

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PRAGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM COMPUTAÇÃO APLICADA

DESENVOLVIMENTO DE UM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA
COM SISTEMA DE SOFTWARE E HARDWARE PARA MANIPULAÇÃO E
GERENCIAMENTO DOS DADOS

LUIZ ANTONIO ZANLORENSI JUNIOR

PONTA GROSSA
2016

LUIZ ANTONIO ZANLORENSI JUNIOR

DESENVOLVIMENTO DE UM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA
COM SISTEMA DE SOFTWARE E HARDWARE PARA MANIPULAÇÃO E
GERENCIAMENTO DOS DADOS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Computação Aplicada
da Universidade Estadual de Ponta Grossa,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre.

Orientação: Prof. Dr. Alceu de Souza Britto
Junior

PONTA GROSSA
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

B862 Zanlorensi Junior, Luiz Antonio
 Desenvolvimento de um biorreator de
 imersão temporária com sistema de software
 e hardware para manipulação e
 gerenciamento dos dados/ Luiz Antonio
 Zanlorensi Junior. Ponta Grossa, 2016.
 62f.

 Dissertação (Mestrado em Computação
 Aplicada - Área de Concentração:
 Computação para Tecnologias em
 Agricultura), Universidade Estadual de
 Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Alceu de Souza
 Britto Junior.

 1.Biotecnologia. 2.Sistema de imersão
 temporária. 3.Automação. I.Britto Junior,
 Alceu de Souza. II. Universidade Estadual
 de Ponta Grossa. Mestrado em Computação
 Aplicada. III. T.

CDD: 006.3


TERMO DE APROVAÇÃO


Luiz Antonio Zanlorensi Junior


**“DESENVOLVIMENTO DE UM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA
COM SISTEMA DE SOFTWARE E HARDWARE PARA MANIPULAÇÃO E
GERENCIAMENTO DOS DADOS”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Computação Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:


Dr. Alceu de Souza Britto Junior
UEPG


Dr. Ricardo Antonio Ayub
UEPG


Dr. Amanda Regina Godoy Baptista
UEPG

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de 2016.

Dedico a meu pai (*in memoriam*) por
todo carinho, incentivo e apoio que me deu ao
longo de sua vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a toda minha família, por todo incentivo e apoio em minhas decisões. Especialmente a minha mãe Josiane e minha irmã Heloisa que sempre estiveram presentes mesmo nas horas mais difíceis.

Ao professor e grande amigo Ivo Mario Mathias, que me acompanhou desde o início da graduação, sendo meu orientador de Iniciação científica, TCC e também em grande parte do Mestrado. Agradeço por ter acreditado em minha capacidade, pelo incentivo, ensinamentos e também pela ajuda em tomadas de decisões profissionais em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alceu de Souza Britto Junior, pelo auxílio nesse e em outros projetos realizados durante o Mestrado e ao Prof. Dr. Ariangelo Hauer Dias pelo apoio técnico no desenvolvimento do sistema.

Ao meu grande amigo Robson Fernando Duda, por todo o auxílio durante a minha graduação e pela oportunidade de participar do projeto de sua dissertação, a qual me forneceu muita experiência profissional. Agradeço em especial por sua amizade e apoio em momentos difíceis.

A todos do laboratório de fruticultura, que contribuíram direta e indiretamente à realização desse trabalho. Especialmente ao Prof. Dr. Ricardo Ayub pela oportunidade e por todo o suporte e aos alunos Jessé e Marina pela ajuda na realização dos experimentos.

Ao meu colega e amigo Daurimar Mendes pela participação ativa na engenharia e construção do biorreator e também por compartilhar seus conhecimentos e experiência em outros projetos.

A todos meus colegas do laboratório InfoAgro pela contribuição em todos os projetos realizados, pela troca de experiências e também pelos momentos de descontração. Especialmente aos meus amigos Victor, Rayson, Jackson, Gustavo, Suelyn e a Prof. Dr. Alaine Margarete Guimarães.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro e pela disponibilização de artigos por meio do portal de periódicos, tornando possível a realização desse trabalho.

“O pensar é para o homem, o que é o voar para os pássaros.”
Albert Einstein)

RESUMