyptus and melaleuca seedlings have been carried on in bioreactor systems (B.I.B.[®] and R.I.T.A.[®]) with continuous and/or permanent cycle of immersion and by the traditional system in flasks of 200 mL. All the systems used liquid nutrient solution (MS) supplemented with 0.3 to 0.5 μL of Tween[®] 20, with pH adjusted to 5.8 and it was autoclaved at 120° C for 15 minutes. The cultures were kept in a growth room, with controlled temperature of 25 ± 2 °C, under cool white light ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), with 16 hours of photoperiod. The statistic design was completely randomized, consisting of three treatments and three repetitions. The future is promising with the current contributions of plant biotechnology, concerning micropropagation in bioreactors. It is believed that it will provide important contribution to the researchers to respond to the demand for food, medicines, fibers and energy in the production of improved seedlings. Therefore, the bioreactor of immersion in bubbles is a viable and efficient alternative in the production of seedlings and secondary metabolics on large scale.

Keywords: Bioreactor, micropropagation, large scale.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento biotecnológico dos processos industriais com viabilidade econômica a partir da cultura de células vegetais implica em estudos que envolvem um aumento de escala, bem como no desenvolvimento de equipamentos eficazes na propagação clonal de diversas espécies vegetais C3 e C4, principalmente aquelas que desempenham interesse agrônomico e na produção de metabólitos secundários de plantas medicinais.

A possibilidade de obter em laboratório produtos e/ou mudas, em condições controladas e reprodutíveis, independentemente da sazonalidade dos ciclos agrícolas, torna a micropropagação a melhor alternativa para se conseguir material vegetal de qualidade, fixação de ganhos genéticos e fitossanitária garantida. Contudo, deve-se mencionar que as culturas de células *in vitro* representam um importante recurso para a obtenção de produtos vegetais de valor elevado, desde que a viabilidade econômica do processo seja comprovada. Portanto, a utilização da tecnologia de culturas de células vegetais aparece como uma alternativa eficaz na produção de mudas, particularmente, em espécies raras ou as que estão em processo de extinção.

Neste sentido, o cultivo de plantas em biorreatores visa à reprodução de genótipos selecionados, tornando uma alternativa para a otimização do processo e a redução dos custos de produção. Este sistema permite a renovação do ar no ambiente *in vitro*, aumentando a produtividade das plantas, bem como a redução do tempo requerido para a propagação tradicional.

Os biorreatores são equipamentos utilizados para micropropagação clonal e massal de plantas, cujo objetivo é a imersão temporária ou permanente de cultura de células, tecidos, sementes ou órgãos vegetais em solução nutritiva líquida, tendo como propósito fundamental, facilitar o trabalho rotineiro e melhorar as condições ambientais e assépticas para as culturas, produzindo-as em larga escala.

O biorreator de imersão por bolhas (*B.I.B.*[®]) desenvolvido e patenteado por Soccol *et al.* (2008) torna-se uma alternativa viável e eficaz na produção de mudas e metabólitos secundários, podendo trabalhar com vários estágios aumentando consideravelmente a sua capacidade de produção.

O equipamento é confeccionado com vidro temperado em formato cilíndrico, tem dois compartimentos, que é dividido transversalmente por uma placa com poros de 170 a 220

μm . A parte inferior possui 3,5 cm de altura, e nela encontra-se um orifício para a entrada do ar, e a parte superior possui 24,5 cm de altura e neste compartimento são inseridos os estágios entre 2 à 5 cm de altura cada, todos os componentes internos são de aço inox. O biorreator totaliza 28 cm de altura por 9 cm de diâmetro, mas pode ser alterada conforme a necessidade da empresa ou instituição. O equipamento funciona a partir de um sistema interligado por tubos de borracha flexível, a solução nutritiva passa do compartimento inferior (pré-estágio) para os estágios superiores por meio da injeção de ar no compartimento inferior. Quando a solução nutritiva passa para o compartimento superior, ocorre a aeração e a solução nutritiva entra em contato com o material em cultivo. O ar é expelido através de um orifício na tampa do compartimento superior. O sistema pode funcionar em imersão temporária ou permanente, dependendo da espécie que esta sendo propagada (Figura 1).

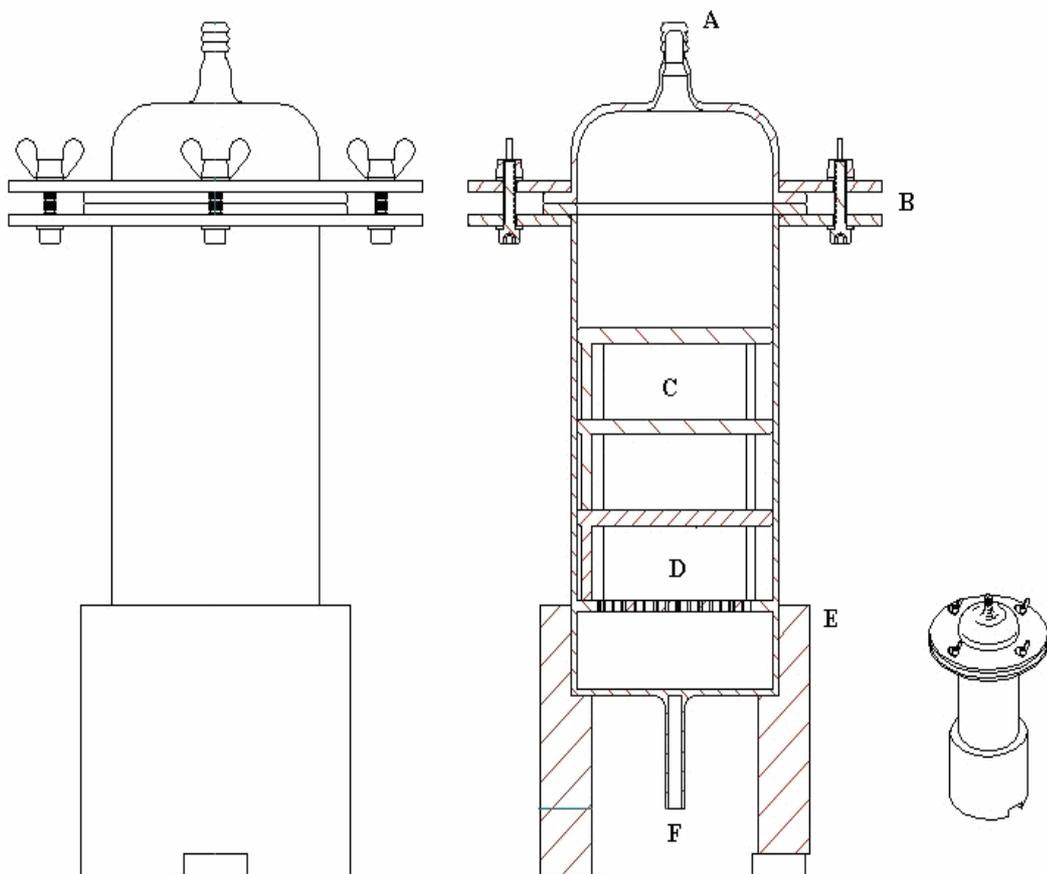


Figura 1: Biorreator de imersão por bolhas. A): Saída de ar; B): Kit fixação; C): Estágios; D): Placa porosa; E): Base; F): Entrada de ar.

Fonte: Soccol *et al.* (2008).

OBJETIVOS

Geral

O trabalho em questão teve por objetivo desenvolver um biorreator do tipo imersão por bolhas (B.I.B.[®]) para a micropropagação e cultura de células vegetais.

Específicos

- Otimizar a taxa de crescimento e desenvolvimento dos propágulos de espécie de interesse agrônômico, utilizando biorreatores de imersão por bolhas.
- Comparar o biorreator de imersão por bolhas, com o sistema R.I.T.A.[®] “*Recipiente de Imersão Temporária Automatizada*”, disponível no mercado internacional, bem como, frascos de 200 mL que são utilizados de maneira tradicional.
- Elaborar cálculos de balanço de massa e produtividade dos explantes obtidos a partir das técnicas experimentadas, além de apresentar resultados que justifiquem a viabilidade da utilização do protótipo em larga escala para a produção de mudas comercializáveis.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A micropropagação ou a propagação vegetativa *in vitro* consiste no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em uma solução nutritiva apropriada e asséptica (LORENZO *et al.* 1998). Baseia-se no fato de qualquer célula é um organismo vegetal totipotente, isto é, encerra em seu núcleo todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa, apta a dar origem a uma nova planta (CASTRO *et al.* 2005; SILVA *et al.* 2007). Estas células quando colocadas em tubo de ensaio, frascos ou biorreatores desenvolvem-se com rapidez, possibilitando a conservação do patrimônio genético das plantas ameaçadas em extinção, formando milhões de outras células ou milhões de outras plantas (GUERRA *et al.* 1999; RODRIGUES *et al.* 2006).

De acordo com Silva (2006) a micropropagação de plantas, apresenta alto custo de produção, o que torna as mudas produzidas nestes sistemas caras e de difícil aquisição pelos produtores rurais. Estes custos de produção são devido à mão-de-obra, que chega a 40% ou 60% dos custos de produção (CID *et al.* 2002). Portanto, novo enfoque dos processos biotecnológicos tornou-se necessário, principalmente com vistas à redução de custos na produção de mudas. No tocante ao cultivo *in vitro*, sistema de automação para a propagação clonal pode ser uma alternativa interessante, então, vislumbrou-se a possibilidade da micropropagação com os biorreatores (ALVARD *et al.* 1993; TEIXEIRA, 2002).

O primeiro relato sobre o uso de biorreatores para a propagação vegetal foi feito por Takayama e Misawa (1981) para micropropagação de begônia, a partir de segmentos nodais estabelecidos *in vitro*, de forma similar aos cultivos convencionais.

Os biorreatores foram inicialmente utilizados para a micropropagação nos EUA, Japão, Taiwan, Coréia, Cuba, Costa Rica, Holanda, Espanha, Bélgica e França (ZIV, 2000; RECH FILHO, 2004). Esses sistemas de cultivo vêm sendo utilizados na propagação de cana-de-açúcar (LORENZO *et al.*, 1998), batata (JIMÉNEZ *et al.* 1999), banana (ALVARD *et al.* 1993; LEMOS *et al.* 2001), orquídeas (PAEK *et al.* 2001), helicônia (RODRIGUES *et al.* 2006), café (ETIENNE *et al.* 2006), abacaxi (SILVA *et al.* 2007) entre outras espécies. Ziv (2005) descreve que o cultivo em biorreatores oferece inúmeras vantagens em relação ao sistema tradicional, na produção massal de mudas.

O desenvolvimento de novos protótipos de imersão temporária e/ou permanente, bem como o estudo de seu funcionamento em diferentes culturas é fundamental para tentar reduzir custos, aumentar a produtividade e manter a qualidade genética do material vegetal submetido a essa técnica (RODRIGUES, 2006).

Recentemente, os biorreatores começaram a ser utilizados para cultivo de células, tecidos, gemas e plântulas, tendo como objetivo final a produção de mudas em larga escala.

De acordo com Fogaça (2004) há uma tendência em se usar biorreatores de imersão temporária e/ou contínua com igual ou até maior eficiência no processo de multiplicação, além de diminuir custos, o que reduz consideravelmente a mão de obra e conseqüentemente os custos de produção das mudas. Além disso, os biorreatores podem ser colocados em câmaras de crescimento com alta luminosidade e elevado teor de gás carbônico para promover maior desenvolvimento das plantas e também maior resistência no processo de aclimatação das mesmas. Dessa forma este sistema pode ser utilizado para desenvolver culturas semi ou totalmente autotrófico, e assim reduzir ainda mais os custos (FIROOZABADY e GUTTERSON, 2003; ROELS *et al.* 2005). Entretanto, poucos biorreatores são usados na propagação comercial de plantas, devido à falta de experimentos e à complexa interação entre a fisiologia das plântulas cultivadas, nestas condições e o próprio equipamento que possibilita aeração do material vegetal *in vitro* (SILVA, 2006).

Conforme Ziv *et al.* (2003) a tecnologia proporcionada por este sistema de cultivo proporciona a produção de mudas em larga escala, com maior rapidez e eficiência em relação aos demais métodos convencionalmente utilizados. Paralelamente, há uma redução nos custos do processo, cuja função básica é promover condições ótimas de crescimento por meio da regulação de fatores químicos e, ou, físicos.

Existem diversos modelos de biorreatores que podem ser empregados no cultivo de tecidos vegetais. Ainda não há um consenso sobre em quais situações ou qual seria o melhor equipamento para o crescimento de material vegetal (SILVA, 2006). Os biorreatores podem ser divididos por categorias, de acordo com o funcionamento: mesas inclinadas e agitadores, imersão completa do material vegetativo com renovação do meio nutritivo; imersão parcial com mecanismo de renovação do meio de cultivo; imersão completa por mecanismo pneumático de transferência do meio de cultivo sem renovação do meio (ETIENNE e BERTHOULY, 2002; TEIXEIRA, 2002; WU, 2007).

No Brasil foram desenvolvidos, pelo menos dois sistemas de biorreatores para o cultivo de plantas, o biorreator de imersão temporária e o de imersão permanente, ambos desenvolvidos pela Embrapa, utilizando diversos tipos de plantas e explantes (CID *et al.* 2002; TEIXEIRA, 2002). A seguir, são apresentados equipamentos encontrados em revisão de literatura.

São eles:

A) Biorreator de aeração simples e coluna de bolha (*bubble column bioreactor*): Desenvolvido por Takayama *et al.* (1991), a relação altura/diâmetro de 1 a 2 define o biorreator de aeração simples e se a relação é 3 ou acima de, o biorreator é do tipo coluna de bolha (Figura 2).

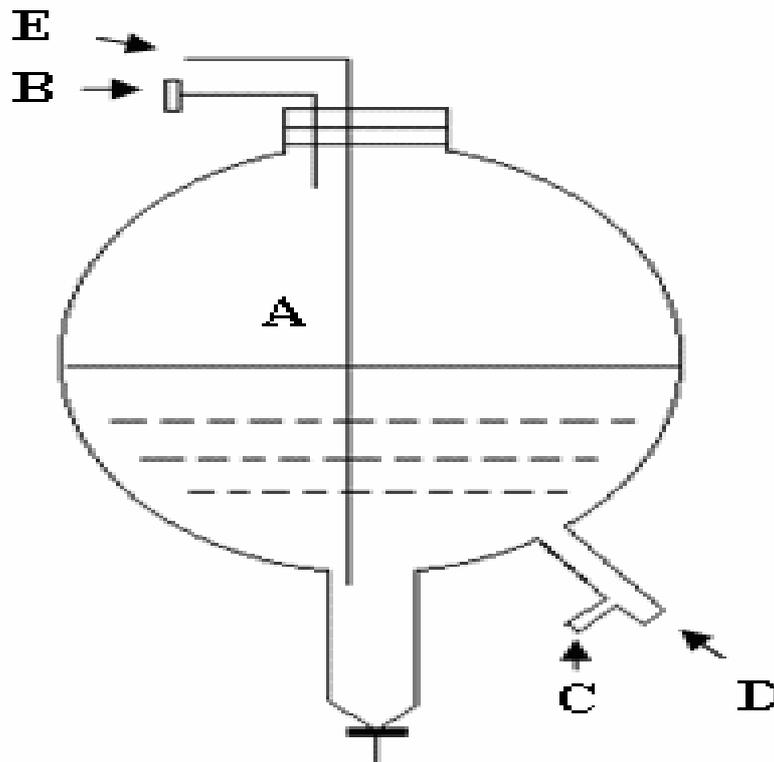


Figura 2: Biorreator 'column bioreactor'. A) Corpo de um biorreator tipo balão; B) Respiradouro do ar; C) Entrada de inoculo; D) Amostragem portuária; E) Câmbio médio porto.

B) Biorreator de imersão permanente (*permanent immersion systems*): São biorreatores composto por frascos de 500 a 1000 mL, com as tampas adaptadas para entrada e saída de ar, acoplados em filtros milipore (0,2 μm) ligados a um micro-compressor de ar aproximadamente ($3 \text{ L}/\text{min}^{-1}$) por meio de tubos de silicone até o fundo do frasco, onde produzirão bolhas de ar no meio de cultivo líquido (Figura 3).

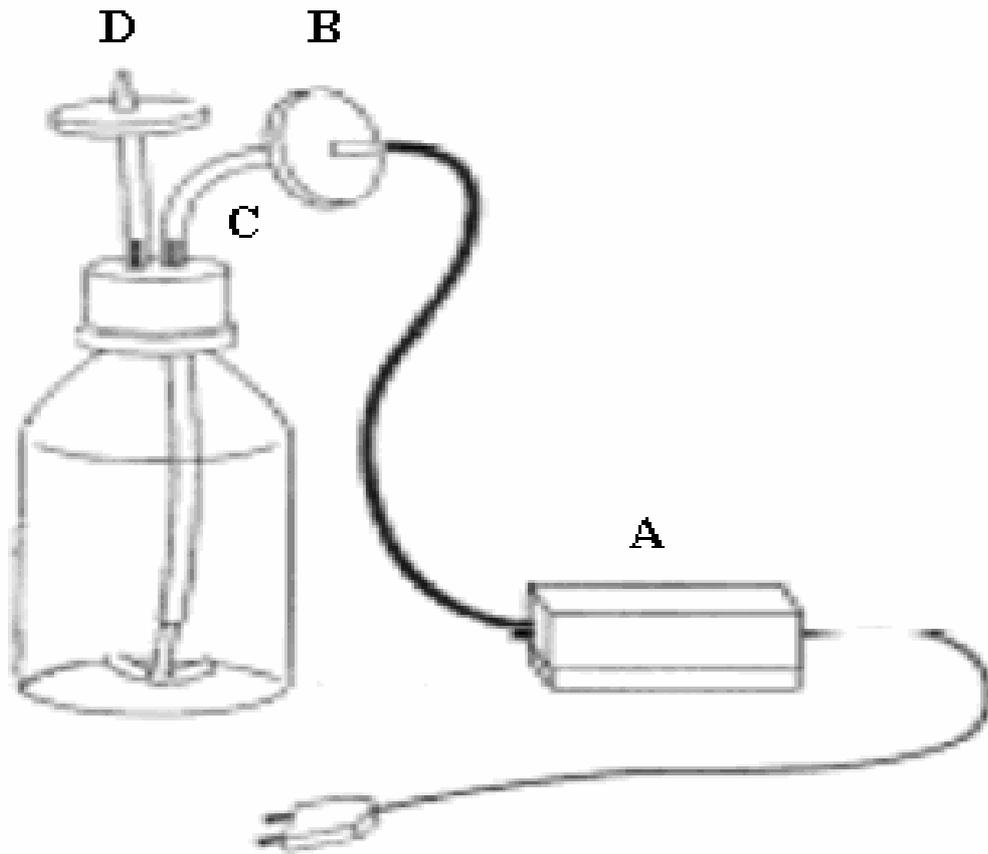


Figura 3: Esquema de um biorreator de imersão permanente BIPER. A): Bomba de ar; B) Filtro de ar; C) Entrada de ar; D) Saída de ar.

Fonte: Cid *et al.* (2002).

C) Biorreatores de imersão temporária (*temporary immersion systems*): São biorreatores de imersão temporária, o mais conhecido é o sistema R.I.T.A.[®] (*recipient for automated temporary system*), desenvolvido por Teisson e Alvard (1995) são relativamente simples e de fácil utilização, possibilitando o contato entre todas as partes dos explantes com a solução nutritiva, juntamente com a renovação da atmosfera do cultivo pela ventilação forçada promovida por compressor de ar (Figura 4).

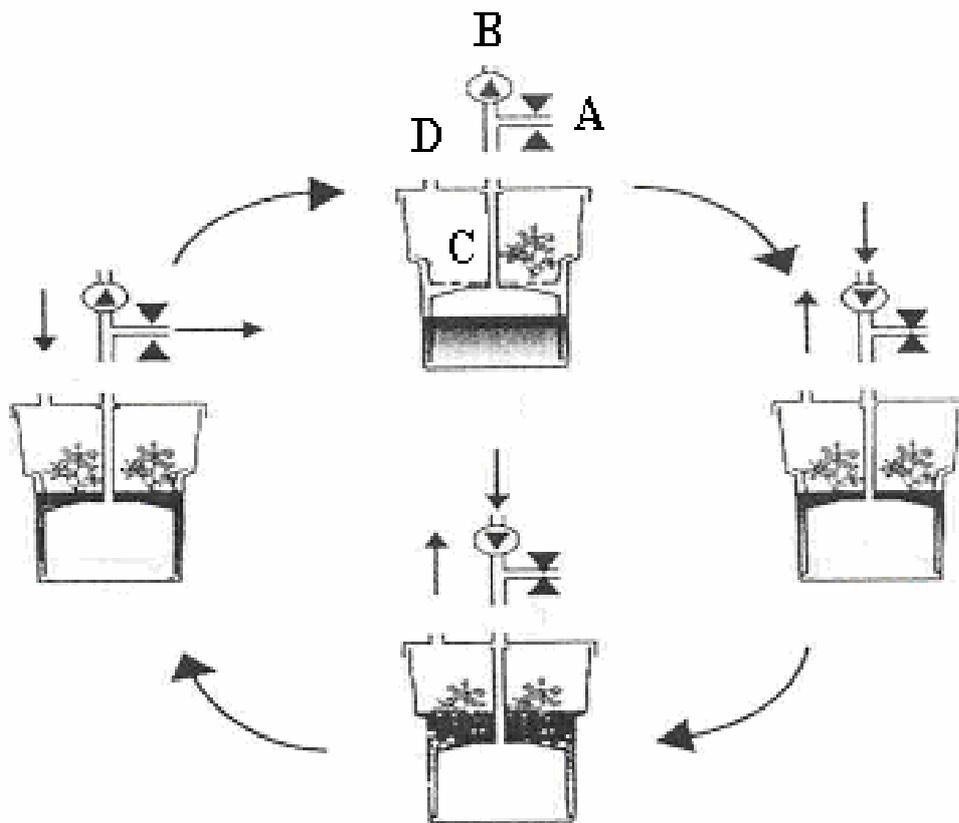


Figura 4: Biorreator de imersão temporária “R.I.T.A.®”. A): Filtro de ar; B) Entrada de ar; C) Estágio; D) Saída de ar.

Fonte: Teisson e Alvard (1995).

D) Biorreatores de imersão temporária “CENARGEN” (*temporary immersion systems*): São biorreatores que podem utilizar diferentes tipos de frascos, os quais podem variar em tamanho, formato, constituição, tipo de tampa, transparência. O equipamento pode ser utilizado para cultivo em regime de imersão temporária e/ou contínua (Figura 5).

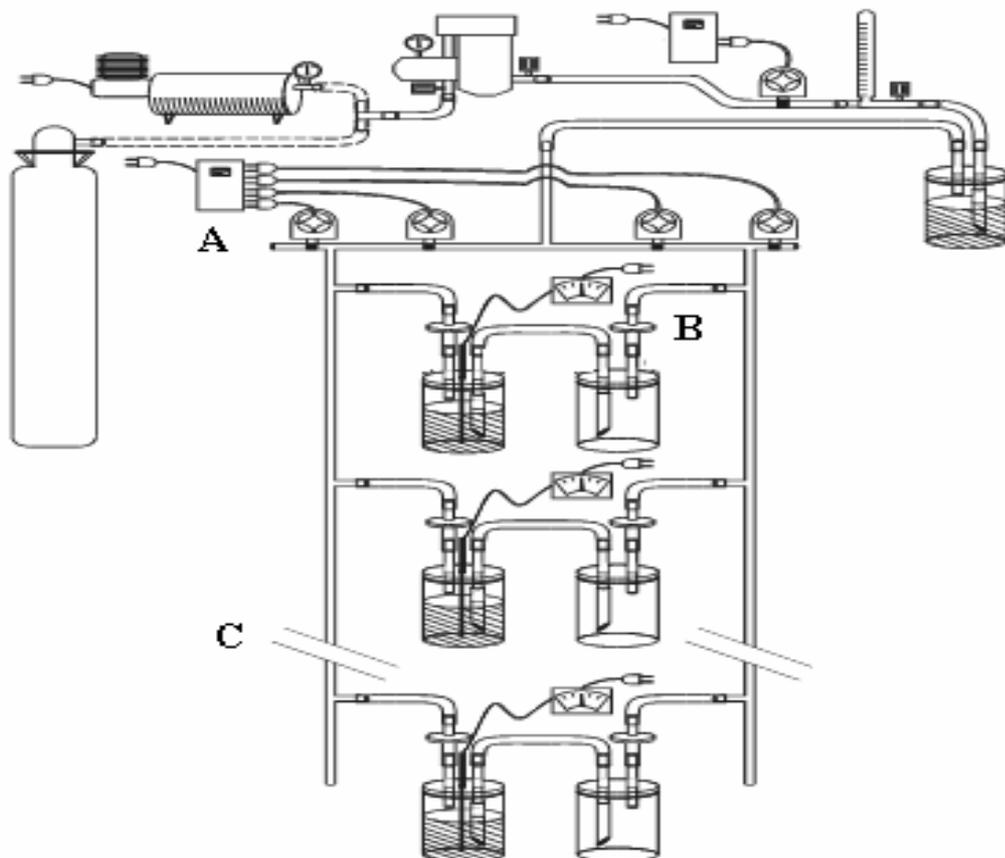


Figura 5: Sistema de biorreator de imersão temporária, desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A): Sistema completo (temporizador, rede de distribuição); B) Filtro de ar; C) Saída de ar.

Fonte: Teixeira (2002).

E) Biorreatores de imersão temporária zona de raiz (*TRI-bioreactor*): São biorreatores constituídos essencialmente de duas câmaras. A câmara inferior é utilizada como um reservatório para a solução nutritiva e a câmara superior para o cultivo (Figura 6).

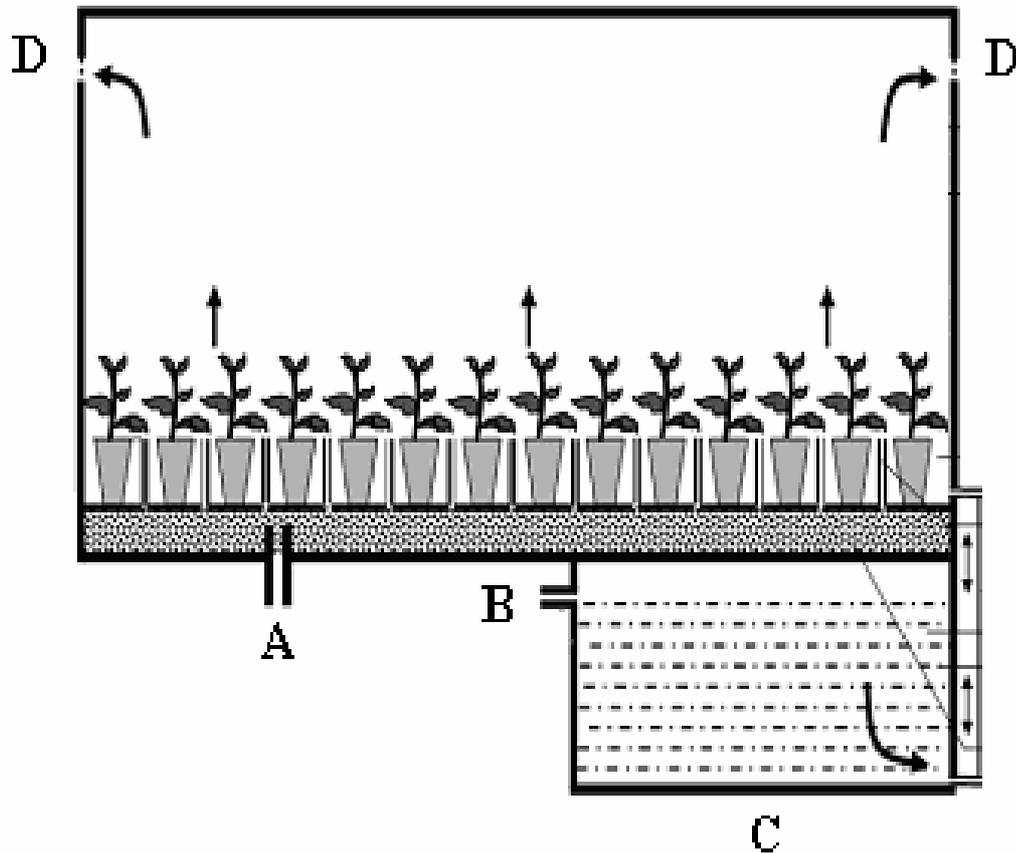


Figura 6: Biorreator de imersão temporária ‘TRI-bioreactor’: Biorreator com sistema de ventilação forçada. A): Entrada de ar; B) Temporizador; C) Reservatório; D) Saída de ar.
Fonte: Afreen *et al.* (2002).

F) Biorreatores de imersão temporária: São biorreatores desenvolvidos no laboratório de cultura de tecidos vegetais da BioCampo/UFRN, composto essencialmente de duas câmaras, a inferior é utilizada como um reservatório para a solução nutritiva e a câmara superior para o cultivo (Figura 7).

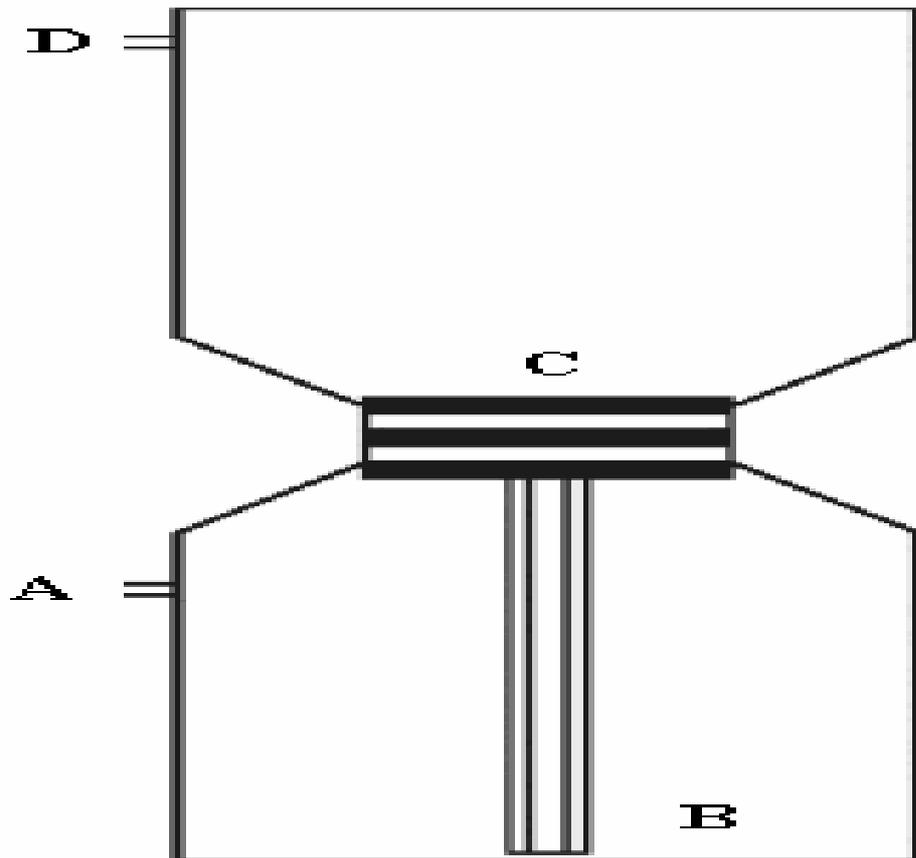


Figura 7: Biorreator de imersão temporária da BioCampo. A) Entrada de ar; B) Reservatório; C) Estágio; D) Saída de ar.

Fonte: Rodrigues *et al.* (2006).

REFERÊNCIAS

- AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: Development of a bioreactor for the large-scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. **Annals of Botany**. v. 9, p. 20-29, 2002.
- 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, 1993.
- CASTRO, C.; SILVA, M. L.; PINHEIRO, A. L.; JACOVINE, L. A. G. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Árvore**. v. 29, p. 241-249, 2005.
- CID, P. B.; CRUZ, A. R. R.; TEIXEIRA, J. M. Biorreatores de imersão permanente. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v. 25, p. 50-53, 2002.
- ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.69, p. 215–231, 2002.
- ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal Plant Physiol**. v. 18, p. 45-54, 2006.
- FIROOZABADY, E.; GUTTERSON, N. Costeffective in vitro propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**. v.21, p.844-850, 2003.
- FOGAÇA, L. A. Multiplicação de *Agapanthus umbellatus* var. minor em meio geleificado e em biorreator de imersão temporária (**Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais**), Universidade Federal de Santa Catarina, p. 120, 2004.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.34, p.1557-1563, 1999.
- JIMÉNEZ, E.; PÉREZ, N.; FERIA, M.; BARBÓN, R.; CAPOTE, A.; CHÁVEZ, M.; QUIALA, E.; PÉREZ, J. C. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 59, p.19–23.1999.
- LEMONS, 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**. v. 23, p. 482-487, 2001.
- LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.54, p.197-200, 1998.
- LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.C.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.55, p.79-83, 1998.

PAEK, K. Y.; HAHAN, E. J.; SON, S. H. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. **In vitro Cellular Developmental Biology Plant**. v.37, p.149-157, 2001.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; GLÓRIA, B. A.; ARAÚJO, A. R. B.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇAO, M. V.; FRANÇA, S. C. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant cell, tissue and organ culture**. v. 60, p. 47-53, 2000.

RECH FILHO, A. Sistemas de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas para a consolidação de protocolos para a micropropagação de bromélias. (**Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais**) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 74, 2004.

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**. v.65, p.29-35, 2006.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRÍGUEZ, R.; CANAL, M. J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** v. 82, p. 57-66, 2005.

SILVA, A. B. Biorreator e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro. (**Doutorado em Agronomia**), Universidade Federal de Lavras, p. 132, 2006.

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

SOCOL, C. R.; SCHEIDT, G. N.; MOHAN, R. Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. Universidade Federal do Paraná. Patente (**DEPR. 01508000078**). 03/03/ 2008.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shake culture. **Plant & Cell Physiology**. v. 22, p. 461-467, 1981.

TAKAYAMA, S.; SWEDLUND, B.; MIWA, U. Automated propagation of micro-bulbs of lilies. In: VASIL, I. K. (Ed). **Cell cultures and somatic cell genetics 8**. New york: Academic Press, p. 111-131, 1991.

TEISSON, C.; ALVARD, C. A new concept of plant in vitro cultivation liquid médium: temporary immersion. In: TERZI, M. (Ed.). **Current issues in plant molecular and celular biology**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers. p. 105-110, 1995.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Revista Ciência e desenvolvimento**. n. 24, p.36-41, 2002.

WU, C. K. Formação de Mudas e Microtubérculos de Batata (*Solanum tuberosum* L.) em Sistemas Biorreatores. (**Mestrado em Agricultura Tropical de Subtropical**), Instituto Agrônômico de Campinas, p. 83, 2007.

ZIV, M. Bioreactor Technology for plant micropropagation. **Horticultural Reviews**. v.24, p.1-30, 2000.

ZIV, M. Simple bioreactor for mass propagation of plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 81, p. 277-285, 2005.

ZIV, M.; CHEN, J. VISHNEVETSKY, J. Propagation of Plants in Bioreactors: Prospects and Limitations. In: ECONOMOU, A.S.; READ, P.E. (Eds) Proc 1^a IS on Accl. & Estab. Microprop. Plants, **Acta Horticulturae**. v. 616, p.85-93, 2003.

CAPÍTULO II

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* DA CULTURA DO ABACAXIZEIRO

RESUMO

Novas tecnologias de cultivo *in vitro* vêm sendo amplamente estudadas, visando aperfeiçoar e baixar o custo na produção das mudas que tenham interesse agrônomo. O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de *Ananas comosus* L. Merrill. Para tanto, o crescimento *in vitro* das plântulas foi promovido em sistemas de biorreatores (B.I.B.[®] e R.I.T.A.[®]) com ciclo de imersão a cada 2 horas por 15 minutos e o sistema tradicional em frascos de 200 mL. Todos os sistemas de cultivo, utilizam solução nutritiva líquida (MS), suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,5 µL de Tween[®] 20, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 120°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento durante 30 dias, temperatura controlada de 25±2°C, sob luz branca fria (35 µmol.m⁻².s⁻¹), com 16 horas de fotoperíodo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos, três repetições e dez brotos por estágios. Dentre os sistemas avaliados, o biorreator de imersão por bolhas apresentou os melhores resultados dentre as variáveis analisadas, com destaque ao número total de brotações (139), propiciando um aumento significativo de 2,3 vezes superior quando comparado com o sistema (R.I.T.A.[®]) e 3,1 ao sistema tradicional. Portanto, o sistema de imersão por bolhas torna-se um equipamento eficaz na produção de mudas de abacaxizeiro em larga escala.

Palavras-chave: Biorreatores, *Ananas comosus*, micropropagação.

COMPARISON OF DIFFERENT *IN VITRO* CULTURE SYSTEMS FOR PINEAPPLE

ABSTRACT

New techniques of *in vitro* cultivation are being object of many studies around the world, in order to optimize and decrease the costs of the production of seedlings with agronomical interest. The main goal of this work was to compare different *in vitro* cultivation systems using *Ananas comosus* L. Merrill. *In vitro* growth of the plantlets was promoted in two different bioreactors: Bioreactor of Immersion by Bubbles (B.I.B.[®]) and Reactor of Temporary Immersion (R.I.T.A.[®]) with immersion cycle at every 2 hours for 15 minutes and the traditional system in flasks of 200 mL. All cultivation systems used MS liquid nutritive solution, supplemented with BAP 1 mgL⁻¹, ANA 0.25 mgL⁻¹, sucrose 30 gL⁻¹ and Tween[®] 20, 0.5 µL. The pH was adjusted to 5.8 and sterilized at 120°C for 15 minutes. The cultures were kept into a growth room during 30 days, with controlled temperature of 25±2°C, under white cold light (35 µmol.m⁻².s⁻¹), with photoperiod of 16 hours. The experimental design used was the randomized, with three treatments, three repetitions and ten shoots each stage. Among the evaluated systems, the bioreactor of immersion in bubbles showed the best results among the variables analyzed, with emphasis on the total number of shoots (139), providing a significant increase of 2.3 times higher when compared with the R.I.T.A.[®] system and 3.1 times higher than the traditional system. Therefore, the system of immersion by bubbles is an effective equipment to produce seedlings of pineapple on large scale.

Keywords: Bioreactors, *Ananas comosus*, micropropagation.

INTRODUÇÃO

Originário da América do Sul, o abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) é uma planta monocotiledônea, herbácea e perene da família Bromeliácea. Encontra-se distribuída entre 15 °N a 30 °S de latitude e 40 °L a 60 °W de longitude, correspondendo na América do Sul às regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, Norte da Argentina e do Paraguai (COLLINS, 1960). De acordo com o IBGE (2008), a safra de abacaxi no Brasil foi de 1.810.074 mil frutos em 82.719 hectares em 2007, e estimativa de produção de 2.024.541 mil frutos em 78.706 hectares em 2008, com uma queda de 4,85% de área plantada e um aumento de 11,85% na produtividade final, tornando-se o segundo maior produtor mundial. Em termos nacionais, o Estado de Pará é o principal produtor (15.525 ha), seguido pela Paraíba (13.110 ha), Bahia (10.636 ha) e Minas Gerais (10.522 ha), ocorrendo ainda, crescimento expressivo de cultivo no sul do Pará e Tocantins. Constata-se que a área cultivada vem crescendo a cada ano, em virtude da incorporação de novas técnicas, dando uma importante contribuição à geração de renda e emprego, portanto, à fixação do homem no campo.

Os primeiros trabalhos com micropropagação do abacaxizeiro foram realizados por Aghion e Beauchesne (1960). Entretanto, o primeiro relato sobre o uso de biorreatores para a propagação vegetal foi idealizado por Takayama e Misawa (1981) para a micropropagação de begônia.

Teisson e Alvard (1995) propuseram o cultivo de plantas em sistema de imersão temporária. O mesmo sistema vem sendo utilizado na Ásia, Europa, América do Norte e do Sul, na propagação de plantas que tenham interesse agrônômico, com destaque as espécies florestais, frutíferas e ornamentais.

De acordo com Rech Filho (2004) os sistemas de cultivo em biorreatores podem ser divididos em contínuos ou temporários. Teixeira (2002) relata que estes equipamentos utilizam meio de cultura líquido e permitem a renovação do ar durante o cultivo, bem como o monitoramento de alguns parâmetros essenciais ao crescimento do propágulo, tais como pH, oxigênio dissolvido, temperatura e concentração de íons.

Os sistemas de biorreatores em geral têm sido uma opção a ser considerada quando se deseja aumentar a propagação em larga escala, bem como diminuir o custo de produção de mudas originárias de embriões somáticos, suspensões celulares ou órgãos inteiros (SILVA *et al.* 2007). Diversos autores relatam com sucesso o uso de biorreatores em inúmeras espécies, como bananeira (LEMOS *et al.* 2001) cana-de-açúcar (LORENZO *et al.* 1998), orquídea (PAEK *et al.* 2001) e abacaxizeiro (ESCALONA *et al.* 1999; GUERRA *et al.* 1999; FEUSER *et al.* 2001; SILVA *et al.* 2007). Lemos *et al.* (2001) descrevem que o sistema de cultivo em

biorreatores aumenta consideravelmente sua produtividade e acelera seu desenvolvimento, devido o contato e a absorção dos nutrientes, uma vez que os nutrientes podem ser absorvidos pelas folhas, caules e raízes.

O biorreator de imersão por bolhas desenvolvido e patenteado por (SOCCOL *et al.* 2008) representa uma nova alternativa no cenário de produção *in vitro* de mudas, uma vez que é um sistema de fácil confecção e manipulação, conseqüentemente de baixo custo, outra vantagem a ser considerada é a possibilidade de utilizar vários estágios de desenvolvimento simultaneamente para propagar linhas celulares distintas. Em tese, as plantas absorvem mais nutrientes no sistema de imersão por bolhas do que no tradicional e, conseqüentemente, aumenta a produtividade final, reduzindo o custo de plantas por unidade.

O presente trabalho teve como objetivo principal comparar diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de abacaxizeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Fonte de explantes

Plântulas de abacaxizeiro *Ananas comosus* L., utilizados no experimento foram obtidos a partir do estabelecimento *in vitro* de gemas axilares em solução nutritiva líquida MS (MURASHIGE e SKOOG 1962), suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose o pH ajustado para 5,8. Os cultivos foram conduzidos em sala de crescimento por 60 dias, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C e irradiância de 35 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo “branca-fria”. Trinta dias antes da instalação deste experimento, as brotações foram individualizadas e transferidas para meio (MS) com a metade da concentração dos sais e vitaminas, sob as mesmas condições descritas anteriormente. As plantas enraizadas, com aproximadamente 1,0 cm de altura foram selecionadas e transferidas para os diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

Experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, durante o ano de 2007/2008.

Os tratamentos testados foram três diferentes sistemas de cultivo: A) Sistema tradicional (controle) em frascos de vidro de 200 mL; B) biorreator com sistema R.I.T.A.[®]; C)

biorreator com sistema B.I.B.[®], ambos os sistemas com ciclos de aeração a cada 2 horas por 15 minutos.

Neste experimento foi utilizada solução nutritiva líquida MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 mg L⁻¹ de tiamina e 0,5 µL L⁻¹ de Tween[®] 20, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 120°C por vinte minutos. Foram utilizados 200 mL de meio de cultura nos sistemas de cultivo em biorreatores e 200 mL no sistema tradicional (controle). Os cultivos foram conduzidos em sala de crescimento por 30 dias, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C e irradiância de 35 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo “branca-fria”. Neste trabalho, foi utilizado um número inicial de 10 brotos por tratamento.

O sistema R.I.T.A.[®] (Figura 8): “*Recipiente de Imersão Temporária Automatizada*”, desenvolvido por Teisson e Alvard (1995) é constituído por dois compartimentos, um superior e um inferior conectados entre si por mangueiras de silicone. Segundo Malosso (2007) o sistema tem sido utilizado por biofábricas na produção de várias espécies, com destaque banana, citros, café, abacaxi e cana-de-açúcar, obtidos com sucesso tanto por organogênese como por embriogênese somática.

O sistema B.I.B.[®] (Figura 8): “*Biorreator de Imersão por Bolhas*”, desenvolvido por Soccol *et al.* (2008) pode ser utilizado para a produção de espécies frutíferas, ornamentais e florestais. O equipamento é confeccionado com vidro temperado em formato cilíndrico, tem dois compartimentos, que é dividido transversalmente por uma placa porosa de 170 a 220 µm. A parte inferior possui 3,5 cm de altura, e nela encontra-se um orifício para a entrada do ar, e a parte superior possui 24,5 cm de altura e neste compartimento são inseridos os estágios entre 2 a 5 cm de altura cada, todos os componentes internos são de aço inox. O biorreator totaliza 28 cm de altura com 9 cm de diâmetro, mas pode ser alterada conforme a necessidade da empresa ou instituição. O equipamento funciona a partir de um sistema interligado por tubos de borracha flexível, a solução nutritiva passa do compartimento inferior (pré-estágio) para os estágios superiores por meio da injeção de ar no compartimento inferior. Quando a solução nutritiva passa para o compartimento superior, ocorre a aeração e a solução nutritiva entra em contato com o material em cultivo.

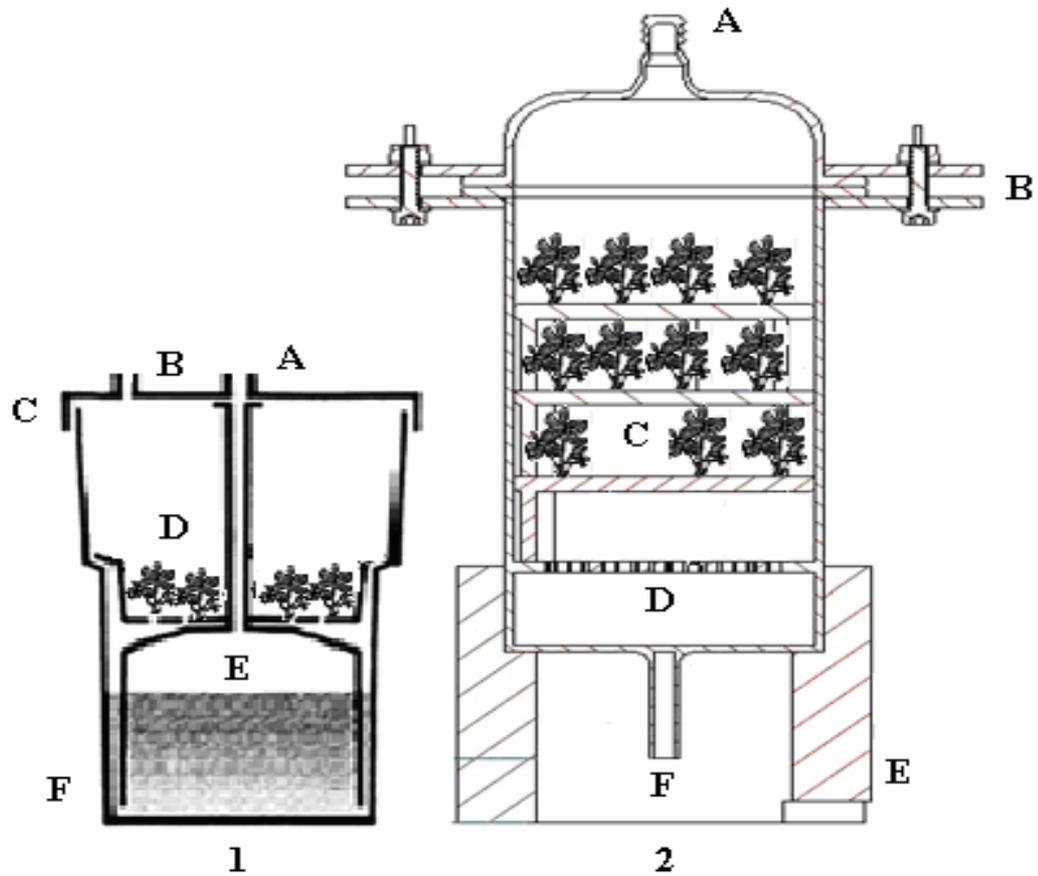


Figura 8: Desenho esquemático dos biorreatores de imersão.

Fig. 1 (R.I.T.A.®): A): Entrada de ar, B): Saída de ar, C): Tampa, D): Suporte para o cultivo, E): Base interna, F): Frasco.

Fonte: Teisson e Alvard (1995).

Fig. 2 (B.I.B.®): A): Saída de ar, B): Kit fixação, C): Estágios, D): Placa porosa, E): Base, F): Entrada de ar.

Fonte: Soccol *et al.* (2008).

Variáveis avaliadas

Após 30 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis:

A) Número total de brotações (NTB) por plantas; B) Número médio de lançamentos foliares (NMLF); C) Número médio das raízes (NMR): Foi estimado com o auxílio do equipamento WINRHYZO®; D) Altura média das plantas (AMP); E) Número de brotações por estágios (NBE); F) Massa fresca total (MFT); G) Incremento da massa fresca (IMF): Obtido pelo quociente entre a massa fresca final e a massa fresca inicial; H) Massa seca total (MST).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e três repetições e dez brotos por estágios. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados foram processados com o auxílio do programa computacional ESTATÍSTICA, de acordo com Ribeiro Júnior (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o sistema de imersão por bolhas estimulou a proliferação de brotos 2,3 vezes superior quando comparado ao sistema de recipiente de imersão temporária automatizada (R.I.T.A.[®]) e 3,1 vezes superior do que o sistema tradicional após 30 dias de cultivo (Tabela 1). Em relação às demais variáveis, o sistema de imersão por bolhas apresentou os melhores desempenhos, com destaque ao número médio das raízes 15,52. Constatou-se que, quanto ao número médio de lançamentos, foliares não houve diferença significativa entre os dois sistemas de imersão. Silva *et al.* (2007) descrevem que os sistemas de imersão são mais apropriados ao crescimento de explantes em cultivo líquido, outro fator relevante, é a homogeneização da solução nutritiva e o tempo de aeração que os biorreatores proporcionam. Segundo Etienne e Bertholy (2002) os sistemas apresentam os melhores resultados para o cultivo de gemas e embriões para a produção de mudas, tais como cana-de-açúcar, banana, abacaxi, orquídeas e outras espécies que despenham interesse agrônomo.

Tabela 1: Número total de brotações (NTB), número médio de lançamentos foliares (NMLF), número médio das raízes (NMR) e altura média das plantas (AMP) de *Ananas comosus* L. Merrill após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas.

Tratamentos	NTB	NMLF	NMR	AMP (cm)
B.I.B.[®]	139 ^b	3,91 ^b	15,52 ^b	2,78 ^a
R.I.T.A.[®]	59 ^a	3,14 ^a	11,34 ^a	2,69 ^a
Tradicional	45 ^a	3,77 ^b	12,49 ^a	2,56 ^a

Tratamentos com Letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Outro fator que parece favorecer o crescimento dos explantes nos biorreatores é a constante renovação do ar durante o período de transferência do meio (LEMOS *et al.* 2001). Segundo Debergh (1982) quanto maior a área de contato dos explantes com a solução

nutritiva, maior a absorção dos seus compostos nutricionais e, conseqüentemente, a taxa de crescimento será maior.

A maior eficiência do sistema de imersão por bolhas no tocante ao aproveitamento do espaço pode ser observada na (Figura 9), em que o sistema proporcionou maior proliferação de brotos no primeiro estágio, com uma média de 57 brotações. A produtividade de cada estágio no sistema de cultivo de imersão por bolhas é equivalente à produção do sistema (R.I.T.A.[®]).

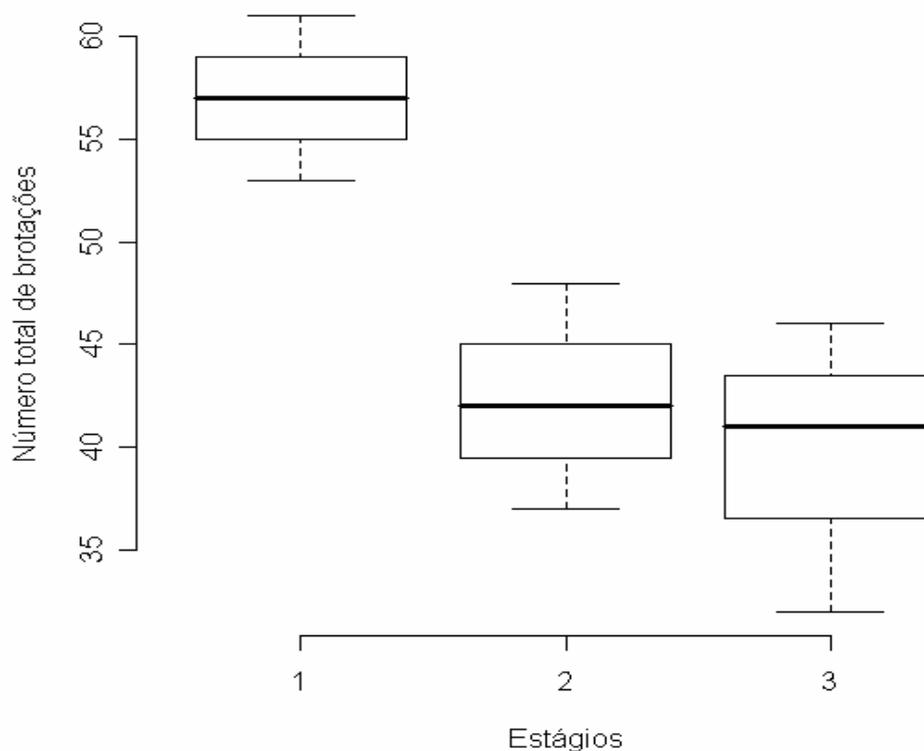


Figura 9: Número mediano de brotações com a utilização do biorreator de imersão por bolhas, em três estágios.

Constata-se na (Tabela 2), que não houve diferença significativa entre os sistemas testados para a variável massa fresca total, entretanto, o sistema de imersão por bolhas proporcionou o melhor resultado, para a massa seca total 0,323 g. Silva *et al.* (2007) constataram que o sistema de imersão temporária estimulou uma quantidade superior à proliferação de brotos, bem como maior volume de biomassa de abacaxi, quando comparado com o sistema tradicional. Escalona *et al.* (1999) obtiveram uma redução de 20% dos custos de produção, propagando abacaxi em biorreatores de imersão. Lorenzo *et al.* (1998) observaram que no sistema de imersão temporária, houve um aumento a taxa de multiplicação

de 23,9 brotos em 30 dias e seis vezes superior ao sistema tradicional para cana-de-açúcar. Contudo, Cervelli e Senaratna (1995) descrevem que a propagação de células, embriões ou órgãos vegetais utilizando sistemas de cultivo em biorreatores aumenta a produtividade e reduz os custos em torno de 24% a 35% por unidade produzida.

Tabela 2: Massa fresca total (MFT), massa seca total (MST) e incremento da massa fresca (IMF) de *Ananas comosus* L. Merrill após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas.

Tratamentos	MFT (g)	MST (g)	IMF (x)
B.I.B. [®]	26,45 ^a	0,323 ^a	2,80 ^a
R.I.T.A. [®]	24,36 ^a	0,243 ^b	2,72 ^a
Tradicional	23,59 ^a	0,157 ^b	1,97 ^b

Tratamentos com Letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O sistema de imersão por bolhas apresenta uma área de contato superior aos demais sistemas avaliados, bem como estágios que aumentam sua capacidade de propagação. Outra vantagem está relacionada ao espaço interno que o sistema proporciona, uma vez que este equipamento totaliza aproximadamente 155,86 cm³ podendo ser alterado conforme a necessidade (Figura 10 A e B). Outro aspecto que deve ser observado refere-se ao fato das plantas cultivadas *in vitro*, dadas às condições de umidade e luminosidade a que são submetidas nesta fase, sofressem alterações fisiológicas e morfológicas durante seu desenvolvimento. Bandeira *et al.* (2007) descrevem que plantas oriundas do sistema de imersão por bolhas, sob as mesmas condições de temperatura 25±2°C e irradiância de 35 μmol.m⁻².s⁻¹, apresentaram maior multiplicação de brotos e conseqüentemente plantas vigorosas. Radmann *et al.* (2001) observaram efeitos positivos na qualidade de *Gypsophila paniculata* L. cultivadas sob condições fotoautótrofas, ou seja, sob alta densidade de fluxo luminoso, além de serem mais vigorosas, eram mais facilmente aclimatizadas, visto que estariam sujeitas as menores alterações no ambiente físico, fisiológico e nutricional, quando da transferência da condição *in vitro* para *ex vitro*.



Figura 10: Explantes de *Ananas comosus* L. cultivados em sistemas de biorreatores (B.I.B.[®] e R.I.T.A.[®]) e sistema tradicional, após 30 dias de cultivo. Mostrando as fases de (A): Imersão; (B): Emersão.

Portanto, o sistema de imersão por bolhas representa uma nova alternativa no cenário de produção de espécies ornamentais, permitindo uma boa nutrição, luminosidade e aeração homogênea, conseqüentemente maior produtividade.

CONCLUSÕES

O sistema de imersão por bolhas é o método mais eficiente para a propagação em larga escala de abacaxi, dentre os sistemas avaliados.

Devido à grande adaptabilidade do equipamento a diversas espécies vegetais, o sistema de imersão por bolhas é eficaz em outros setores de desempenham interesse agrônomo, tanto na fruticultura quanto na produção de espécies florestais.

REFERÊNCIAS

- AGHION, D.; BEAUCHESNE, G. Utilization de la technique de culture sterile d'organes pour des clones d'*Ananas*. **Fruits**. v.15, p.464-466, 1960.
- BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; LANI, E. R. G. Aclimatização ex vitro de plantas propagadas pela enxertia in vitro de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**. v. 31, n. 5, 2007.
- CERVELLI, R.; SENARATNA, T. Economic analysis of automated embryogenesis. p. 29–64. In: J. AITKEN-CHRISTIE, T. KOZAI, and M. A. L. Smith (eds.), Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, **The Netherlands**, 1995.
- COLLINS, J. L. The pineapple. Botany, cultivation and utilization. New York, **Interscience Publishers**. p. 294, 1960.
- DEBERGH, P. C. Physical properties of culture media. In: **Plant Tissue Culture**. p. 135-136, 1982.
- ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; DANQUITA, M.; GONZALES, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G. Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**. v.18, p.743-748, 1999.
- ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.69, p.215-231, 2002.

FEUSER, S.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.23, p.006-010, 2001.

GUERRA, M. P.; DALVESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.34, p.1557-1563, 1999.

IBGE. **Levantamento Sistemático de Produção Agrícola (LSPA)**. Rio de Janeiro: IBGE-IBGE Sistema de recuperação automática-SIDRA. Disponível em: (<http://www.ibge.gov.br>), acesso: 27/09/2008.

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**. v. 23, p. 482-487, 2001.

LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B.L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.54, p.197-200, 1998.

MALOSSO, M. G. Micropropagação de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN e estabelecimento de meio de cultura para a conservação desta espécie em banco de germoplasma *in vitro*. Tese (**Doutorado em Biotecnologia**), Universidade Federal do Amazonas, p. 101, 2007.

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

PAEK, K. Y.; HAHAN, E. J.; SON, S. H. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. **In vitro Cellular Developmental Biology Plant**. v.37, p.149-157, 2001.

RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.7 n.3 171-175. 2001.

RECH FILHO, A. Sistemas de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas para a consolidação de protocolos para a micropropagação de bromélias. (**Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais**) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 74, 2004.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no Excel: guia prático**. Ed. Visoça, p. 251, 2005.

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

SOCCOL, C. R.; SCHEIDT, G. N.; MOHAN, R. Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. Universidade Federal do Paraná. Patente (**DEPR. 01508000078**). 03/03/ 2008.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of Begonia hiemalis plantlets by shake culture. **Plant & Cell Physiology**. v. 22, p. 461-467, 1981.

TEISSON, C.; ALVARD, C. A new concept of plant in vitro cultivation liquid médium: temporary immersion. In: TERZI, M. (Ed.). **Current issues in plant molecular and celular biology**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers. p. 105-110, 1995.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Revista Ciência e desenvolvimento**. v. 24, p.36-41, 2002.

CAPÍTULO III

COMPARAÇÃO DE SISTEMAS DE MICROPROPAÇÃO *IN VITRO* DE ORQUÍDEAS *Oncidium leucochilum*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes sistemas de micropropagação *in vitro* de orquídea *Oncidium leucochilum*. Os tratamentos utilizados foram micropropagação em biorreatores (R.I.T.A.[®] e B.I.B.[®]) ambos os sistemas com ciclos de aeração a cada 2 horas por 30 minutos e o sistema tradicional. Utilizou-se solução nutritiva líquida (MS), suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de ANA e 0,3 µL L⁻¹ de Tween[®] 20, pH ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com 25±2°C, sob luz branca fria (35 µmol.m⁻².s⁻¹), com 16 horas de fotoperíodo. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três tratamentos, três repetições de vinte plantas. Após 45 dias de cultivo, constata-se o sistema de cultivo de imersão por bolhas foi superior quanto ao número total de brotações (6,56), incremento de massa fresca (5,7 g), massa seca total (0,59 g) e altura da parte aérea (1,87 cm). Portanto o biorreator de imersão por bolhas apresenta-se como um equipamento eficaz na produção de mudas de *Oncidium leucochilum* em larga escala.

Palavras-chave: Biorreatores, micropropagação, *Oncidium leucochilum*.

COMPARISSON OF *IN VITRO* CULTIVE SYSTEMS FOR ORCHID

Oncidium leucochilum

ABSTRACT

The objective of this work was to compare different systems of micropropagation *in vitro* of *Oncidium leucochilum* orchids. The method utilized was micropropagation in the bioreactors R.I.T.A.[®] and B.I.B.[®], both with aeration cycles at every 2 hours for 30 minutes and the traditional system. In this work was used nutrient solution liquid (MS) medium supplemented with 1 mg L⁻¹ of BAP, 0.25 mg L⁻¹ of ANA and 0.3 µL of Tween[®] 20, pH adjusted to 5.8. Cultures were kept in a growth room with 25±2°C, under cool white light (35 µmol.m⁻².s⁻¹), with 16 hours of photoperiod. The design was entirely randomized, with 3 treatments and 3 repetitions of 20 plants. After 45 days of cultivate, the immersion by bubbles cultivate system presented better yield and eventually better performance concerning to the total number of shoots (6.56), fresh mass increment (5.7 g), dry mass (0.59 g), aerial part height (1.87 cm) and root length (1.54 cm). Therefore, the bioreactor of immersion by bubbles is as efficient equipment for the production of *Oncidium leucochilum* seedlings on large scale.

Keywords: Bioreactors, micropropagation, *Oncidium leucochilum*.

INTRODUÇÃO

A família *Orchidaceae* corresponde ao maior grupo das angiospermas, estima-se um número superior de 35.000 espécies nativas, dentre as quais 910 são do gênero *Oncidium*, com centenas de espécies e milhares de híbridos produzidos, apresenta distribuição cosmopolita, entretanto é nas regiões tropicais onde é encontrada a maior diversidade. A *Oncidium leuchochilum* é uma espécie nativa do México, Guatemala e Honduras, ocorre principalmente em florestas úmidas e altitudes variáveis de 500 a 2.000 metros, de fácil cultivo *in vitro*, e devido às suas características é muito utilizada para a obtenção de híbridos, com vistas de interesse comercial (HÁGSATER *et al.* 2005).

De acordo com Zanenga-Godoy e Costa (2003) o cultivo comercial de espécies ornamentais representa uma atividade de grande importância econômica no agronegócio florícola mundial, devido, a grande capacidade de combinação genética, beleza e forma de suas flores (POMPELLI *et al.* 2007).

Apesar de bastante utilizado e difundido, o cultivo *in vitro* de espécies e híbridos de orquídeas ainda necessita de otimizações, visto que em alguns casos, têm-se observado o lento crescimento e desenvolvimento das plântulas (MORAES *et al.* 2004). Nesse sentido, alguns procedimentos podem favorecer a eficiência do processo produtivo de micropropagação de plantas, como observado para abacaxizeiro, macieira, cafeeiro e eucaliptos. Segundo Altafin *et al.* (2003) a propagação *in vitro* é uma técnica muito utilizada na multiplicação de plantas livres de doenças e com características de resistência a pragas e patógenos, embora geralmente de custo elevado, tem uma capacidade produtiva elevadíssima e com resultado mais seguro e por isto vem sendo preferida pelos viveiros comerciais (BOSA *et al.* 2003; FIGUEIREDO *et al.* 2008).

Rodrigues *et al.* (2006) descrevem que o desenvolvimento de novos protótipos de biorreatores e o estudo de seu funcionamento em diferentes culturas é fundamental para aumentar a produtividade e manter a qualidade genética do material vegetal submetido a técnica. Portanto, o emprego de biorreatores em cultivo líquido permite a micropropagação em larga escala, possibilita a automação do processo e, conseqüentemente, redução de trabalho e principalmente dos custos por muda produzida (ROELS *et al.* 2006; SILVA *et al.* 2007).

O método de cultivo em biorreatores de imersão por bolhas temporária e/ou permanente, desenvolvido e patenteado por Soccol *et al.* (2008) viabiliza a clonagem de várias espécies, ou seja, permite a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta matriz, com monitoramento e controle

das condições de cultivo e menor manipulação das culturas, bem como acelera o ciclo de produção, reduz o custo e aumenta a produtividade.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes sistemas de micropropagação *in vitro* de orquídeas *Oncidium leuchochilum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Fonte de explantes

Plântulas de *Oncidium leuchochilum* provenientes de semeadura *in vitro* na solução nutritiva (MS) solidificado, foram utilizadas para a realização do experimento. As brotações encontravam-se em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiância de $35\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes do tipo “branca-fria”. Trinta dias antes da instalação deste experimento em biorreatores, as plantas foram individualizadas e transferidas para a solução nutritivas MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com a metade da concentração dos sais, vitaminas completas e $6\ \text{g L}^{-1}$ de ágar, sob as mesmas condições descritas anteriormente. As plantas enraizadas, com aproximadamente 0,5 cm de altura, foram selecionadas e transferidas para os diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

Experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, durante o ano de 2007/2008.

Os tratamentos testados foram três diferentes sistemas de cultivo: A) Sistema tradicional (controle) em frascos de vidro de 200 mL; B) biorreator com sistema R.I.T.A.[®]; C) biorreator com sistema B.I.B.[®], ambos os sistemas com ciclos de aeração a cada 2 horas por 15 minutos.

Neste experimento foi utilizado solução nutritiva líquida MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com $1\ \text{mg L}^{-1}$ de BAP, $0,25\ \text{mg L}^{-1}$ de ANA, $30\ \text{g L}^{-1}$ de sacarose, $1\ \text{mg L}^{-1}$ de tiamina e $0,5\ \mu\text{L L}^{-1}$ de Tween[®] 20, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 120°C por vinte minutos. Foram utilizados 200 mL de solução nutritiva nos sistemas de cultivo em biorreatores e 20 mL no sistema tradicional (controle). Os cultivos foram conduzidos em sala de crescimento por 45 dias, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiância de $35\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes

do tipo “branca-fria”. Neste trabalho, foi utilizado um número inicial de 10 plantas por tratamento, exceto o biorreator de imersão por bolhas que utilizou dois estágios, totalizando 10 plantas por estágios.

O sistema R.I.T.A.[®] (Figura 11): “*Recipiente de Imersão Temporária Automatizada*”, desenvolvido por Teisson e Alvard (1995) é constituído por dois compartimentos, um superior e um inferior conectados entre si por mangueiras de silicone. Segundo Malosso (2007) o sistema tem sido utilizado por biofábricas na produção de várias espécies, com destaque banana, citros, café, abacaxi e cana-de-açúcar, obtidos com sucesso tanto por organogênese como por embriogênese somática.

O sistema B.I.B.[®] (Figura 11): “*Biorreator de Imersão por Bolhas*”, desenvolvido por Soccol *et al.* (2008) pode ser utilizado para a produção de espécies frutíferas, ornamentais e florestais. O equipamento é confeccionado com vidro temperado em formato cilíndrico, tem dois compartimentos, que é dividido transversalmente por uma placa porosa de 170 a 220 μm . A parte inferior possui 3,5 cm de altura, e nela encontra-se um orifício para a entrada do ar, e a parte superior possui 24,5 cm de altura e neste compartimento são inseridos os estágios entre 2 a 5 cm de altura cada, todos os componentes internos são de aço inox. O biorreator totaliza 28 cm de altura com 9 cm de diâmetro, mas pode ser alterada conforme a necessidade da empresa ou instituição. O equipamento funciona a partir de um sistema interligado por tubos de borracha flexível, a solução nutritiva passa do compartimento inferior (pré-estágio) para os estágios superiores por meio da injeção de ar no compartimento inferior. Quando a solução nutritiva passa para o compartimento superior, ocorre a aeração e contato com o material em cultivo.

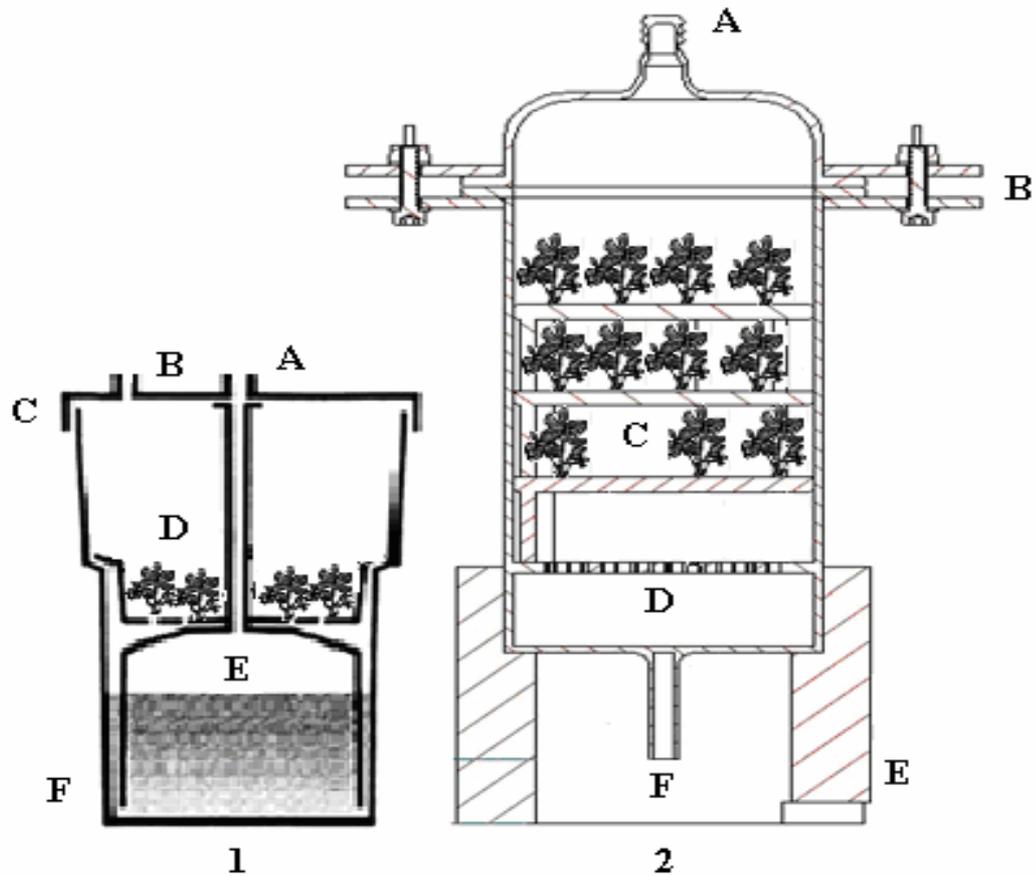


Figura 11: Desenho esquemático dos biorreatores de imersão.

Fig. 1 (R.I.T.A.®): A): Entrada de ar, B): Saída de ar, C): Tampa, D): Suporte para o cultivo, E): Base interna, F): Frasco.

Fonte: Teisson e Alvard (1995).

Fig. 2 (B.I.B.®): A): Saída de ar, B): Kit fixação, C): Estágios, D): Placa porosa, E): Base, F): Entrada de ar.

Fonte: Soccol *et al.* (2008).

Variáveis avaliadas

Após 45 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis:

A) Número total de brotações (NTB): Contou-se o número de brotações emitidas por planta; B) Massa fresca total (MFT); C) Massa seca total (MST); D) Incremento da massa fresca (IMF): Obtido pelo quociente entre a massa fresca final e a massa fresca inicial; E) Altura da parte aérea (APA); F) Número de raízes; G) Comprimento das raízes; H) Comprimento da maior raiz, estimado com o auxílio do equipamento WINRHYZO®.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e três repetições com dez plantas por unidade experimental, para o sistema (R.I.T.A.[®]) e sistema tradicional, no biorreator de imersão por bolhas utilizou-se dez plantas por estágio. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados foram processados com o auxílio do programa computacional ESTATÍSTICA, de acordo com Ribeiro Júnior (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes às variáveis, número total de brotações, massa fresca total, massa seca total e incremento da massa fresca dos explantes de *Oncidium leuochilum* são apresentados na (Tabela 3). Observa-se o que o sistema de cultivo de imersão por bolhas foi superiores aos demais sistemas, quanto ao número total de brotações 6,56 e massa seca total 0,59 g. A homogeneidade da solução nutritiva (MS) e a aeração proporcionada pelo sistema mostram-se determinantes na propagação de brotos e no incremento da massa fresca.

Tabela 3: Número total de brotos (NTB), massa fresca total (MFT), massa seca total (MST), incremento da massa fresca (IMF) de *Oncidium leuochilum* após 45 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas.

Tratamentos	NTB	MFT (g)	MST (g)	IMF (x)
B.I.B.[®]	6,56 ^a	1,21 ^a	0,59 ^a	5,7 ^a
R.I.T.A.[®]	5,13 ^b	1,17 ^a	0,49 ^b	5,1 ^b
Tradicional	5,42 ^b	1,15 ^a	0,45 ^b	4,7 ^b

1 Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey no nível de 5%.

2 dados sob transformação raiz quadrada de $y + 0,5$.

Um significativo aumento de massa fresca vegetal produzida em sistemas de cultivo por imersão foi observado em diversas espécies, tais como, banana (MATSUMOTO e BRANDÃO, 2002), helicônia (RODRIGUES *et al.* 2006) e abacaxi (SILVA, 2007). Portanto, os sistemas de cultivo em biorreatores podem apresentar proliferação de brotações, possibilitando a automação do processo de micropropagação e reduzindo o trabalho.

Rech Filho *et al.* (2004) observaram na propagação de bromélias, apresentou resultados superiores utilizando biorreatores, quando comparados com o sistema tradicional. Resultados semelhantes são apresentados por Rodrigues *et al.* (2006) trabalhando com

helicônia em biorreatores de imersão temporária, observaram também que, quanto maior a aérea de contato dos explantes com a solução nutritiva líquida, maior será a absorção dos nutrientes e conseqüentemente maior a produção.

Os resultados referentes às variáveis, altura da parte aérea, número de raízes, comprimento das raízes e comprimento da maior raiz dos explantes de *Oncidium leuochilum* são apresentados na (Tabela 4). Comparando-se os sistemas de cultivo em biorreatores e o sistema tradicional, constata-se que o biorreator de imersão por bolhas apresentou o melhor resultado para a variável, altura da parte aérea. Moreira *et al.* (2003) afirmam que a altura é uma variável importante, pois está diretamente relacionada com o número de nós que serão recuperados em novas brotações.

Tabela 4: Altura da parte aérea (APA), número de raízes (NR), comprimento das raízes (CR), e comprimento da maior raiz (CMR) de *Oncidium leuochilum* após 45 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas.

Tratamentos	APA (cm)	NR	CR (cm)	CMR (cm)
B.I.B. [®]	1,87 ^a	4,86 ^a	1,54 ^a	2,21 ^a
R.I.T.A. [®]	1,58 ^b	4,77 ^a	1,49 ^a	2,19 ^a
Tradicional	1,52 ^b	4,81 ^a	1,41 ^b	2,24 ^a

1 Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey no nível de 5%.

2 dados sob transformação raiz quadrada de $y + 0,5$.

Diversos autores (TAKAYAMA, 2002; ROELS *et al.* 2006; SILVA *et al.* 2007) relatam que os sistemas de cultivo em biorreatores podem promover todas as fases da micropropagação, bem como adaptabilidade a diversas espécies, uniformização da produção e conseqüentemente redução dos custos por muda produzida. Além de permitirem a automatização dos protocolos, os sistemas de cultivo em biorreatores dispensam o uso de agente gelificante, que pode representar cerca de 70% do custo da solução nutritiva, como no caso do Phytigel[®].

Segundo Etienne e Berthouly (2002) o volume dos frascos também interfere no desenvolvimento das plântulas, geralmente, quanto maior o volume dos recipientes, como no caso dos biorreatores e especialmente o biorreator de imersão por bolhas, melhor é o crescimento e multiplicação dos explantes.

Em sistemas de cultivo em biorreatores de imersão temporária, o tempo de imersão e a sua freqüência são importantes, determinando a absorção de nutrientes e controlando a hiperidricidade das plântulas (ETIENNE e BERTHOULY, 2002). A variação do tempo de

imersão e sua frequência devem ser determinadas de acordo com as exigências de cada cultivo, outro fator que parece favorecer o crescimento dos explantes nos biorreatores é a constante renovação do ar durante o período de transferência do meio, eliminando os possíveis gases prejudiciais produzidos pelo metabolismo das plantas, que normalmente se acumulam na fase gasosa dos sistemas (LEMOS *et al.* 2001). Portanto, a eficiência e a facilidade da tecnologia envolvida no processo de cultivo em biorreatores parece ser a mais promissora para a propagação de plantas no sistema industrial.

Constata-se efeito de irradiância ($35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante o crescimento de *Oncidium leucochilum* em diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (Figura 12 A e B).





Figura 12: Explantes de *Oncidium leucochilum* cultivados em sistemas de biorreatores (B.I.B.[®] e R.I.T.A.[®]) e sistema tradicional, após 45 dias de cultivo. (A): Imersão; (B): Emersão.

Ergi e Schuch (2005) descrevem que o fator irradiância fotossinteticamente ativa de 8 a 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ influenciou na multiplicação de framboesas, tanto para a variável número médio de folhas como para altura média dos explantes (LEITE *et al.* 2000; ROCHA *et al.* 2007). Em *Cymbidium* cultivado *in vitro*, houve maior taxa fotossintética em ambiente enriquecido com 2.000 ppm de CO_2 e 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ do que em 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na mesma concentração de CO_2 (KOZAI *et al.* 1987).

Portanto, o sistema de imersão por bolhas possibilita maior interação da irradiância e incremento da taxa fotossintética no crescimento dos explantes, uma vez que o material utilizado em sua confecção é todo transparente.

CONCLUSÃO

O emprego de biorreator de imersão por bolhas é eficiente para a micropropagação de orquídeas *Oncidium leucochilum* em sistemas de cultivo líquido em larga escala.

REFERÊNCIAS

- ALTAFIN, R. L. M.; MENEZES, M. O.; LIMA, R. R. F.; PITOMBO, L. M. Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal. Boletim Técnico. Espírito Santo do Pinhal, 7: 2003.
- BOSA, N; CALVETE, E. O.; KLEIN, V. A.; SUZIN, M. Development of young plants of gypsophila in different substrates. **Horticultura Brasileira**. v.21, p.514-519, 2003.
- ERGI, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) ‘Batum’. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 27, p. 448-490, 2005.
- ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** v. 69, p. 215–231, 2002.
- FIGUEIREDO, M. A.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C.; RODRIGUES, V. A. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**. v. 38, p. 255-257, 2008.
- HÁGSATER, E.; SOTO ARENAS, M. Á.; SALAZAR CHÁVEZ, G. A.; JIMENEZ MACHORRO, R.; LÓPEZ ROSAS, M. A.; DRESSLER, R. L. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México, D. F. p. 304, 2005.
- KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. Plant micropropagation in horticultural industries. **Proceedings of the Symposium Floriezel**. v. 87, p. 135-141, 1987.
- LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeito de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “*in vitro*” do porta-enxerto de pereira OH X F97¹. **Ciência Agrotecnologia**. v.24, p.353-357, 2000.
- LEMOES, 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**. v. 23, p. 482-487, 2001.
- MALOSSO, M. G. Micropropagação de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN e estabelecimento de meio de cultura para a conservação desta espécie em banco de germoplasma *in vitro*. Tese (**Doutorado em Biotecnologia**), Universidade Federal do Amazonas, p. 101, 2007.
- MATSUMOTO, K.; BRANDÃO, A. K. C. Comparison of temporary and permanent immersion systems for the *in vitro* culture of banana. **InfoMusa**. v. 11, p. 36-37, 2002.
- MORAES, L. K. A. De; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; SILVA, A. L. Da. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura ‘dupla-fase’. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 26, p. 403-405, 2004.
- MOREIRA, M. A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; FRÁGUAS, C. B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência Agrotecnologia**. v.27, p. 1002-1006, 2003.

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

POMPELLI, M. F.; DE BRITO, G. G.; OTONI, W. C.; GUERRA, M. P. Biotechnologies for ornamental plants: some insights to the Brazilian productive chain. **International Journal of Horticultural Science**. v. 1, p. 51-59, 2007.

RECH FILHO, A. Sistemas de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas para a consolidação de protocolos para a micropropagação de bromélias. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 74, 2004.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no Excel: guia prático**. Ed. Visoça, p. 251, 2004.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Qualidade da luz na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5. **Journal of Biosciences**. v. 23, p. 32-40, 2007.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagation of heliconia plantlets in temporarily immersion bioreactor. **Bragantia**. v. 65, p. 29-35, 2006.

ROELS, S.; NOCEDA, C.; ESCALONA, M.; SANDOVAL, J.; CANAL, M.J.; RODRIGUEZ, R.; DEBERGH, P. The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa* AAB) shoot proliferation and quality. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.84, p. 155-163, 2006.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. Micropropagation methods of pineapple. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 42, p. 1257-1262, 2007.

SOCCOL, C. R.; SCHEIDT, G. N.; MOHAN, R. Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. Universidade Federal do Paraná. Patente (**DEPR. 01508000078**). 03/03/ 2008.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v.17, p. 25-33, 2001.

TAKAYAMA, S. Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. Abst. 1st Int. Symp. Liquid Systems for *In Vitro* Mass Propagation of Plants, Norway. p. 60-62, 2002.

TEISSON, C.; ALVARD, C. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid médium: temporary immersion. In: TERZI, M. (Ed.). **Current issues in plant molecular and celular biology**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers. p. 105-110, 1995.

UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; VIEIRA, A. O. S.; DALIO, R. J. D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 13, p. 267-269, 2007.

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (*Orchidaceae*) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botânica Brasileira**. v. 17, p. 101-118, 2003.

CAPÍTULO IV

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE *Melaleuca alternifolia* CHEEL

RESUMO

A busca por novas tecnologias no cultivo *in vitro* vem sendo amplamente estudadas, visando aperfeiçoar e baixar o custo de produção das mudas que tenham interesse agrônomo. O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de *Melaleuca alternifolia* Cheel. Para tanto, o crescimento *in vitro* de plantas foi promovido em sistemas de biorreatores (R.I.T.A.[®] e B.I.B.[®]) com imersão contínua e o sistema tradicional em frascos de 200 mL. Em todos os sistemas de cultivo, foi utilizado a solução nutritiva líquida (MS), suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,2 µL L⁻¹ de Tween[®] 20, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 120°C por quinze minutos. A cultura foi mantida em sala de crescimento durante 21 dias, temperatura controlada de 25±2°C, sob luz branca fria (35 µmol m⁻² s⁻¹), com 16 horas de fotoperíodo. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e três repetições de seis plantas. O sistema de biorreator de imersão por bolhas apresentou resultados superiores aos demais sistemas avaliados, principalmente para, massa seca da parte aérea 0,033 g, massa seca total 0,036 g e massa fresca da parte aérea 0,267 g. Conclui-se que o sistema de imersão por bolhas é eficiente para o acúmulo de biomassa de *Melaleuca alternifolia*, em larga escala.

Palavras-chave: Biorreatores, imersão contínua, crescimento *in vitro*.

COMPARISSON OF DIFERENT *IN VITRO* CULTIVE SYSTEMS FOR *Melaleuca alternifolia* CHEEL

ABSTRACT

New techniques of *in vitro* culture are being widely studied, aiming to optimize the production and to decrease the cost of seedlings that have agronomic interest. The objective of this work was to compare different systems of *in vitro* culture of *Alternifolia Melaleuca* Cheel. Therefore, the growth *in vitro* of plantlets was promoted in bioreactor systems (R.I.T.A.[®] e B.I.B.[®]) with continuous immersion and the traditional system in flasks of 200 mL. All culture systems used nutritional solution liquid (MS), supplemented with 1 mg L⁻¹ of BAP, 0.25 mg L⁻¹ of ANA, 30 g L⁻¹ of sacarose and 0.2 µL of Tween[®] 20, pH adjusted for 5.8 and autoclaved at 120°C for 15 minutes. The cultures were kept in a growth room during 21 days, with controlled temperature of 25±2°C, under cold white light (35 µmol m⁻² s⁻¹), with 16 hours of photoperiod. The delineation was entirely randomized, with three treatments and four repetitions of six plants. The biorreator of immersion by bubbles system presented superior results compared to other evaluated systems, mainly for dry mass of the aerial part (0.033 g), total dry mass (0.036 g) and fresh mass of the aerial part (0.267 g). The R.I.T.A.[®] and the traditional system did not presented significant difference in the majority of the variables. Thus the system of immersion by bubbles is efficient for the accumulation of biomass of *Alternifolia Melaleuca* on large scale.

Keywords: Bioreactors, continuous immersion, growth *in vitro*.

INTRODUÇÃO

A *Melaleuca alternifolia* Cheel, é conhecida internacionalmente como “Tea Tree” ou árvore-de-chá, é uma espécie nativa da Austrália, Ilhas do Oceano Índico e China, pertencente à família Myrtaceae. Possui uma casca fina, com folhas longas e pontiagudas que, quando partidas, emitem um forte aroma, ocorre principalmente em áreas de pântano (CRONQUIST, 1981). De acordo com Castro *et al.* (2005) o principal produto desta espécie é o óleo essencial extraído das folhas. O primeiro corte se dá após 15 meses de cultivo e as colheitas posteriores são anuais (WILLIAMS *et al.* 1990). O óleo essencial possui diversas propriedades farmacológicas, principalmente antiinflamatórias (BRAND *et al.* 2001; CARSON *et al.* 2006) e antimicrobianas (WILKINSON e CAVANAGH, 2005; PACKER e LUZ, 2007), sendo destinado para a indústria de alimentos, cosméticos e defensivos agrícolas.

Embora existam inúmeros trabalhos relatando a composição química do óleo essencial de *M. alternifolia*, são escassos os trabalhos relativos ao cultivo *in vitro* da referida espécie. Entretanto, há uma tendência mundial no que diz respeito à multiplicação *in vitro* em escala comercial, especialmente as plantas que tenham interesse agrônomico.

Ehlert *et al.* (2004) descrevem que a propagação vegetativa é uma importante ferramenta no melhoramento de espécies lenhosas e vem sendo utilizada sistematicamente. Hubner *et al.* (2007) destacam que o cultivo *in vitro*, pode ser empregado com sucesso na propagação massal de genótipos selecionados, visando à conservação e melhoramento genético dos cultivares, bem como atender à demanda por mudas sadias utilizadas na expansão comercial (REZENDE, 2005).

De acordo com Soccol *et al.* (2008) dentre as técnicas de propagação vegetativa, o sistema de cultivo *in vitro* em biorreatores, possibilita a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos extraídos de uma planta matriz, permitindo a produção de genótipos superiores em larga escala e isentas de patógenos, reduzindo tempo e custo por mudas produzidas.

Os biorreatores são equipamentos derivados dos tanques de fermentação utilizados na produção de bebidas a partir de substrato (mosto) e nutrientes e, inicialmente adaptados para o cultivo de leveduras e bactérias *in vitro* e na produção de metabólitos secundários em larga escala (CID *et al.* 2002). No tocante à micropropagação de plantas, dois tipos de biorreatores estão sendo usados, os chamados biorreatores de imersão temporária, são os que proporcionam temporariamente o contato da solução nutritiva com os explantes, e, os biorreatores de imersão permanente que permitem o contato dos explantes durante toda fase de cultivo (ALVARD *et al.* 1993; ESCALONA *et al.* 1999).

Recentemente têm-se utilizado estes equipamentos para produção de mudas em larga escala, com destaque as espécies ornamentais, frutíferas e florestais.

De acordo com Fogaça (2004) há uma tendência em se utilizar biorreatores de imersão temporária, visando à automatização do cultivo *in vitro*, além de diminuir custos pela eliminação do ágar, mão-de-obra e manipulação do material (TEIXEIRA, 2002).

Rodrigues (2006) descreve que o desenvolvimento de novos protótipos de imersão temporária ou permanente, bem como o estudo de seu funcionamento em diferentes culturas é fundamental para reduzir os custos, aumentar a produtividade e manter a qualidade genética do material vegetal.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes sistemas de cultivo *in vitro* no crescimento de plantas de *Melaleuca alternifolia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Fonte de explantes

Plantas de *Melaleuca alternifolia* Cheel provenientes do 5º subcultivo *in vitro* foram utilizadas para a realização do experimento. As microestacas encontravam-se em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiância de $35\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes do tipo “branca-fria”. Trinta dias antes da instalação deste experimento, as plantas foram individualizadas e transferidas para solução nutritivas MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com a metade da concentração dos sais, vitaminas completas e $6\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ de ágar, sob as mesmas condições descritas anteriormente. As plantas enraizadas, com aproximadamente 1,0 cm de altura, foram selecionadas e transferidas para os diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

Experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, durante o ano de 2008.

Os tratamentos testados foram três diferentes sistemas de cultivo: A) Sistema tradicional (controle) em frascos de vidro de 200 mL; B) biorreator com sistema R.I.T.A.[®]; C) biorreator com sistema B.I.B.[®], ambos os sistemas com aeração contínua.

Neste experimento foi utilizada solução nutritiva líquida MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 mg L⁻¹ de tiamina e 0,2 µL L⁻¹ de Tween[®] 20, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 120°C por vinte minutos. Foram utilizados 200 mL de solução nutritiva nos sistemas de cultivo em biorreatores e 20 mL no sistema tradicional (controle). Os cultivos foram conduzidos em sala de crescimento por 45 dias, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C e irradiância de 35 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo “branca-fria”. Neste trabalho, foi utilizado um número inicial de 6 plantas por tratamento.

O sistema R.I.T.A.[®] (Figura 13): “*Recipiente de Imersão Temporária Automatizada*”, desenvolvido por Teisson e Alvard (1995) é constituído por dois compartimentos, um superior e um inferior conectados entre si por mangueiras de silicone. Segundo Malosso (2007) o sistema tem sido utilizado por biofábricas na produção de várias espécies, com destaque banana, citros, café, abacaxi e cana-de-açúcar, obtidos com sucesso tanto por organogênese como por embriogênese somática.

O sistema B.I.B.[®] (Figura 13): “*Biorreator de Imersão por Bolhas*”, desenvolvido por Soccol *et al.* (2008) pode ser utilizado para a produção de espécies frutíferas, ornamentais e florestais. O equipamento é confeccionado com vidro temperado em formato cilíndrico, tem dois compartimentos, que é dividido transversalmente por uma placa porosa de 170 a 220 µm. A parte inferior possui 3,5 cm de altura, e nela encontra-se um orifício para a entrada do ar, e a parte superior possui 24,5 cm de altura e neste compartimento são inseridos os estágios entre 2 a 5 cm de altura cada, todos os componentes internos são de aço inox. O biorreator totaliza 28 cm de altura com 9 cm de diâmetro, mas pode ser alterada conforme a necessidade da empresa ou instituição. O equipamento funciona a partir de um sistema interligado por tubos de borracha flexível, a solução nutritiva passa do compartimento inferior (pré-estágio) para os estágios superiores por meio da injeção de ar no compartimento inferior. Quando a solução nutritiva passa para o compartimento superior, ocorre a aeração e contato com o material em cultivo.

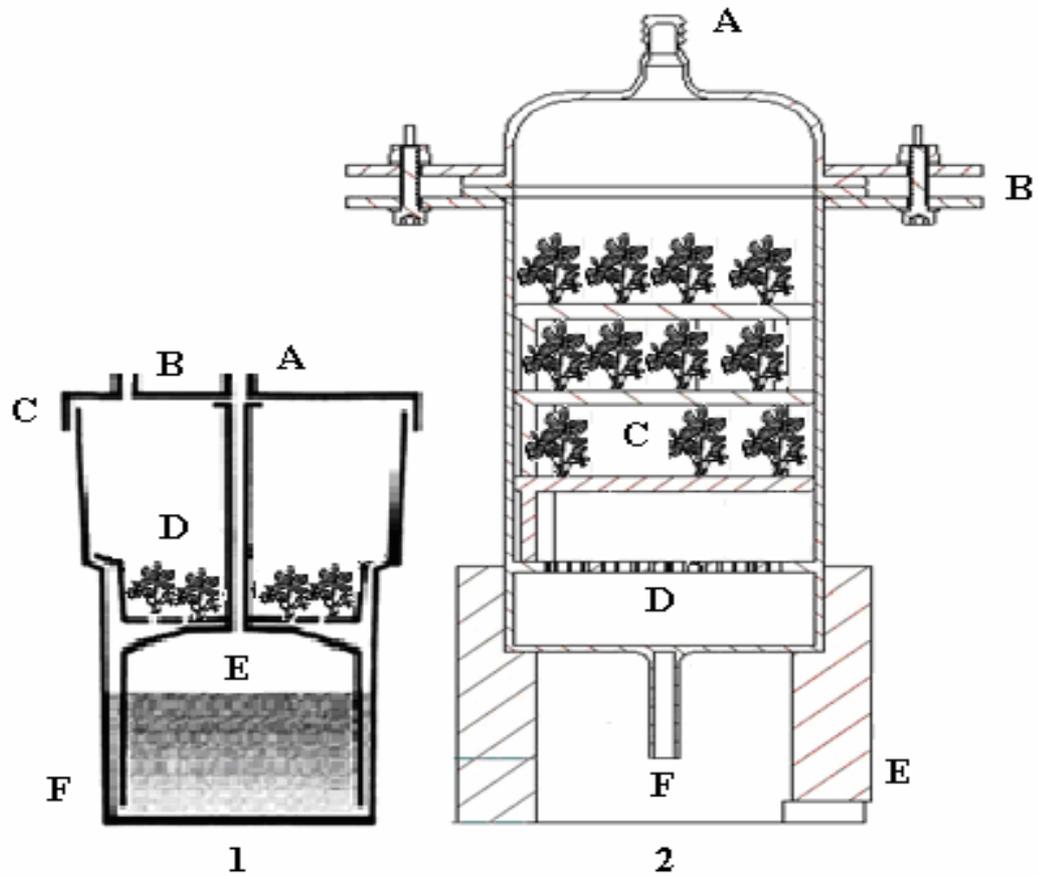


Figura 13: Desenho esquemático dos biorreatores de imersão.

Fig. 1 (R.I.T.A.®): A): Entrada de ar, B): Saída de ar, C): Tampa, D): Suporte para o cultivo, E): Base interna, F): Frasco.

Fonte: Teisson e Alvard (1995).

Fig. 2 (B.I.B.®): A): Saída de ar, B): Kit fixação, C): Estágios, D): Placa porosa, E): Base, F): Entrada de ar.

Fonte: Soccol *et al.* (2008).

Variáveis avaliadas

Após 21 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis:

A) Massa fresca total (MFT); B) Massa fresca da parte aérea (MFPA); C) Massa fresca das raízes (MFR); D) Incremento da massa fresca (IMF): Quociente entre a massa fresca final e a massa fresca inicial; E) Massa seca da parte aérea (MSPA); F) Massa seca das raízes (MSR); G) Massa seca total (MST); H) Comprimento total das raízes (CTR): Foi estimado com o auxílio do equipamento WINRHYZO®; I) Volume das raízes (VR): Foi estimado com o auxílio do equipamento WINRHYZO®; J) Número de raízes (NR); K) Altura da parte aérea (APA); L) Comprimento médio das raízes (CMR): Quociente entre o comprimento total de raízes e o número de raízes.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e três repetições com seis plantas por unidade experimental. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados foram processados com o auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de cultivo no biorreator de imersão por bolhas apresentou o melhor resultado para as variáveis, massa fresca da parte aérea 0,267 g e incremento da massa fresca 3,1 x. Entretanto, constata-se que não houve diferenças significativas para as variáveis, massa fresca total e massa fresca das raízes de *Melaleuca alternifolia* Cheel, entre os sistemas de cultivo estudados (Tabela 5). O cultivo de tecidos vegetais em biorreatores tem possibilitado ganhos adicionais de massa em menor período de tempo, principalmente espécies que tenham interesse florestal.

Tabela 5: Valores médios da massa fresca total (MFT), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR) e incremento da massa fresca (IMF) de *Melaleuca alternifolia* após 21 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas.

Tratamentos	MFT (g)	MFPA (g)	MFR (g)	IMF (x)
B.I.B.[®]	0,390 ^a	0,267 ^a	0,035 ^a	3,1 ^a
R.I.T.A.[®]	0,273 ^b	0,142 ^b	0,036 ^a	2,4 ^b
Tradicional	0,217 ^b	0,132 ^b	0,032 ^a	1,9 ^b

Tratamentos com Letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Ziv (2005) descreve que diversas espécies têm sido propagadas no sistema de cultivo em biorreatores de imersão temporária, proporcionando um aumento significativo em todas as fases da micropropagação. Lemos *et al.* (2001) observaram que o sistema de imersão amplia o contato do meio líquido com os explantes, o que proporciona uma maior área de absorção e, conseqüentemente, melhor aproveitamento da solução nutritiva.

O acúmulo de massa seca total das plantas e da parte aérea apresentou diferenças significativas, sendo que o melhor resultado foi obtido com o uso do sistema biorreator de imersão por bolhas (Tabela 6). A micropropagação convencional considera-se que brotações regeneradas *in vitro* apresentam baixas taxa fotossintéticas, por esta razão estas brotações

utilizam como fonte de carbono, carboidratos adicionados ao meio de cultura (KOSAI *et al.* 1997). Porém, quando o ar é injetado no biorreator, este carrega junto o CO₂ que pode ser fixado na fotossíntese e, conseqüentemente promovendo maior acúmulo de massa seca. O melhor desempenho do sistema de imersão por bolhas para estas características pode estar associado ao fato deste possuir maior volume interno, possibilitando maior concentração do CO₂ exógeno. O acúmulo de massa seca das raízes não apresentou diferença significativa entre os sistemas avaliados.

Tabela 6: Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR) e massa seca total (MST) de *Melaleuca alternifolia* após 21 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas.

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
B.I.B. [®]	0,033 ^a	0,022 ^a	0,036 ^a
R.I.T.A. [®]	0,023 ^b	0,023 ^a	0,025 ^b
Tradicional	0,019 ^b	0,026 ^a	0,022 ^b

Tratamentos com Letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Rodrigues *et al.* (2006) trabalhando com cultivo em biorreatores, observaram que a oxigenação exercida nos explantes de helicônias, influenciou a capacidade de multiplicação. Os trabalhos realizados com banana por Lemos *et al.* (2001) e com abacaxi por Silva *et al.* (2007) mostraram que no sistema de imersão temporária, a taxa de multiplicação foi 2 vezes superior com relação ao sistema de cultivo *in vitro* tradicional, além de que o acúmulo de biomassa também foi superior.

Observa-se na (Figura 14) que o sistema de imersão por bolhas possibilita maior irradiância e, conseqüentemente pode ter um efeito positivo no crescimento dos explantes, uma vez que o material utilizado na confecção do equipamento é todo transparente. Segundo Erig e Schuch (2005) o fator radiação fotossinteticamente ativa de 8 a 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ influenciou na multiplicação de framboesas, tanto para a variável número médio de folhas como para altura média dos explantes. De acordo com Morini e Muleo (2003) a luz é um fator fundamental para as plantas, pela ação direta ou indireta, as plantas desenvolveram uma série de fotorreceptores que regulam seu crescimento e desenvolvimento em relação à presença, quantidade, direção, duração e qualidade da radiação incidente.



Figura 14: Explantes de *Melaleuca alternifolia* Cheel, cultivados em sistemas de biorreatores (B.I.B.® e R.I.T.A.®) e sistema tradicional, após 21 dias de cultivo.

Houve diferenças significativas em relação ao comprimento total das raízes entre os sistemas avaliados, o cultivo *in vitro* tradicional apresentou a melhor média com 8,39 cm, o sistema de imersão por bolhas com 7,07 cm e o sistema R.I.T.A.® com 4,61 cm respectivamente (Tabela 7). O mesmo comportamento ocorreu para o número de raízes emitidas por planta.

Tabela 7: Valores médios do comprimento total das raízes (CTR), volume das raízes (VR), número de raízes (NR), altura da parte aérea (APA) e comprimento médio das raízes (CMR) de *Melaleuca alternifolia* após 20 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas.

Tratamentos	CTR (cm)	VR (cm ³)	NR	APA (cm)	CMR (cm)
B.I.B.®	7,07 ^{ab}	0,035 ^a	4,6 ^{ab}	5,9 ^a	1,5 ^a
R.I.T.A.®	4,61 ^b	0,028 ^a	4,1 ^b	4,4 ^a	1,1 ^a
Tradicional	8,39 ^a	0,035 ^a	5,1 ^a	4,6 ^a	1,6 ^a

Tratamentos com Letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O fato de o sistema tradicional ter apresentado o maior comprimento total de raízes e o número de raízes pode estar associado à ocorrência das plantas estarem em contato direto e

sem aeração com o meio de cultivo, permitindo que a rizosfera tenha maior disponibilidade de água e nutrientes (ETIENNE-BARRY *et al.* 1999; TAIZ e ZEIGER, 2004).

Observa-se que a variável altura da parte aérea não apresentou diferença estatística entre os sistemas de cultivo avaliados. Entretanto, o sistema de cultivo por bolhas apresentou uma média de 5,9 cm enquanto o sistema tradicional 4,6 cm e o sistema de recipiente de imersão temporária automatizada 4,4 cm respectivamente. Portanto, a produção de mudas no biorreator de imersão por bolhas pode reduzir consideravelmente os custos de produção das plantas micropropagadas de *Melaleuca alternifolia* Cheel.

CONCLUSÕES

As diferenças entre os sistemas influenciaram significativamente o crescimento de *M. alternifolia* Cheel após 21 dias de cultivo *in vitro*.

O sistema de cultivo de imersão por bolhas promoveu maior acúmulo de biomassa nos explantes de *Melaleuca alternifolia* Cheel, quando comparados com o sistema de recipiente de imersão temporária automatizada e o sistema tradicional.

REFERÊNCIAS

- 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, 1993.
- BRAND, C.; FERRANTE, A.; PRAGER, R. H.; RILEY, T. V.; CARSON, C. F.; FINLAY-JONES, J. J.; HART P. H. The water-soluble components of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of the superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated *in vitro*. **Inflamm Res**. v. 50, p. 213-219, 2001.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Revista Clinical Microbiology**. v. 19, p. 50-62, 2006.
- CASTRO, C.; SILVA, M. L.; PINHEIRO, A. L.; JACOVINE, L. A. G. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Árvore**. v. 29, p. 241-249, 2005.
- COSTA, L. C.; B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Comprimento da estaca e tipo de substrato na propagação vegetativa de atoveran. **Ciência Rural**. v. 37, p 1157-1160, 2007.
- CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants, Columbia: New York, 1981.

CRUZ, C. D. **Programa Genes** - Versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, p. 648, 2001.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 27, p. 488-490, 2005.

EHLERT, P. A. D.; LUZ, J. M. Q.; INNECCO, R. Propagação vegetativa da alfavaca cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**. v. 22, p. 10-13, 2004.

ETIENNE-BARRY D, BERTRAND B, VÁSQUEZ N, ETIENNE H. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. **Plant Cell Rep**. v. 19, p. 111-117, 1999.

HUBNER, H. I.; SILVA, L. V.; CAPATTI, I.; FUMAGALI, E.; SOUTO, E. R.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B. Multiplicação *in vitro* de *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. (*Apocynaceae*). **Acta Scientiarum. Health Science**. v. 29, p. 63-66, 2007.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 51, p. 49-56, 1997.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeito de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “*in vitro*” do porta-enxerto de pereira OH X F97¹. **Ciência Agrotecnologia**. v.24, p.353-357, 2000.

LEMO, 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**. v. 23, p. 482-487, 2001.

MALOSSO, M. G. Micropropagação de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN e estabelecimento de meio de cultura para a conservação desta espécie em banco de germoplasma *in vitro*. Tese (**Doutorado em Biotecnologia**), Universidade Federal do Amazonas, p. 101, 2007.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. p. 3-35, 2003.

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

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Evaluation and research method for natural products inhibitory activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, p. 102-107, 2007.

REZENDE, J. C. Desenvolvimento de embriões e plântulas de *Coffea arabica* L. oriunda de embriogênese somática direta. Dissertação (**Mestrado em Agronomia/Fitotecnia**) Universidade Federal de Lavras, p. 58, 2005.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagation of heliconia plantlets in temporarily immersion bioreactor. **Bragantia**. v. 65, p. 29-35, 2006.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. Micropropagation methods of pineapple. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 42, p. 1257-1262, 2007.

SOCOL, C. R.; SCHEIDT, G. N.; MOHAN, R. Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. Universidade Federal do Paraná. Patente (**DEPR. 01508000078**). 03/03/ 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fotossíntese: considerações fisiológicas e ecológicas. In: **Fisiologia vegetal**. 3° Ed. Porto Alegre: Artmed. p.199-219, 2004.

TEISSON, C.; ALVARD, C. A new concept of plant in vitro cultivation liquid médium: temporary immersion. In: TERZI, M. (Ed.). **Current issues in plant molecular and cellular biology**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers. p. 105-110, 1995.

THORPE, T. A.; KUMAR, P. P. Cellular control of morphogenesis. In: AHUJA, M.R. (Ed.). Micropropagation of woody plants. **The Netherlands**: Kluwer Academic. p. 11-29, 1993.

WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. **Revista Phytotherapy Research**. v. 19, p. 643-646, 2005.

WILLIAMS, L. R. et al. Antimicrobial activity of oil of melaleuca (tea tree oil). Its potential use in cosmetics and toiletries. **Cosmet. Aerosols Toil Aust**. v. 4, p. 12-22, 1990.

ZIV, M. Simple bioreactors for mass propagation of plants. **Plant Cell Tiss Org**. v. 81, p.277-285, 2005.

CAPÍTULO V

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* NA MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO DE *Eucalyptus saligna* SMITH

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo promover a multiplicação e alongamento do *Eucalyptus saligna* Smith, em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. A solução nutritiva utilizada na fase de multiplicação foi o (MS), suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,3 µL L⁻¹ de Tween[®] 20. Na fase de alongamento, a solução nutritiva foi o (MS) metade da concentração original, suplementado com 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,3 µL L⁻¹ de Tween[®] 20, ambas as soluções tiveram o pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 120°C por quinze minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com 25±2°C, sob luz branca fria (35 µmol.m⁻².s⁻¹), com 16 horas de fotoperíodo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e três repetições com quatro plantas por tufos para todos os tratamentos. Na fase de multiplicação, foi utilizada ciclos de aeração controlada de 15 minutos de imersão a cada 2 horas, e imersão permanente para a fase de alongamento. Constata-se que o biorreator de imersão por bolhas apresentou os melhores resultados para as variáveis avaliadas na fase de multiplicação, com destaque a massa fresca total (0,72 g), incremento de massa fresca (0,82 g) e massa seca total (6,10 g). Em relação aos resultados obtidos na fase de alongamento, as variáveis avaliadas não apresentaram diferença significativa (p< 0,05) entre os sistemas de cultivo, ocorrendo o hiperhidricidade em todos os tratamentos.

Palavras-chave: Biorreatores, multiplicação, alongamento.

**COMPARISSON OF DIFERENT *IN VITRO* CULTIVE SYSTEMS FOR
THE MULTIPLICATION AND EXTENSION OF *Eucalyptus saligna*
SMITH**

ABSTRACT

This study aimed to promote the multiplication and extension of *Eucalyptus saligna* Smith, on different *in vitro* cropping systems. The nutrient solution used during the multiplication was the (MS) supplemented with 1 mg L⁻¹ BAP, 30 gL⁻¹ sucrose and 0.3 µL of Tween[®] 20, and in the process of lengthening the nutrient solution was the MS with half of the original concentration, supplemented with 2.5 gL⁻¹ activated charcoal, 30 gL⁻¹ sucrose and 0.3 µL of Tween[®] 20, both solutions had the pH adjusted to 5.8 and were sterilized at 120 °C for fifteen minutes. The cultures were kept in growth room at 25±2°C under cool white light (35 µmol.m⁻².s⁻¹) with a photoperiod of 16 hours. The experimental design was completely randomized, with three treatments and three replicates for four plants by tufts for each treatment. At multiplication phase, cycles of controlled aeration of 15 minutes of immersion at every 2 hours were used, and permanent immersion at stretching phase. The bioreactor of bubble immersion showed the best results for the variables evaluated during the phase of multiplication, with focus on total fresh mass (0.72 g), increase of fresh mass (0.82) and total dry mass (6.10 g). Concerning to the results obtained during the stretching phase, the variables showed no significant difference (p < 0.05) among the culture systems, occurring the phenomenon of vitrification in all the treatments.

Keywords: Bioreactor, multiplication, stretching.

INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é nativo da Austrália, pertence à família Myrtaceae, possui cerca de 600 espécies adaptadas às diversas regiões e condições edafoclimáticas, geralmente apresentam rápida propagação *in vitro*.

A espécie *E. saligna* é conhecida na Austrália como “Sydney blue gum”, distribui-se geralmente na região litorânea e nos vales das cadeias montanhosas próximas ao litoral de New South Wales e ao sul de Queensland, sua distribuição natural situa-se entre as latitudes de 28 a 35°S, desde o nível do mar até 1000 metros de altitude (BOLAND *et al.* 1989). Os gêneros *Eucalyptus* têm merecido atenção de empresas e instituições de pesquisa no Brasil devido ao aumento crescente de novos plantios, em função dos ganhos alcançados em produtividade florestal, visando atender a crescente demanda de madeira destinada a fins energéticos, produção de celulose e papel, óleos essenciais, produtos de limpeza, alimentícios, perfumes e medicamentos (BACHA e BARROS, 2004).

De acordo com Cardim (2006) com a demanda de produtos florestais e o interesse de manutenção das florestas nativas, há a necessidade constante de desenvolvimento de técnicas e equipamentos destinado a clonar plantas de interesse agrônômico. Apesar de ser uma técnica recente na área florestal, esta já se encontra embutida nos programas de melhoramento que, na maioria das vezes, objetivam a maximização ou manutenção do valor genético do clone a ser propagado, permitindo assim, acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa, dentre outras finalidades (IBARAKI e KURATA, 2001; ZIV, 2005; SARTORETTO *et al.* 2008).

Segundo Soccol *et al.* (2008) dentre inúmeros equipamentos disponíveis, o cultivo em biorreatores de imersão contínua ou temporária tem sido a de maior impacto, permitindo redução dos custos, uniformidades dos explantes e aumento na produtividade final.

Silva (2006) descreve que existem diversos modelos de biorreatores podem ser empregados no cultivo de tecidos vegetais. Entretanto, não há um consenso sobre quais situações ou qual equipamento a ser utilizado para o crescimento e/ou desenvolvimento de material vegetal. Contudo, vários equipamentos têm sido desenvolvidos e patenteados com resultados promissores.

Atualmente, existe uma tendência em utilizar o sistema de imersão temporária, onde o material vegetal entra em contato com a solução nutritiva de tempos em tempos, de acordo com a programação pré-definida, em contrapartida no sistema contínuo, os explantes ficam em contato com a solução nutritiva (GEORGE, 1996; SILVA, 2006).

A propagação em larga escala por meio do uso de biorreatores tem sido relatada com sucesso em várias espécies, como seringueira (ETIENNE *et al.* 1997), bananeira (LEMOS *et al.* 2001), café (ETIENNE *et al.* 2006), helicônia (RODRIGUES *et al.* 2006) e abacaxizeiro (SILVA *et al.* 2007), apresentando taxa de multiplicação superior quando comparada com o sistema de cultivo *in vitro* tradicional.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo promover o crescimento e alongamento do *Eucalyptus saligna* Smith, em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Fonte de explantes

Plantas de *Eucalyptus saligna* Smith provenientes de sub-cultivos *in vitro* foram utilizadas para a realização do experimento. Os explantes encontravam-se em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e irradiância de $35\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes do tipo “luz branca”, em solução nutritiva (MS).

Esta solução nutritiva continha a metade da concentração dos sais da solução nutritiva MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), as vitaminas completas, e $6\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ de ágar. O pH do meio foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem em 120°C por 20 min.

Experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, durante o ano de 2008.

Os tratamentos testados foram três diferentes sistemas de cultivo: A) Sistema tradicional (controle) em frascos de vidro de 200 mL; B) biorreator com sistema R.I.T.A.[®]; C) biorreator com sistema B.I.B.[®], ambos os sistemas com ciclos de aeração controlada de 15 minutos de imersão a cada 2 horas para a fase multiplicação e imersão permanente para a fase de alongamento.

Meio de multiplicação: Foi utilizada a solução nutritiva líquida MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com nitrato de amônio e nitrato de potássio pela metade da concentração original, suplementado com $1\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ de BAP, $30\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ de sacarose e $0,3\ \mu\text{L}\ \text{L}^{-1}$ de Tween[®] 20, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 120°C por quinze minutos (DIBAX, 2007).

Meio de alongamento: Foi utilizada a solução nutritiva líquida MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com nitrato de amônio e nitrato de potássio pela metade da concentração original, suplementado com $2,5 \text{ gL}^{-1}$ de carvão ativado, 30 gL^{-1} de sacarose e $0,3 \mu\text{L L}^{-1}$ de Tween[®] 20, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a 120°C por quinze minutos (DIBAX, 2007).

Foram utilizados 200 mL de meio de cultura nos sistemas de cultivo em biorreatores e 20 mL no sistema tradicional (controle). Os cultivos foram conduzidos em sala de crescimento por 21 dias, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo “branca-fria”. Neste trabalho, foi utilizado um número inicial de 4 plantas por tufo para todos os tratamentos, totalizando 4 tufos por tratamento.

O sistema R.I.T.A.[®] (Figura 15): “*Recipiente de Imersão Temporária Automatizada*”, desenvolvido por Teisson e Alvard (1995) é constituído por dois compartimentos, um superior e um inferior conectados entre si por mangueiras de silicone. Segundo Malosso (2007) o sistema tem sido utilizado por biofábricas na produção de várias espécies, com destaque banana, citros, café, abacaxi e cana-de-açúcar, obtidos com sucesso tanto por organogênese como por embriogênese somática.

O sistema B.I.B.[®] (Figura 15): “*Biorreator de Imersão por Bolhas*”, desenvolvido por Soccol *et al.* (2008) pode ser utilizado para a produção de espécies frutíferas, ornamentais e florestais. O equipamento é confeccionado com vidro temperado em formato cilíndrico, tem dois compartimentos, que é dividido transversalmente por uma placa porosa de 170 a 220 μm . A parte inferior possui 3,5 cm de altura, e nela encontra-se um orifício para a entrada do ar, e a parte superior possui 24,5 cm de altura e neste compartimento são inseridos os estágios entre 2 a 5 cm de altura cada, todos os componentes internos são de aço inox. O biorreator totaliza 28 cm de altura com 9 cm de diâmetro, mas pode ser alterada conforme a necessidade da empresa ou instituição. O equipamento funciona a partir de um sistema interligado por tubos de borracha flexível, a solução nutritiva passa do compartimento inferior (pré-estágio) para os estágios superiores por meio da injeção de ar no compartimento inferior. Quando a solução nutritiva passa para o compartimento superior, ocorre a aeração e contato com o material em cultivo.

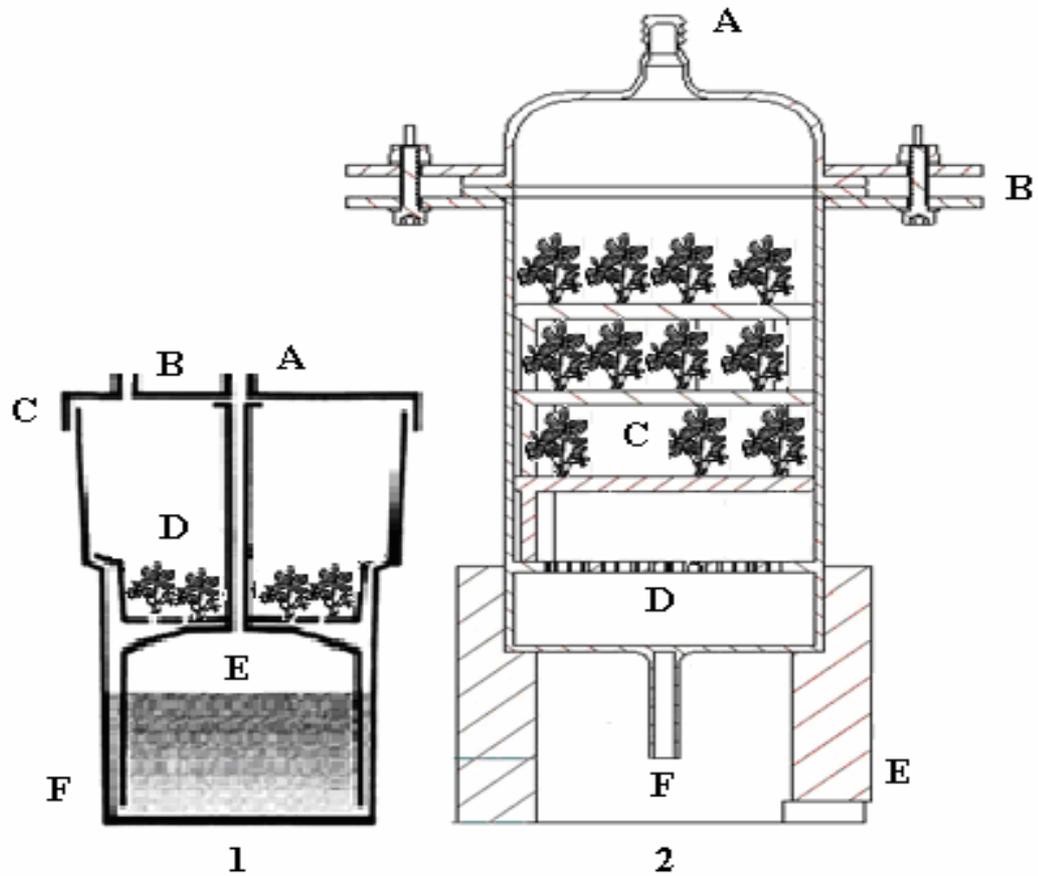


Figura 15: Desenho esquemático dos biorreatores de imersão.

Fig. 1 (R.I.T.A.®): A): Entrada de ar, B): Saída de ar, C): Tampa, D): Suporte para o cultivo, E): Base interna, F): Frasco.

Fonte: Teisson e Alvard (1995).

Fig. 2 (B.I.B.®): A): Saída de ar, B): Kit fixação, C): Estágios, D): Placa porosa, E): Base, F): Entrada de ar.

Fonte: Soccol *et al.* (2008).

Variáveis avaliadas

Após 21 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis:

Multiplicação

A): Número de brotos por plantas (NBP); B): Massa fresca total (MFT); C): Incremento de massa fresca (IMF); D): Massa seca total (MST); E) Incremento de massa seca (IMS); F): Número de brotos g^{-1} de inoculo (NBI); G): Taxa de crescimento relativo $mg.g^{-1}$ dia (TCR).

Alongamento

A): Número total de brotos (NTB); B): Maior broto (MB); C): Média dos brotos (M3>B); D): Altura média dos brotos (AMB); E): Número de brotos g⁻¹ (NB g⁻¹).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e três repetições com quatro plantas por tufo e quatro tufos por tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados foram processados com o auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2001).

Determinação da taxa de crescimento relativo (método modificado de HUNT, 1982).

A taxa de crescimento relativo foi estimada pela seguinte expressão:

$$TCR = \frac{\ln(M_f) - \ln(M_i)}{t} \cdot 100$$

Onde: TCR = Taxa de crescimento relativo; ln = logaritmo neperiano; (Mf) = massa seca no instante final; (Mi) massa seca no instante inicial e t = tempo (dias).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à taxa de multiplicação dos explantes de *Eucalyptus saligna* Smith variaram entre os sistemas de cultivo *in vitro* avaliados (Tabela 8). São escassos dados na literatura que mostram o uso de biorreatores, tanto no crescimento e desenvolvimento quanto no alongamento de *Eucalyptus*. Entretanto, o sistema de cultivo de imersão por bolhas foi superiores aos demais sistemas quanto à massa fresca total 0,72 g e massa seca total 6,10 g, resultados significativos ao nível (p< 0,05) também foram observados para a variável, incremento de massa fresca e seca respectivamente.

Tabela 8: Número de brotos por plantas (NBP), massa fresca total (MFT), incremento de massa fresca (IMF), massa seca total (MST), incremento de massa seca (IMS), número de brotos g^{-1} de inoculo (NBI) e taxa de crescimento relativo $mg.g^{-1}$ dia (TCR) de *Eucalyptus saligna* Smith após 21 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas.

Tratamentos	NBP	MFT (g)	IMF (x)	MST (g)	IMS (x)	NBI	TCR
B.I.B.[®]	21,4 ^b	0,72 ^a	0,82 ^a	6,10 ^a	51,7 ^a	180,4 ^a	23,9 ^a
R.I.T.A.[®]	24,1 ^a	0,52 ^b	0,78 ^b	4,41 ^b	48,8 ^b	202,6 ^a	23,6 ^a
Tradicional	17,8 ^c	0,19 ^c	0,22 ^c	1,66 ^c	13,5 ^c	150,0 ^a	15,8 ^b
Média geral	21,1	0,48	0,60	4,06	38,0	177,6	21,1
CV(%)	8,08	9,46	3,63	9,46	3,54	8,1	1,6

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Considerando a média geral somente nos biorreatores de (22,75%) para a variável, número de brotos por plantas, constata-se que a tecnologia proporcionada pelos equipamentos de imersão é uma alternativa eficaz na multiplicação de *Eucalyptus saligna* Smith em *in vitro*, sob condições assépticas e controladas.

Poucos estudos têm sido realizados sobre a produção de espécies lenhosas em biorreatores apesar do grande potencial, verifica-se um número limitado de êxitos relatados com este modelo de sistema. Entretanto, Paek *et al.* (2001) relatam que os cultivos em biorreatores podem promover a multiplicação de inúmeras espécies, o que possibilita a automação do processo de micropropagação e a redução dos custos. Etienne *et al.* (1997) relatam um aumento significativo na taxa de multiplicação de seringueira em sistema de imersão temporária.

A eficiência do sistema de imersão por bolhas no aproveitamento da solução nutritiva, bem como a irradiância de $35 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ pode ser observada na (Figura 16 A e B). Segundo Etienne e Berthouly (2002) o volume dos frascos também interfere no crescimento das plântulas, geralmente, recipientes com volumes maiores, como no caso dos biorreatores de imersão por bolhas, proporcionam melhor crescimento e multiplicação do cultivo *in vitro*.



A



B

Figura 16: Explantes de *Eucalyptus saligna* Smith cultivados em sistemas de biorreatores (B.I.B.[®] e R.I.T.A.[®]) e sistema tradicional, após 21 dias de cultivo. (A): Imersão; (B): Emersão.

De acordo com Leite *et al.* (2000) o aumento da intensidade luminosa durante as fases de micropropagação pode facilitar a aclimatização e aumentar a sobrevivência *ex vitro*, uma vez que estimula a fotossíntese e a relação hídrica das plântulas, outro fator que parece favorecer o crescimento dos explantes nos biorreatores é a constante renovação do ar durante o período de transferência da solução nutritiva, eliminando os possíveis gases prejudiciais produzidos pelo metabolismo das plantas que normalmente se acumulam. Takahashi *et al.* (1992) relataram que a multiplicação e o alongamento de *Lilium bulblet* poderiam ser alcançados por enriquecimento do ar. Estes resultados indicam que a constante renovação de ar durante o período de transferência da solução nutritiva líquida, pode eliminar os possíveis gases prejudiciais produzidos pelo metabolismo dos explantes que normalmente se acumulam, os quais podem ter efeito inibidor no crescimento (RECH FILHO, 2004).

A produção de *Eucalyptus saligna* Smith na fase de alongamento não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os sistemas de cultivo avaliados (Tabela 9). Em todos os tratamentos ocorreu o fenômeno da vitrificação, o qual provocou formação atípica de *Eucalyptus*, com folhas curvadas, espessas, quebradiças e de tamanho reduzido. Os brotos produzidos de *Eucalyptus* podem ter dificuldades para enraizamento, devido a uma maior suscetibilidade à hiperhidricidade.

Tabela 9: Número total de brotos (NTB), Comprimento do maior broto (CMB), Comprimento médio dos três maiores brotos (CM3>B), altura média dos brotos (AMB) e número de brotos g^{-1} (NB g^{-1}) de *Eucalyptus saligna* Smith após 21 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas.

Tratamentos	NTB	CMB (cm)	Média 3>B (cm)	AMB (cm)	NB g^{-1}
B.I.B. [®]	4,8 ^a	1,8 ^a	1,4 ^a	1,2 ^a	40,0 ^a
R.I.T.A. [®]	3,9 ^a	1,8 ^a	1,4 ^a	1,2 ^a	32,6 ^a
Tradicional	4,9 ^a	2,1 ^a	1,5 ^a	1,3 ^a	41,5 ^a
Média geral	4,5	1,9	1,47	1,24	38,3
CV(%)	10,2	15,2	13,4	11,9	25,3

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Ziv (1991) descreve que estes sintomas são provocados por desordens fisiológicas, que ocorrem, frequentemente, na cultura *in vitro* de muitas espécies, e é atribuída, a idade do

material utilizado, bem como pela constante umidade exercida nas plântulas (HARTMANN *et al.* 2002; TAIZ e ZEIGER, 2004).

De acordo com Pasqualetto *et al.* (1988) a hiperhidricidade afeta a anatomia, a morfologia e a fisiologia das plantas impossibilitando sua aclimatação. Bertoni *et al.* (2006) descrevem que varias hipóteses têm sido lançadas para explicar esta disfunção, dentre elas destacam-se, excesso de nutrientes minerais, elevadas concentrações de citocininas, tipo e concentração do agente gelificante, alto potencial hídrico e/ou uma atmosfera de elevada umidade relativa e tipo de frasco.

CONCLUSÕES

O biorreator de imersão por bolhas na fase de multiplicação, com ciclos de imersão temporária de 15 minutos a cada duas horas, promoveu maior acúmulo de biomassa que os demais sistemas de cultivo.

Na fase de alongamento com imersão permanente todos os tratamentos causaram hiperhidricidade.

REFERÊNCIAS

- BACHA, C. J. C.; BARROS, A. L. M. Reflorestamento no Brasil: Evolução recente e perspectiva para o futuro. **Scientia Forestalis**. v.66, p.191-203, 2004.
- BERTONI, B.W.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MORO, J.R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 8, p. 48-54, 2006.
- BOLAND, D. J.; BROOKER, M. I. H.; CHIPPENDALE, G. M.; HALL, N.; HYLAND, B. P. M.; JOHNSTONE, R. D.; KLEINIG, D. A.; TURNER, J. D. **Forest trees of Australia**. CSIRO, Melbourne, v.1, 687p, 1989.
- CARDIM, D. C. Crescimento e desenvolvimento de brotações de progênies de *Eucalyptus grandis in vitro*. (**Mestrado em Recursos Florestais**), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), p. 45, 2006.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes** - Versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, p. 648, 2001.
- DIBAX, R. Transformação e expressão do gene *PCSF129-A* em *Eucalytus saligna*. (**Doutorado em Agronomia**), Universidade Federal do Paraná, p. 132, 2007.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.69, p.215-231, 2002.

ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 18, p. 45-54, 2006.

ETIENNE, H.; LARTAUD, M.; MICHAUX-FERRIERE, 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, 1997.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 2: In Practice. Edington: Exegetics, p. 1361, 1996.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7^a Ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HUNT, R. **Plant growth curves: The functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, p. 248, 1982.

IBARAKI, Y.; KURATA, K. Automation of somatic embryo production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 65, p. 179–199, 2001.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeito de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “*in vitro*” do porta-enxerto de pereira OH X F97¹. **Ciência Agrotecnologia**. v.24, p.353-357, 2000.

LEMOES, 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**. v. 23, p. 482-487, 2001.

MALOSSO, M. G. Micropropagação de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN e estabelecimento de meio de cultura para a conservação desta espécie em banco de germoplasma *in vitro*. Tese (**Doutorado em Biotecnologia**), Universidade Federal do Amazonas, p. 101, 2007.

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

PAEK, K. Y.; HAHAN, E. J.; SON, S. H. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. **In vitro Cellular Developmental Biology Plant**. v. 37, p.149-157, 2001.

PASQUALETO, P. L.; ZIMMERMANN, R. H.; FORDHAM, I. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivare *in vitro*. **Plant Cell and Organ Culture**. v.14, p.31-40, 1988.

RECH FILHO, A. Sistemas de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas para a consolidação de protocolos para a micropropagação de bromélias.

(**Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais**) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 74, 2004.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagation of heliconia plantlets in temporarily immersion bioreactor. **Bragantia**. v. 65, p. 29-35, 2006.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**. v. 38, p. 861-871, 2008.

SILVA, A. B. Biorreator e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro. (**Doutorado em Agronomia**), Universidade Federal de Lavras, p. 132, 2006.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. Micropropagation methods of pineapple. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 42, p. 1257-1262, 2007.

SOCCOL, C. R.; SCHEIDT, G. N.; MOHAN, R. Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. Universidade Federal do Paraná. Patente (**DEPR. 01508000078**). 03/03/ 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fotossíntese: considerações fisiológicas e ecológicas. In: **Fisiologia vegetal**. 3º Ed. Porto Alegre: Artmed. p.199-219, 2004.

TAKAHASHI, S.; MATSUBARA, H.; YAMAGATA, H.; MORIMOTO, T. Micropropagation of virus free bulblets of *Lilium longiflorum* by tank culture. 1. Development of liquid culture method and large scale propagation. **Acta Horticulturae**. v. 319, p. 83-88, 1992.

TEISSON, C.; ALVARD, C. A new concept of plant in vitro cultivation liquid médium: temporary immersion. In: TERZI, M. (Ed.). **Current issues in plant molecular and celular biology**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers. p. 105-110, 1995.

ZIV, M. Simple bioreactor for mass propagation of plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 81, p. 277-285, 2005.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 49-69, 1991.

CAPÍTULO VI

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE UM BIORREATOR DE IMERSÃO POR BOLHAS PARA MICROPROPAGAÇÃO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a modelagem e simulação matemática do biorreator de imersão por bolhas. Utilizaram-se explantes de *Oncidium leucochilum*, solução nutritiva (MS) líquida suplementada com 1 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 µL de Tween 20, pH ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com 25±2°C, sob luz branca fria (35 µmol.m⁻².s⁻¹), com 16 horas de fotoperíodo. O delineamento foi inteiramente casualizado, com trinta explantes por estágios. Após 30 dias de cultivo foram avaliados parâmetros de crescimento dos explantes, de respirometria e hidrodinâmica do B.I.B.[®]. Constata-se que irradiância de 35 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecida ao longo de 16 horas, foi determinante no consumo de O₂ totalizando 23,8 horas entre os ciclos fotossintético. A condutividade elétrica relativa (S/Smáxima) tem um comportamento consistente com o que se espera da mistura no biorreator, e é uma medida adequada à aeração da solução da solução nutritiva promovendo boa agitação, ocorrendo uma homogeneização em (180s para atingir 95% da concentração de equilíbrio), o que indica que há além da aeração a transferência de massa do líquido entre estágios. Os resultados referentes à cinética para as variáveis, número total de brotações, massa fresca total e altura da parte aérea propiciaram coerência em relação com o modelo estabelecido.

Palavras-chave: Biorreator, modelagem, micropropagação.

MODELING AND SIMULATION OF A BIOREACTOR OF IMMERSION BY BUBBLES FOR MICROPROPAGATION

ABSTRACT

The present work aimed at modeling and mathematical simulation of a bioreactor of immersion by bubbles. The work utilized explants of *Oncidium leucochilum*, nutritive liquid solution (MS) supplemented with 1 mg L⁻¹ of BAP, 0.25 mg L⁻¹ of ANA and 0.5 µL of Tween[®] 20, with pH adjusted to 5.8. Cultures were kept in a growth room with 25±2°C, under cold white light (35 µmol.m⁻².s⁻¹), with 16 hours of photoperiod. The experimental design was entirely randomized, with 30 explants per stage. After 30 days of culture, several parameters were evaluated and estimated, such as respirometry, hydrodynamics of the B.I.B.[®] and the estimative of explants growth. The irradiance of (35 µmol.m⁻².s⁻¹) provided over 16 hours, was determinant in O₂ consume totalizing 23.8 hours among the cycles. Relative electric conductivity (S/Smaximum) had a behavior that was similar to the expected behavior in a bioreactor mixture and it is a good measure to evaluate the aeration of the solution, which promotes good agitation and homogenization of the medium (180s to reach 95% of equilibrium concentration), that means that there is mass transference between stages. The results concerning to the measure of kinetics, total fresh weight and aerial part height have agreed with the established model.

Keywords: Bioreactor, modeling, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A modelagem matemática sempre acompanhou a evolução da *Engenharia*, desde os trabalhos clássicos de Fredrickson e de Ramkrishna até os mais recentes, e se constitui em um conjunto de equações ou estruturas matemáticas indispensável para o tratamento dos dados, bem como a formulação racional e compreensão das complexas interações que ocorrem nos sistemas físicos e biológicos.

A evolução dos computadores e a utilização de ferramentas matemáticas são de grande valor para os mais diversos campos dos processos biotecnológicos, com grandes impactos em áreas que abrangem desde a genômica funcional até o desenvolvimento de biorreatores (UNGER *et al.* 2000; CASTILHO e ANSPACH, 2003). A modelagem e a simulação têm valor heurístico que permitem formular hipóteses sobre processos e interações relevantes, quantificar o impacto de variáveis simples sobre o desempenho do sistema, e a sugerir novas necessidades de experimentação.

Os modelos matemáticos que representam tais sistemas não são de fácil tratamento sistemático, resultado direto da alta complexidade associada aos processos (SOUZA JÚNIOR e OLIVEIRA-LOPES, 2005).

No campo da engenharia de reatores, observa-se hoje uma implantação crescente de biorreatores de imersão temporária e/ou permanente, que promovem a produção de tecidos, células e órgãos vegetais em larga escala (KONSTAS e KINZIOS, 2003; XIE *et al.* 2003; ONISCU *et al.* 2003).

Rodrigues *et al.* (2006) descrevem que o desenvolvimento de novos protótipos de imersão temporária e, ou permanente, bem como o estudo de seu funcionamento em diferentes culturas é fundamental para reduzir os custos, aumentar a produtividade e manter a qualidade genética do material vegetal submetido a essa técnica.

Os biorreatores de imersão temporária resultaram da adaptação de diversos biorreatores visando melhorar as condições de oxigenação da solução nutritiva, no qual os explantes ficam imersos ou em contato com a solução nutritiva, em intervalos regulares de tempo conforme a programação predefinida. Os biorreatores de imersão permanente proporcionam o contato da solução nutritiva durante a fase de cultivo, ambos os sistemas reduzem a incidência de vitrificação causada pelo estresse hídrico (MURCH *et al.* 2004; WU, 2007).

Rech Filho (2004) descreve que os sistemas de cultivo *in vitro* de células vegetais em biorreatores foram inicialmente utilizados nos EUA, Cuba e França. Atualmente inúmeros países começaram a desenvolver essa tecnologia, visando à produção de mudas em larga

escala, que tenham interesse agrônomo, com destaque as espécies ornamentais, frutíferas e florestais, com maior rapidez e eficiência em relação aos demais métodos convencionais utilizados, paralelamente, há uma redução nos custos do processo (TEIXEIRA, 2002; SOCCOL *et al.* 2008).

Esses sistemas de cultivo *in vitro* vêm sendo utilizados na propagação de diversas espécies que desempenham interesse agrônomo, com destaque a orquídeas (RECH FILHO *et al.* 2004), cana de açúcar (LORENZO *et al.* 1998), seringueira (TEISSON e ALVARD, 1995), e abacaxi (SILVA *et al.* 2007).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma modelagem e simulação matemática do comportamento em um biorreator de imersão por bolhas, visando obter parâmetros para escalonamento e melhoria no processo de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Parte experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, durante o ano de 2008.

O sistema B.I.B.[®] (Figura 17): “*Biorreator de Imersão por Bolhas*”, desenvolvido por Soccol *et al.* (2008) pode ser utilizado para a produção de espécies frutíferas, ornamentais e florestais. O equipamento é confeccionado com vidro temperado em formato cilíndrico, tem dois compartimentos, que é dividido transversalmente por uma placa porosa de 170 a 220 μm . A parte inferior possui 3,5 cm de altura, e nela encontra-se um orifício para a entrada do ar, e a parte superior possui 24,5 cm de altura e neste compartimento são inseridos os estágios entre 2 a 5 cm de altura cada, todos os componentes internos são de aço inox. O biorreator totaliza 28 cm de altura com 9 cm de diâmetro, mas pode ser alterada conforme a necessidade da empresa ou instituição. O equipamento funciona a partir de um sistema interligado por tubos de borracha flexível, a solução nutritiva passa do compartimento inferior (pré-estágio) para os estágios superiores por meio da injeção de ar no compartimento inferior. Quando a solução nutritiva passa para o compartimento superior, ocorre a aeração e contato com o material em cultivo.

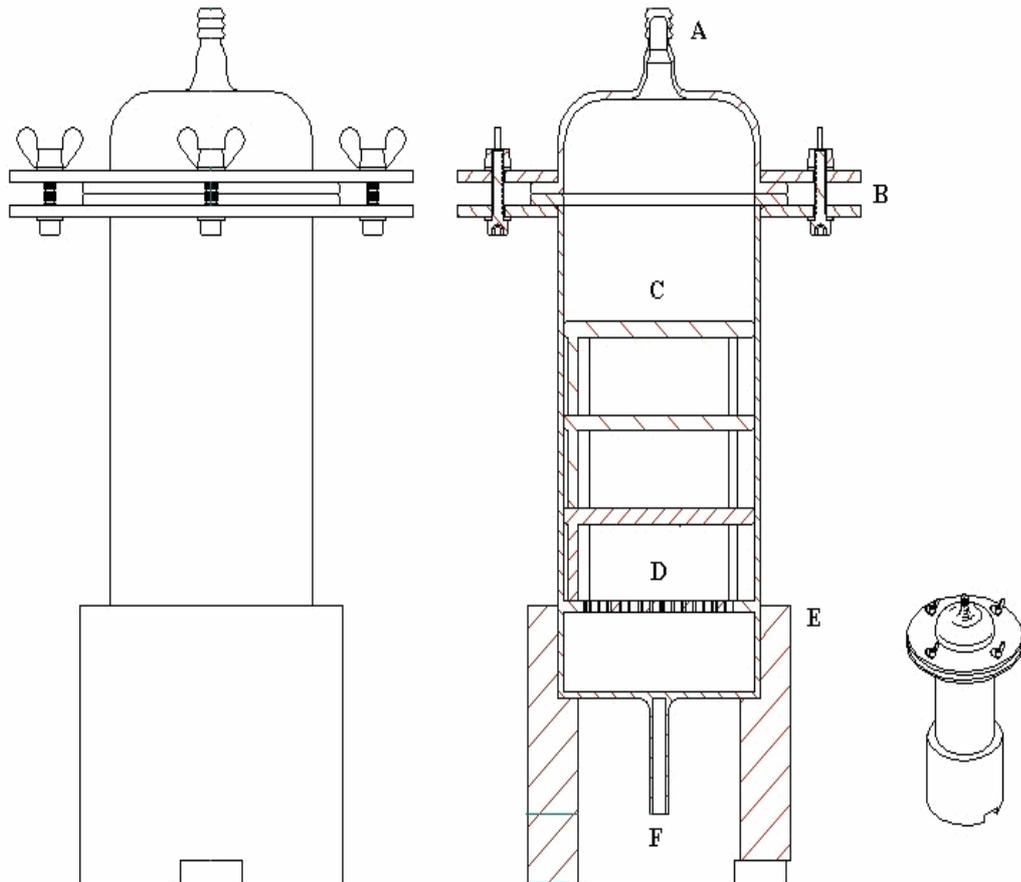


Figura 17: Desenho esquemático do biorreator de imersão por bolhas. A): Saída de ar; B): Kit fixação; C): Estágios; D): Placa porosa; E): Base; F): Entrada de ar.

Fonte: Soccol *et al.* (2008).

Fonte de explantes

Plântulas de *Oncidium leuochilum* provenientes de semeadura *in vitro* na solução nutritiva (MS) solidificado, foram utilizadas para a realização do experimento. As brotações encontravam-se em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo “branca-fria”. Trinta dias antes da instalação deste experimento, as brotações foram individualizadas e transferidas para a solução nutritivas MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com a metade da concentração dos sais, vitaminas completas e 6g L^{-1} de ágar, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Solução nutritiva

Neste experimento foi utilizada solução nutritiva líquida MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg L^{-1} de BAP, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, 30 g L^{-1} de sacarose e $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ de Tween[®] 20, pH ajustado para 5,8 e autoclavagem a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por quinze minutos. Foram utilizados 200 mL de meio de cultura no sistema de imersão por bolhas. Os cultivos foram conduzidos em sala de crescimento por 30 dias, sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de $35 \text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo “branca-fria”, com aeração a cada 2 horas por 40 minutos, num total de três repetições e trinta explantes por estágios. As plantas enraizadas, com aproximadamente 0,3 a 0,5 cm de altura foram selecionadas e transferidas para o biorreator de imersão por bolhas.

Respirometria

Os parâmetros foram monitorados por meio de sensores, cujos valores foram armazenados em sistema de aquisição de dados em tempo real desenvolvido com base em plataforma de implementação de supervisórios LAquis (LCDS Brasil, 2008).

Para a medição das quantidades percentuais de O_2 e CO_2 foram utilizados sensores $\text{O}_2\text{-A2}^{\text{®}}$ Alphasense Ltd. UK e GMT220 Vaisala Carbocap[®] Finland, respectivamente. Neste trabalho foram utilizados dois conjuntos destes sensores, um para medição de O_2 e CO_2 na entrada de aeração e outro na saída. A vazão foi determinada pela medição através de sensor por dispersão térmica (STURM, 2004), modelo GFM[®] Aalborg USA. Este sistema foi aplicado conjuntamente com um *software* de aquisição de dados, o qual permitiu monitorar e gravar os valores de todas as variáveis em tempo real conforme (STURM *et al.* 2007). Para a transferência dos dados foi utilizado um sistema conectado em rede conforme protocolo de comunicação de redes industriais Modbus, interligando os controladores aos quais os sinais dos sensores foram aplicados, permitindo a transmissão destes valores através de cabo blindado a dois fios, minimizando a necessidade de cabeamento mais complexo (STURM *et al.* 2007b). Controladores PID universais modelo Novus[®] foram utilizados para monitorar localmente os valores e também como interface entre a rede Modbus e o computador onde os dados foram tratados e armazenados.

Hidrodinâmica

Com o intuito de determinar o grau de eficiência na mistura, bem como a capacidade de transferência de massa entre a fase gasosa e a solução nutritiva no biorreator de imersão

por bolhas, foram feitas medidas de vazão e condutividade relativa do meio para diferentes concentrações de Tween[®] 20, usando como traçador uma solução de cloreto de sódio.

Aeração

A hipótese de saturação só pode ser testada efetivamente por meio de métodos analíticos. No entanto, é possível avaliar a área de troca gasosa, a velocidade superficial e o gás holdup, indicativos da transferência de massa, a partir das medidas de altura da coluna de bolhas, da fase líquida e do tamanho médio de bolhas. Essa avaliação foi feita com a aquisição de imagens usando câmara fotográfica (Pertax Optio E 20) e com essas imagens do biorreator de imersão por bolhas em regime permanente, sem plantas, usando o software ImagePro Plus.

Variáveis avaliadas

Após 30 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis:

A) Concentração de O₂ e CO₂ (vazão de gás); B) Altura de líquido X vazão e Tween[®] 20; C) Condutividade relativa X aeração e tempo; D) Tamanho de bolhas e distribuição de líquido; E) Número total de brotações (NTB); F) Massa fresca total (MFT); G) Altura da parte aérea (APA).

Modelo matemático

Predição dos modelos: Os modelos propostos a seguir têm por objetivo descrever as cinéticas de incremento na massa fresca dos tecidos de *Oncidium leuochilum*, a altura total e número de brotações. São modelos não-estruturados e não-segregados. São propostos modelos consagrados para cinéticas microbianas (logístico e Gompertz). Ambos partem do pressuposto da existência de um patamar máximo para a variável dependente em questão. Espera-se que este tipo de modelo possa descrever bem o comportamento de micropropagação vegetativa *in vitro*, visto que existem limites físicos tanto para o crescimento mássico das plântulas, bem como de sua expansão vertical (altura), determinados pela geometria do biorreator. Além dos modelos clássicos para cinéticas microbianas, é considerado um modelo teórico simples, com dois parâmetros, propondo o seguinte: “A velocidade de crescimento da variável dependente é proporcional à diferença entre um suposto patamar teórico máximo e o valor atual da variável dependente”. Para fins comparativos, as cinéticas são modeladas por um modelo linear (que considera a velocidade de crescimento da variável dependente constante).

Metodologia: Equações diferenciais ordinárias constituem os modelos teóricos. A condição inicial foi fixada com base nos dados observados, e o problema de valor inicial resultante foi resolvido com auxílio do software *Maple 9.50*. As equações algébricas resultantes tiveram seus parâmetros ajustados pela ferramenta *Solver* do software *Microsoft Excel 2003*. O critério usado para a otimização dos parâmetros foi à minimização do valor da soma dos desvios quadrados (*SDQ*). Ainda, foram calculados os respectivos valores de R^2 . Os resultados dos diversos modelos propostos foram comparados.

Uma restrição foi imposta: O parâmetro que indica o máximo valor possível para a altura das plântulas foi limitado superiormente por 5,0 cm (que corresponde à altura de cada nível do biorreator de imersão por bolhas).

Quando o parâmetro que denota valor máximo teórico para a massa fresca excedeu em mais de uma ordem de grandeza o valor observado no último ponto experimental (30 dias), o respectivo modelo foi considerado como “não passível de otimização”.

$$\frac{dN}{dt} = a \quad (1)$$

$$\frac{dN}{dt} = aN \quad (2)$$

$$\frac{dN}{dt} = a \left(1 - \frac{N}{b} \right) N \quad (3)$$

$$\frac{dN}{dt} = aN \ln \left(\frac{b}{N} \right) \quad (4)$$

$$\frac{dN}{dt} = a(b - N) \quad (5)$$

- (1) Modelo linear;
- (2) Modelo exponencial ilimitado;
- (3) Modelo logístico;
- (4) Modelo de Gompertz;
- (5) Modelo simplificado de dois parâmetros.

Nas equações de (1) a (5), N representa a variável dependente (massa fresca ou altura dos explantes) e t representa o tempo. Os parâmetros são denotados por “ a ” e “ b ”. Nas equações (3) e (4), o parâmetro “ b ” pode ser interpretado como o máximo patamar possível

para a variável “N”. O parâmetro “a” na equação (1) é a velocidade de incremento de “N” com relação a “t”, pode ser interpretado como a velocidade específica de incremento (constante) em (2) e como velocidade específica máxima de incremento em (3), (4) e (5).

Soluções dos Modelos Propostos: Para todos os modelos, será considerada a condição inicial $N(0) = N_0$, onde N_0 será mais um parâmetro a ser otimizado para cada modelo.

As soluções para os modelos propostos, ao se considerar a condição acima, são:

$$N = N_0 + at \quad (1.1)$$

$$N = N_0 e^{at} \quad (1.2)$$

$$N = \frac{b}{1 + \frac{b - N_0}{N_0} e^{-at}} \quad (1.3)$$

$$N = b e^{-\ln\left(\frac{b}{N_0}\right) e^{-at}} \quad (1.4)$$

$$N = b + (N_0 - b) e^{-at} \quad (1.5)$$

- (1.1) Solução do modelo linear;
- (1.2) Solução do modelo exponencial ilimitado;
- (1.3) Solução do modelo logístico;
- (1.4) Solução do modelo de Gompertz;
- (1.5) Solução do modelo simplificado de dois parâmetros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à medição das massas de gases produzidos e consumidos pelos explantes de *Oncidium leuchochilum* são apresentados na (Figura 18). Tanto para crescimento quanto para produção de biomassa, foram utilizados sensores, cuja sensibilidade e resolução são limitadas às características de cada modelo e aplicação. Constata-se que irradiância de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida ao longo de 16 horas, foi determinante no consumo de O_2 totalizando 23,8 horas dos ciclos fotossintético.

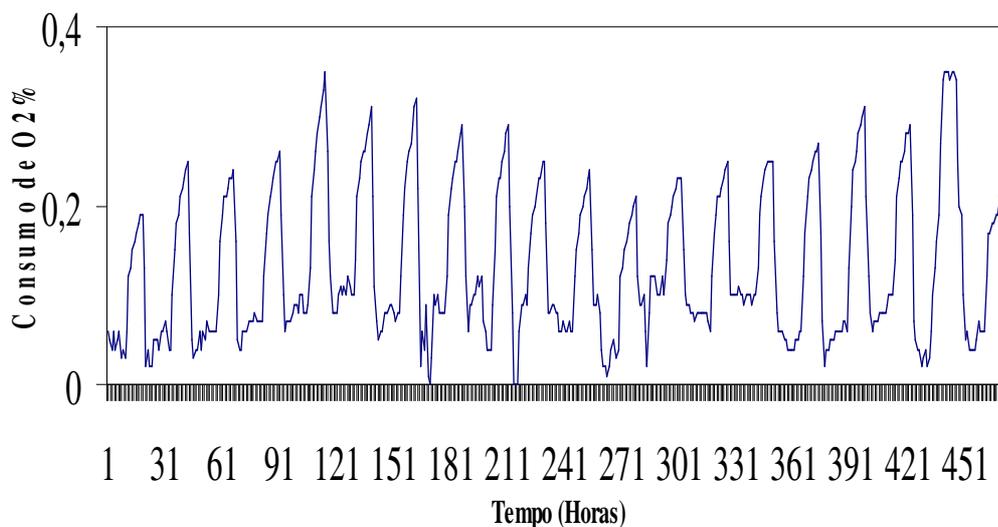


Figura 18: Dados referentes ao consumo de O_2 , em tempo real desenvolvido com base em plataforma de implementação de supervisórios LAquis (LCDS Brasil, 2008).

Devido ao baixo volume de ar transferido para o biorreator, bem como a reduzida taxa de transformação de oxigênio em gás carbônico e vice-versa, verificou-se a falta de sensibilidade suficiente para registrar tais taxas de presença no caso do CO_2 . Porém os sensores de oxigênio apresentaram sensibilidade suficiente para registrar os períodos de respiração e fotossíntese, embora com percentuais bastante reduzidos dados o volume de ar introduzido no biorreator e a sua capacidade de transformação destes gases pelos explantes. Estes períodos foram determinados considerando a percentagem de oxigênio na entrada praticamente constante e comparando-a com a percentagem na saída do sistema de imersão, assim uma redução no consumo indica a produção de oxigênio, haja vista que uma inversão, ou seja, uma quantidade maior de oxigênio na saída comparada à entrada iria exigir uma taxa de aeração menor, bem como uma grande quantidade de explantes capaz de realizar tal transformação em quantidades mensuráveis pelo sistema. Desta mesma forma o sensor de vazão demonstrou completa mesmo às necessidades peculiares desta aplicação, permitindo levantar valores relacionados ao comportamento do biorreator (POHORECKI *et al.* 1999).

Os resultados referentes às estimativas de vazão, em relação a diferentes concentrações de Tween[®] 20 são apresentados na (Figura 19). Pode-se observar pela análise que as vazões de ar necessárias para manter uma coluna com solução nutritiva de 15 cm de altura suficiente para cobrir os três estágios variam de 5 a 6L/min, dependendo da quantidade do agente tensoativo.

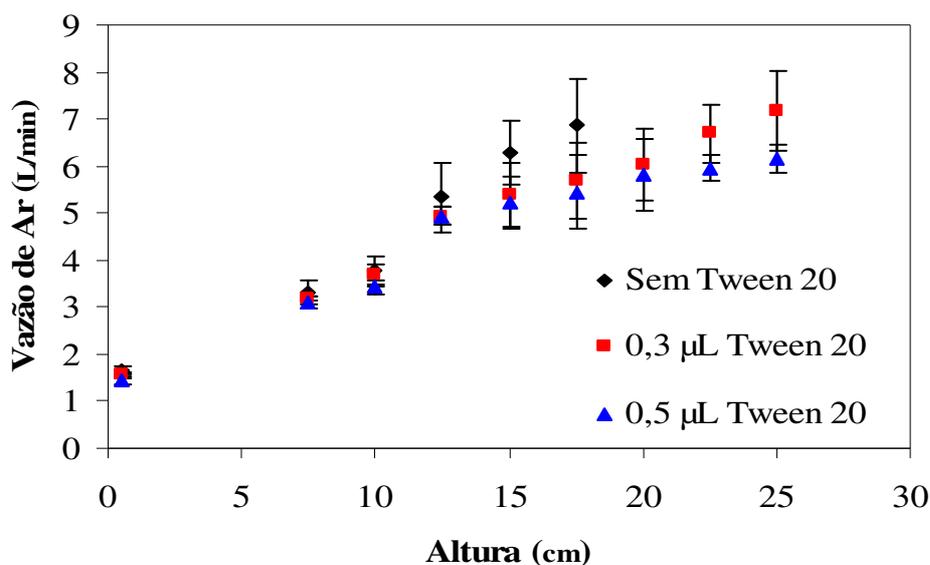


Figura 19: Dados referentes à vazão de ar em tempo real desenvolvido com base em plataforma de implementação de supervisórios LAquis (LCDS Brasil, 2008).

O fato de utilizar quantidades de tensoativo insuficientes para estabilizar a espuma, bem como usar vazões relativamente altas de ar para manter a espuma na altura das plântulas tem duas conseqüências importantes: a) presumivelmente gera altos coeficientes de transferência de O_2 e CO_2 , e b) causa homogeneização da fase líquida – quando ocorre a coalescência das bolhas, parte do líquido escorre, e parte é arrastada para cima novamente.

As concentrações usadas de Tween[®] 20 foram de 1,6 mg/L e 2,7 mg/L, enquanto a CMC para esse tensoativo é estimada em 60 mg/L (BEHRING *et al.* 2004). Para concentrações inferiores à CMC, a diminuição da tensão superficial é uma função suave da concentração de tensoativos observado pela análise de gráficos da referência (SOONG *et al.* 1997). Partindo dessa hipótese, postula-se que a altura de líquido possa ser correlacionada à vazão de ar e à concentração de tensoativo de acordo com uma expressão da forma:

$$A = a \cdot Q^b (1 + c \cdot [T]),$$

Onde A é a altura de bolhas, em cm, Q é a vazão de ar em mg/L e a, b e c são constantes inerentes ao biorreator e à temperatura utilizadas. Nesse caso, os coeficientes aproximados a, b e c que melhor ajustam-se aos dados são respectivamente $a = 0,835$; $b = 1,608$ e $c = 0,162$, com um coeficiente de regressão $R^2 = 0,957$ – que, considerando o erro experimental, é aceitável.

Assim, para concentrações $[T]$ abaixo da CMC, a altura de líquido pode ser controlada pela concentração de tensoativo ou pela aeração. Os resultados referentes às estimativas da altura da solução nutritiva (cm) como função da vazão Q (L/min) e da concentração de Tween[®] 20 (mg/L), a partir do modelo, são apresentados na (Figura 20). A faixa utilizada para plotagem está dentro dos limites experimentais.

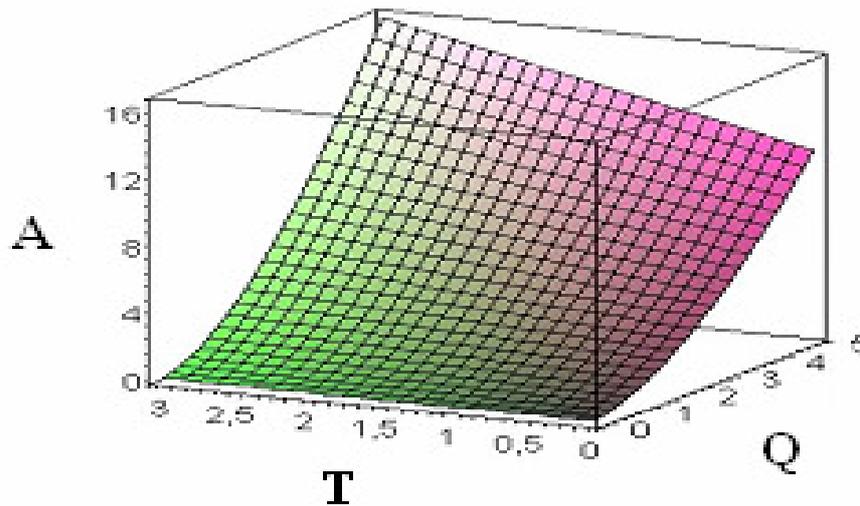


Figura 20: Dados referentes à altura da solução nutritiva como função da vazão Q (L/min), e da concentração de Tween[®] 20 (mg/L) monitorados através de fluxímetro.

A análise do modelo permite concluir que a variação da vazão de ar tem uma influência maior na altura da solução nutritiva que a concentração do Tween[®] 20. No entanto, o trabalho experimental mostra que vazões de ar superiores a 9 L/min geram pressão excessiva no sistema de filtração, e devem ser evitadas.

Considerando que o modelo possa ser extrapolado para concentrações de Tween abaixo da CMC, é possível obter uma estimativa da altura máxima de meio que pode ser obtida usando uma vazão menor, da ordem de $4\text{L}^{-1}\text{min}$: para $[T] = 50\%$ da CMC, $A = 45$ cm. Por outro lado, utilizando vazões maiores de ar, por exemplo, de $7\text{L}/\text{min}$, a altura poderia chegar a $A = 186$ cm. Embora este valor não seja quantitativamente confiável, devido ao consumo de água pela interfase, a extrapolação indica que há possibilidade de escalonamento do biorreator de imersão por bolhas pelo simples aumento da altura dos reatores, ajustando-se a quantidade de ar e de tensoativo, bem como a de líquido – a quantidade de meio deve ser corrigida para manter o gas holdup.

Para verificar o efeito de mistura, avaliou-se a condutividade elétrica entre a grade do 1º e do 2º estágios, usando como traçador uma solução de NaCl. Para concentrações desse

eletrólito abaixo de 0,1M a condutividade elétrica é linearmente proporcional à concentração salina (SIGMA, 2008). Após a injeção do traçador foram feitas medidas de condutividade x tempo até a estabilização.

Os resultados referentes à condutividade relativa no primeiro estágio são apresentados na (Figura 21). Em tese, é possível que após o estabelecimento de regime permanente (isto é, a quantidade de líquido em cada estágio é constante) apenas o gás seja transferido através dos estágios, ou que a troca de líquido seja lenta. De qualquer forma, estando o sistema em regime permanente, a condutividade deve ser uma medida indireta da quantidade de água na fase espuma.

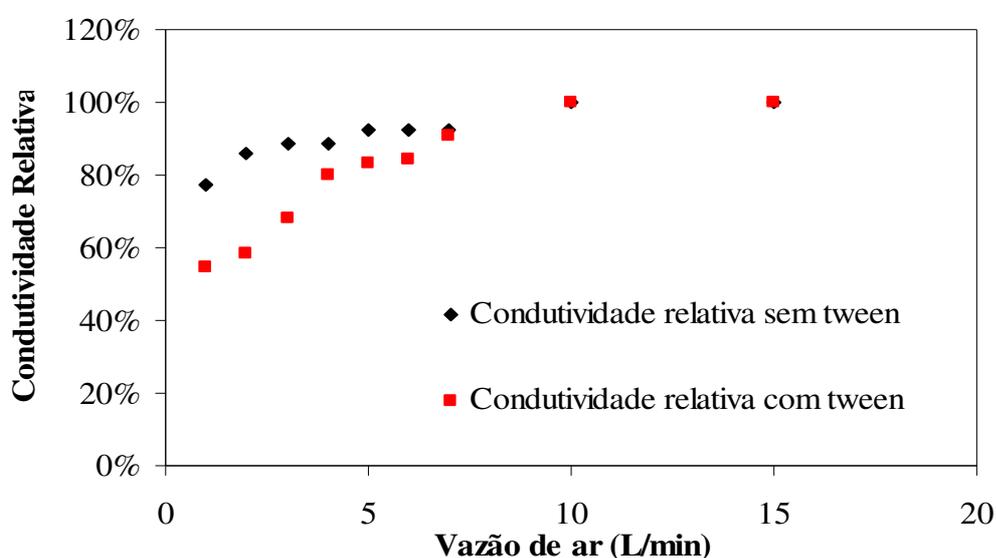


Figura 21: Dados referentes à condutividade elétrica do primeiro estágio como função da aeração e do tempo de aeração, foram monitoradas por um multímetro digital (Minipa ET-1001).

Os resultados referentes ao comportamento da condutividade relativa em função de tempo, para o segundo estágio são apresentados na (Figura 22). É possível verificar que a condutividade elétrica relativa ($S/S_{\text{máxima}}$) aumenta rapidamente com água, e é *menor* para uma mesma aeração quando se utiliza Tween. Esse comportamento possivelmente indica que mais água é arrastada para a fase espuma, quando *não se usa* tensoativo, e que quando se usa tensoativo, a quantidade de água arrastada pelo ar diminui, assim como o tamanho de bolhas. Isso resulta em uma concentração de líquido menor na fase espuma, e, portanto uma condutividade menor.

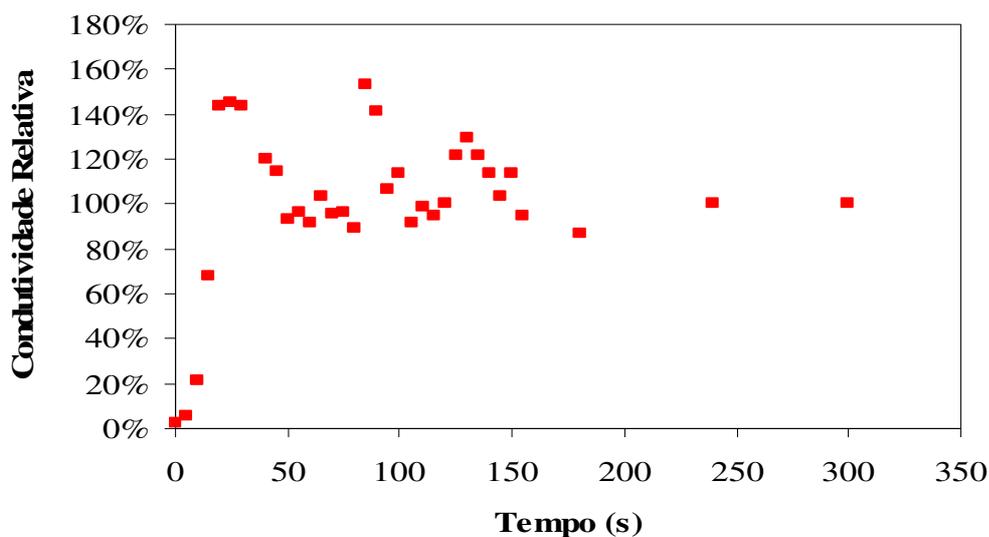


Figura 22: Dados referentes à condutividade elétrica do primeiro estágio como função da aeração e do tempo de aeração, foram monitoradas por um multímetro digital (Minipa ET-1001).

Constata-se pela análise que há estabilização da condutividade (e, portanto, da concentração de sal) após 240 (s). No entanto, a oscilação na leitura mostra que a concentração não varia de forma suave, mesmo considerando erros experimentais, aparentemente a concentração no 2º estágio aumenta acima do ponto de equilíbrio, antes de estabilizar. Esse comportamento pode ser explicado por um modelo *compartimentado* do biorreator de imersão por bolhas, com as seguintes hipóteses:

1) *Compartimentos*: Embora a difusão e a mistura sejam variáveis dentro de um estágio, postula-se que a divisão física (*telas dos estágios*) seja uma barreira representativa. Assim, dividiu-se o biorreator em 4 compartimentos (Figura 23): um sub-estágio, e o primeiro, segundo e terceiro estágios.

2) *Distribuição de líquido*: Com uma vazão de 6L/min e uma altura de líquido suficiente para atingir os três estágios, a distribuição foi aproximadamente de 44 mL abaixo do primeiro estágio, 55 mL no estágio (1), 86 mL no estágio (2) e 16 mL no estágio (3). Em todos os casos, esse líquido está distribuído em uma fase “predominantemente líquida”, na qual o *gas holdup* é inferior a 0,5 e uma fase “predominantemente gasosa”, na qual o *gas holdup* é muito superior a 0,5. Para uma coluna de espuma de 15 cm, o *gas holdup* médio é de 0,79, um valor alto para biorreatores.

3) *Tamanho de bolhas*: Esse tamanho varia bastante, mas com valores observados de 3 a 7 mm (média 4,3mm) para o sub-estágio, de 2,6 a 12mm (média 6,9mm) para o estágio 1,

e de 3,3 a 15,6mm (média 7,5mm) para o estágio 2. Em cada estágio, as bolhas começam na faixa menor e vão sofrendo coalescência parcial, o que mostra que as grades atuam como suporte dos estágios e como difusores, criando novas bolhas. Essa relativa independência dos estágios mostra também que é possível, caso o cultivo seja feito com aeração permanente, utilizar o difusor inferior como um estágio “zero”, com plântulas.

4) *Área interfacial gás-líquido*: A partir dos tamanhos médios de bolhas e do volume de fase predominantemente gasosa em cada seção do reator, é possível estimar as áreas interfaciais. A área para o sub-estágio (onde as bolhas são menores) é de 480 cm², a do primeiro estágio é de 270 cm² e a do segundo estágio de 220 cm². A área do terceiro estágio não foi estimada devido à irregularidade da camada de bolhas, que coalesce de forma oscilante. Portanto, mesmo desconsiderando a área do terceiro estágio, é possível estimar a área total interfacial como sendo da ordem de 1000 cm² nas condições de operação. Essa interface apresenta uma espessura média de líquido *inferior* a 200 mL / 1000 cm² = 0,2 mm, se lembrarmos que nem todo o líquido participa da fração “bolhas” dos estágios. Essa espessura é pequena e renovada por agitação, o que garante a transferência de massa.

5) A contribuição do volume do traçador (5mL em 200mL de solução nutritiva) não causa diferença significativa na distribuição de líquido no biorreator de imersão por bolhas, sendo considerada para cálculo da concentração no tempo 0, no sub-estágio, e em seguida com um aumento de 2,5% nos volumes em todos os estágios.

A partir desses dados, pode-se equacionar a transferência de massa entre os estágios ou compartimentos através de um balanço de massa, usando coeficientes de transferência “k”. O balanço para o 1º estágio é:

$$V_1 \cdot dC_1/dt = F_{S1} \cdot C_S + F_{21} \cdot C_2 - F_{1S} \cdot C_1 - F_{12} \cdot C_1,$$

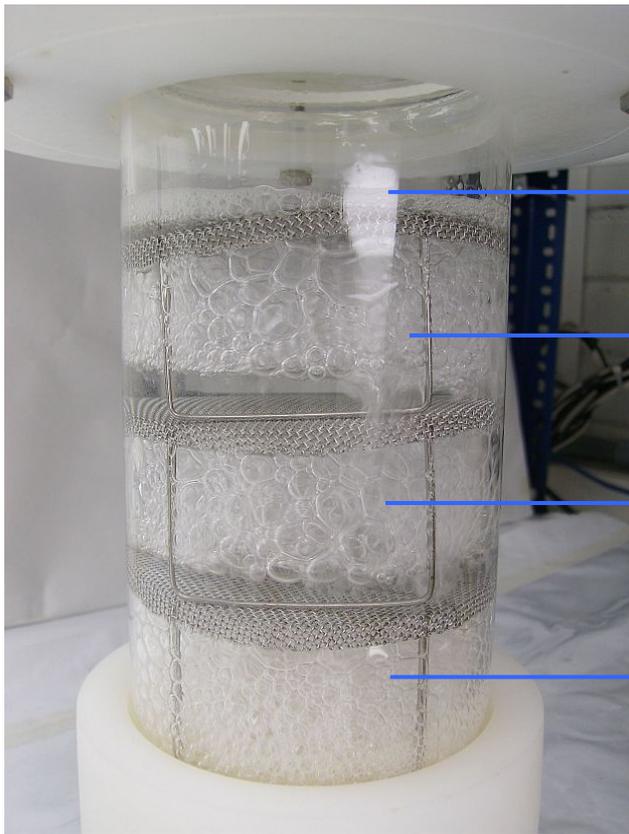
onde: V_1 é o volume de líquido no 1º estágio;

C_S, C_1, C_2, C_3 são as concentrações de sal no sub-estágio 1, e nos estágios 1, 2 e 3, respectivamente;

$F_{S1} = F_{1S}$ = vazão de solução do sub-estágio 1 (S) para o estágio 1, e vice-versa;

$F_{21} = F_{12}$ = vazão de solução do estágio 2 para o estágio 1, e vice-versa;

Simplificando a expressão, $dC_1/dt = F_{S1} \cdot (C_S - C_1) - F_{21} \cdot (C_1 - C_2)$.



Estágio 3:

$$V_3 \cdot dC_3/dt = F_{23}(C_2 - C_3)$$

Estágio 2:

$$V_2 \cdot dC_2/dt = F_{12}(C_1 - C_2) - F_{23}(C_2 - C_3)$$

Estágio 1:

$$V_1 \cdot dC_1/dt = F_{S1}(C_S - C_1) - F_{12}(C_1 - C_2)$$

Sub-estágio 1:

$$V_S \cdot dC_S/dt = F_{S1}(C_S - C_1)$$

Figura 23: Dados referentes à transferência de massa entre os estágios ou compartimentos como função da aeração e do tempo de aeração.

Esse sistema de equações é submetido às seguintes condições de contorno:

- As concentrações iniciais são

$$C_S = (5\text{mL} \cdot 1\text{mol/L}) / (43,5\text{ mL} + 5\text{mL}) = 0,103\text{M} \text{ (é a diluição do sal), e}$$

$$C_1 = C_2 = C_3 = 0;$$

- As concentrações finais são

$$C_S = C_1 = C_2 = C_3 = (5\text{mL} \cdot 1\text{mol/L}) / (200\text{ mL} + 5\text{mL}) = 0,0244\text{M}$$

(pela diluição do sal ao longo de todo o reator)

Os volumes V_S , V_1 , V_2 e V_3 são os já determinados, com um incremento de 2,5%, ou seja:

$$V_S = 44,7\text{ mL}; \quad V_1 = 56,4\text{ mL}; \quad V_2 = 87,6\text{ mL}; \quad \text{e } V_3 = 16,3\text{ mL}.$$

A partir desses valores, é possível encontrar uma família de curvas que ilustra o comportamento do sistema. Uma das soluções é ilustrada abaixo, para $F_{S1} = 2\text{ mL/s}$, $F_{12} = 1\text{ mL/s}$ e $F_{23} = 0,3\text{ mL/s}$.

Os resultados referentes das concentrações de sal por estágios, para $F_{S1} = 2\text{ mL/s}$, $F_{12} = 1\text{ mL/s}$ e $F_{23} = 0,3\text{ mL/s}$, são apresentados na (Figura 24).

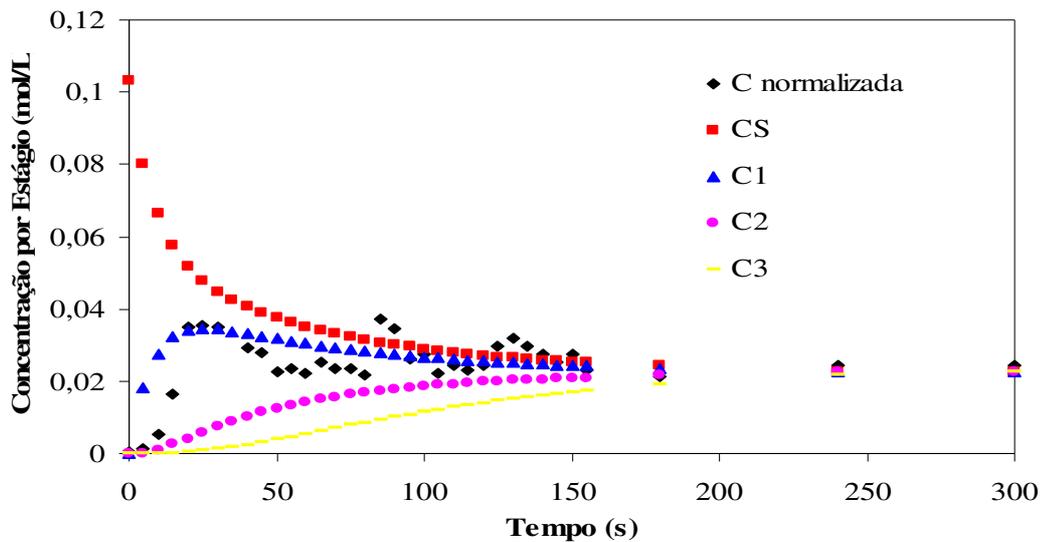


Figura 24: Dados referentes à concentração de sal.

A análise da figura acima permite concluir que a oscilação na concentração de sal pode ser explicada pelo modelo compartimentado, embora sejam necessárias mais medidas para definir quais são os valores reais de vazões de líquido inter-estágios. É possível concluir também que a agitação promovida pela aeração causa homogeneização do meio em questão de minutos (180 s para atingir 95% da concentração de equilíbrio), o que pode ser explicado pelas altas velocidades de transferência de massa entre estágios (F_{S1} , F_{12} , F_{23}).

Os resultados referentes à simulação da concentração de solutos nos estágios 1 e 2 do biorreator de imersão por bolhas, com adição de soluto no sub-estágio 1 (fundo) e no estágio 3 (topo) são apresentados na (Figura 25).

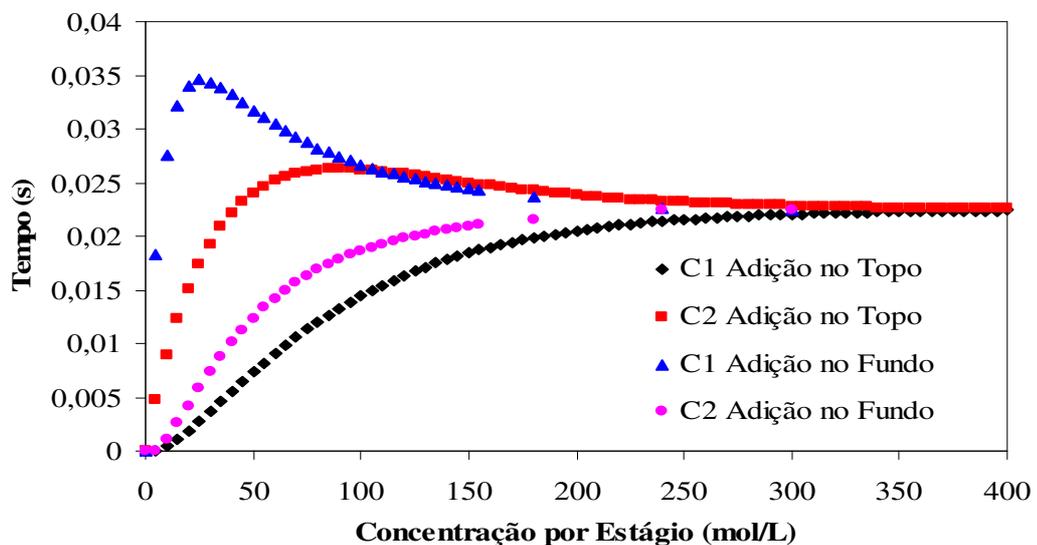


Figura 25: Dados referentes à concentração de solutos nos estágios.

Mesmo no caso de adição de solutos no topo do biorreator de imersão por bolhas, a concentração é estabilizada aos 265 (s) para atingir 95% da concentração de equilíbrio.

Os resultados referentes à medição da cinética para a variável massa fresca de *Oncidium leuchochilum* são apresentados na (Tabela 10). A análise dos resultados permite concluir que, dentre os modelos testados, o exponencial foi o que melhor se ajustou aos dados de massa fresca total ($R^2=0,992$ no 1º estágio do reator e $R^2=0,990$ no 2º estágio).

Tabela 10: Parâmetros otimizados para os modelos da cinética de massa fresca (MS) de *Oncidium leuchochilum* após 30 dias de cultivo no biorreator de imersão por bolhas.

Modelos	Parâmetros							
	1º estágio				2º estágio			
	N_0	a	b	R^2	N_0	a	b	R^2
Linear	337,5	8,93	-	0,974	314,3	6,29	-	0,978
Exponencial	346,4	$1,93 \times 10^{-2}$	-	0,992	319,5	$1,56 \times 10^{-2}$	-	0,990
*Logístico	346,4	$1,93 \times 10^{-2}$	$\rightarrow \infty$	0,992	319,5	$1,56 \times 10^{-2}$	$\rightarrow \infty$	0,990
*Gompertz	$\rightarrow 346,4$	$\rightarrow 0$	$\rightarrow \infty$	$\rightarrow 0,992$	$\rightarrow 319,5$	$\rightarrow 0$	$\rightarrow \infty$	$\rightarrow 0,990$
**Simplificado	$\rightarrow 337,5$	$\rightarrow 0$	$\rightarrow \infty$	$\rightarrow 0,974$	$\rightarrow 314,3$	$\rightarrow 0$	$\rightarrow \infty$	$\rightarrow 0,978$

* Os modelos de Gompertz e logístico tendem ao exponencial

** O modelo simplificado tende ao linear

Os modelos que prevêem limitação para a variável dependente quando $t \rightarrow \infty$ não são passíveis de otimização (logístico, Gompertz e simplificado). O valor de R^2 para os modelos de Gompertz e logístico tende ao valor de R^2 do modelo exponencial quando o parâmetro b (que indicaria o suposto valor máximo da massa fresca) tende ao infinito. O valor de R^2 para o modelo simplificado tende ao valor de R^2 do modelo linear quando b tende ao infinito.

Estes resultados sugerem que o ganho de massa pelas plântulas ainda não sofre efeito de inibição por limitações físicas do biorreator de imersão por bolhas dentro do horizonte de tempo do experimento (30 dias). No entanto, as plântulas do 2º estágio têm um incremento específico de massa inferior às do 1º estágio ($1,93 \times 10^{-2} \text{dia}^{-1}$ e $1,56 \times 10^{-2} \text{dia}^{-1}$, respectivamente, considerando o modelo exponencial), o que pode indicar certo grau de impedimento do crescimento no 2º estágio com relação ao 1º.

Os resultados referentes às estimativas dos valores médios para a variável, número total de brotações dos explantes de *Oncidium leuchochilum* são apresentados na (Figura 26).

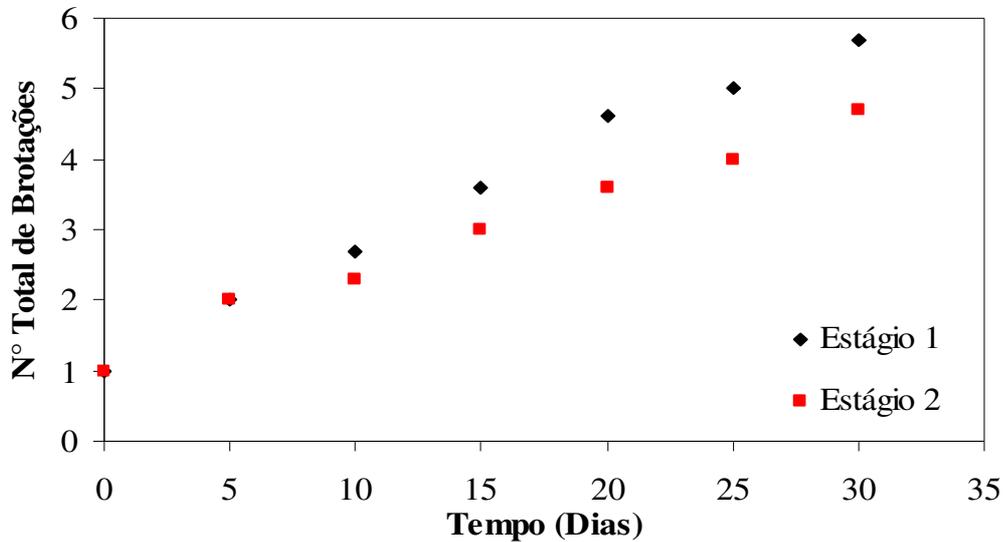


Figura 26: Dados referentes ao número total de brotações.

Os resultados referentes às estimativas dos valores médios para a variável massa fresca total dos explantes de *Oncidium leuchochilum* são apresentados na (Figura 27). Neste ciclo, os explantes foram imersos durante quarenta minutos na solução nutritiva doze vezes ao dia o que, provavelmente, possibilitou uma maior absorção e aproveitamento do meio.

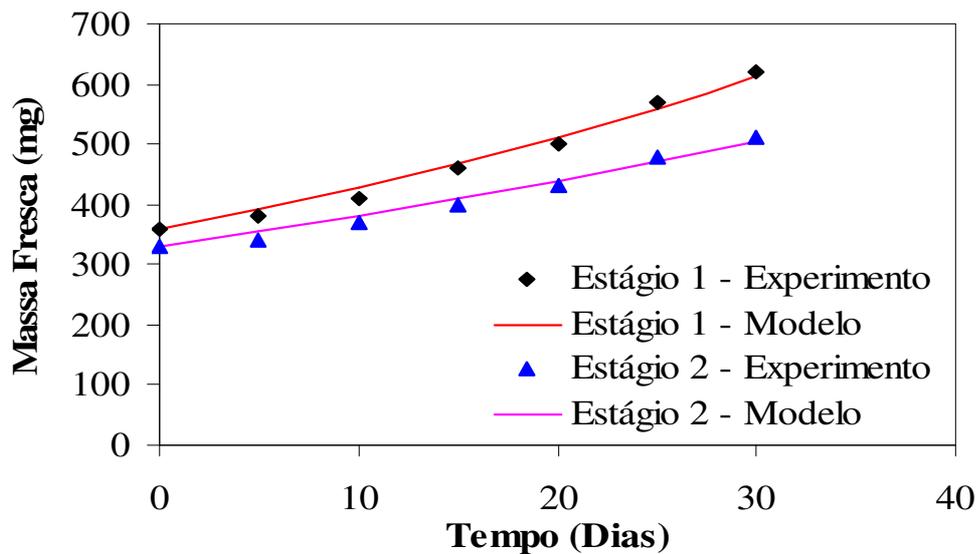


Figura 27: Dados referentes à cinética de massa fresca (g) utilizando o modelo exponencial.

Essa maior produção de massa fresca no primeiro estágio, observada no sistema de imersão por bolhas, deve-se, possivelmente, a um maior contato do meio líquido com os

explantes, o que proporcionou uma maior área de absorção e, conseqüentemente, melhor aproveitamento da solução nutritiva.

Os resultados da cinética para a variável altura da parte aérea de *Oncidium leuchochilum* são apresentados na (Tabela 11).

Tabela 11: Parâmetros otimizados para os modelos da cinética de altura da parte aérea (APA) de *Oncidium leuchochilum* após 30 dias de cultivo no biorreator de imersão por bolhas.

Modelos	Parâmetros							
	1º estágio				2º estágio			
	N_0	a	b	R^2	N_0	a	b	R^2
Linear	0,537	$1,25 \times 10^{-2}$	-	0,970	0,513	$6,64 \times 10^{-3}$	-	0,979
Exponencial	0,554	$1,70 \times 10^{-2}$	-	0,953	0,518	$1,08 \times 10^{-2}$	-	0,976
*Logístico	0,523	$5,72 \times 10^{-2}$	1,057	0,975	0,512	$2,47 \times 10^{-2}$	1,099	0,979
*Gompertz	0,520	$4,11 \times 10^{-2}$	1,12	0,977	0,512	$1,49 \times 10^{-2}$	1,27	0,979
**Simplificado	0,517	$2,48 \times 10^{-2}$	1,24	0,979	0,511	$5,29 \times 10^{-3}$	1,87	0,980

* Os modelos de Gompertz e losístico tendem ao exponencial

** O modelo simplificado tende ao linear

Os modelos que melhor descreveram o crescimento vertical foram os que prevêm limitação, a saber: logístico ($R^2=0,975$ no 1º estágio e $R^2=0,979$ no 2º estágio), o de Gompertz ($R^2=0,977$ no 1º estágio e $R^2=0,979$ no 2º estágio) e o simplificado de dois parâmetros ($R^2=0,979$ no 1º estágio e $R^2=0,980$ no 2º estágio).

Os resultados referentes às estimativas dos valores médios para a variável, altura da parte aérea dos explantes de *Oncidium leuchochilum* são apresentados na (Figura 28).

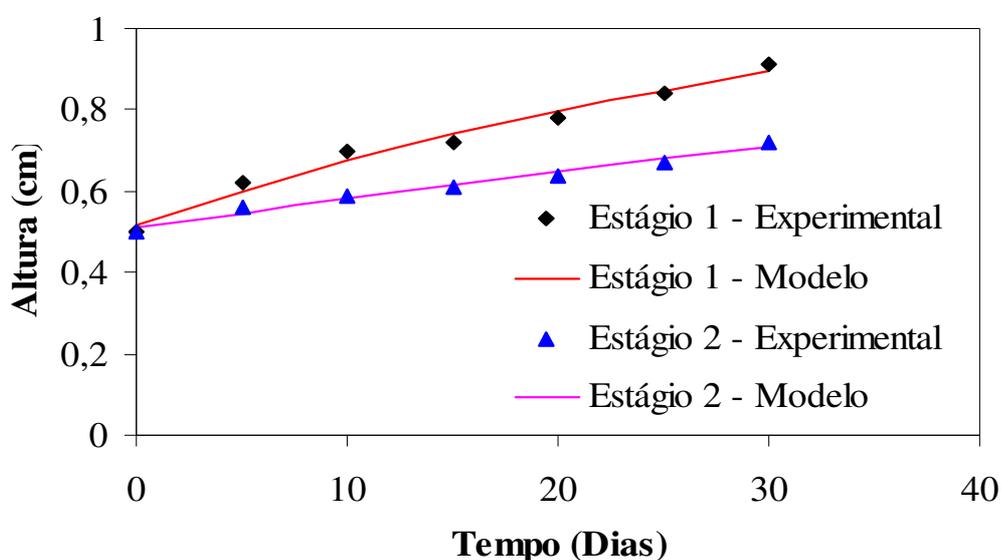


Figura 28: Dados referentes à cinética da altura da parte aérea (cm) utilizando o modelo simplificado.

Assim como ocorreu para a cinética da massa fresca, percebe-se a maior dificuldade no que diz respeito à aquisição de altura pelas plântulas no 2º estágio com relação ao 1º estágio. Observa-se que a cinética de crescimento vertical exibe comportamento distinto com relação à cinética de ganho de massa, o que motiva futuros trabalhos com o intuito de investigar se tal efeito é devido ao metabolismo e fisiologia da espécie em estudo, ou devido as propriedades geométricas e funcionais do biorreator.

CONCLUSÕES

Tendo em vista a busca por tecnologias simples, bem como a minimização dos custos, os resultados encontrados mostram que o biorreator de imersão por bolhas é uma alternativa promissora em produção de mudas em larga escala.

A análise das simulações mostrou que o modelo compartimentado do biorreator foi capaz de descrever de forma coerente a hidrodinâmica do sistema.

Quanto aos modelos cinéticos, o modelo exponencial foi o que melhor se ajustou para o incremento de massa fresca. Entretanto, o modelo simplificado descreveu com maior precisão os resultados para a altura da parte aérea das plântulas de *Oncidium leuochilum*.

REFERÊNCIAS

BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova** . v. 27, p.492-495, 2004.

CASTILHO, L. R.; ANSPACH, F. B. CFD-aided design of a dynamic filter for mammalian cell separation. **Biotechnology and Bioengineering**. v.83, p. 514-524, 2003.

KONSTAS, J.; KINTZIOS, S. Developing a scale-up system for the micropropagation of cucumber (*Cucumis sativus* L.): the effect of growth retardants, liquid culture and vessel size. **Plant Cell Reports**. v. 21, p. 538-548, 2003.

LCDS. Leão Consultoria e Desenvolvimento de Sistemas LTDA. Disponível em <http://www.lcds.com.br/lcds.asp>, Acesso em 10 de novembro de 2008.

LORENZO, J.C.; GONZALEZ, B.L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.54, p.197-200, 1998.

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

MURCH, S.; PEIRIS, S. E.; LIU, C.Z.; SAXENA, P.K. *In vitro* conservation and propagation of medicinal plants. **Biodiversity**. v. 5, p. 19-24, 2004.

ONISCU, C.; GALACTION, A. I.; CASCAVAL, D. The characterization of mechanical mixing bioreactors efficiency. *Rev. Chim.* v.54, p. 241-249, 2003.

POHORECKI, R., MONIUK, W., ZDROJKOWSKI, A. "Hydrodynamics of a Bubble Column Under Elevated Pressure," **Chemical Engineering Science**. v. 54, p. 5187-5193. 1999.

RECH FILHO, A. Sistemas de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas para a consolidação de protocolos para a micropropagação de bromélias. (**Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais**) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 74, 2004.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagation of helicônia plantlets in temporarily immersion bioreactor. **Bragantia**. v. 65, p. 29-35, 2006.

SIGMA PRODUCT INFORMATION – Disponível em www.sigma-aldrich.com, acessado em 11/11/08.

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

SOCCOL, C. R.; SCHEIDT, G. N.; MOHAN, R. Biorreator do tipo imersão por bolhas para as técnicas de micropropagação vegetal. Universidade Federal do Paraná. Patente (**DEPR. 01508000078**). 03/03/ 2008.

SOONG, Y.; HARKE, F. W.; GAMWO, I. K.; SCHEHL, R. R.; ZAROCHAK, M. F. "Hydrodynamic Study in a Slurry Bubble-Column Reactor." **Catalysis Today**. v. 35, p. 427-434, 1997.

SOUZA JÚNIOR, D. L.; OLIVEIRA-LOPES, L. C. **Análise de Bifurcações Aplicada A Biorreatores**. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. p. 1-6, 2005.

STURM, W. **Sensores Industriais-Conceitos Teóricos e Aplicações Práticas**. Papel Virtual Editora: Rio de Janeiro, 2004.

STURM, W.; DERGINT, D. E. A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. **Instrumentation and Control in SSF** (Chapter 07) In: Current Developments in Solid-State Fermentation. v.1, p.146-168. 1 Ed, New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2007b.

STURM, W.; SOCCOL, C. R.; DERGINT, D. E. A.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; MAGALHAES, D. C. N. V.; PANDEY A. **Informatics in Solid-State Fermentation** (Chapter 08). In: Ashok Pandey; Carlos Ricardo Soccol e Christian Larroche. (Org). Current Developments in Solid-State Fermentation. 1 Ed, v. 1, p. 169-180. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2007.

TEISSON, C.; ALVARD, C. A new concept of plant in vitro cultivation liquid médium: temporary immersion. In: TERZI, M. (Ed.). **Current issues in plant molecular and celular biology**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers. p. 105-110, 1995.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Revista Ciência e desenvolvimento**. v. 24, p.36-41, 2002.

UNGER, D. R.; MUZZIO, F. J.; AUNINS, J. E.; ZINGHVI, R. Computational and experimental investigational of flow and fluid mixing in roller bottle bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**. v.70, p. 117-130, 2000.

WU, C. K. Formação de Mudas e Microtubérculos de Batata (*Solanum tuberosum* L.) em Sistemas Biorreatores. (**Mestrado em Agricultura Tropical de Subtropical**), Instituto Agrônômico de Campinas, p. 83, 2007.

XIE, L. Z.; METALLO, C.; WARREN, J.; PILBROUGH, W.; PELTIER, J.; ZHONG, T.; PIKUS, L.; YANCY, A.; LEUNG, J.; AUNINS, J. G.; ZHOU, W. C. Large-scale propagation of a replication-defective adenovirus vector in stirred-tank bioreactor PER.C6 (TM) cell culture under sparging conditions. **Biotechnology and Bioengineering**. v.83, p. 45-52, 2003.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram a viabilidade do biorreator de imersão por bolhas na propagação de plantas de alto valor agregado. Assim, o equipamento desenvolvido e patenteado adicionou novas e importantes informações para a micropropagação, contribuindo para o avanço tecnológico nesta área da biotecnologia vegetal, oportunizando a produção massal de propágulos, com conseqüente aumento da produção em larga escala. Porém, alguns pontos podem ser explorados, como por exemplo:

- Desenvolver protocolos para as etapas de cultivo inicial, multiplicação e enraizamento, utilizando espécies de interesse agrônômico;
- Desenvolver protocolos de micropropagação de plantas transgênicas;
- Realizar protocolos de cultivo de células e/ou calos de espécies medicinais e aromáticas que tenham substâncias interesse pela indústria;
- Realizar os mesmos experimentos avaliando diferentes soluções nutritivas, a partir de resíduos agro-industriais;
- Realizar cultivo de espécies nativas para programas de reflorestamento, bem como, cultivar plantas que estão ameaçadas de extinção;
- Dimensionar um novo biorreator de imersão por bolhas, visando um aumento de cultivo dos propágulos;
- Verificar o comportamento das plantas *in vitro*, após permanência por longo período no biorreator.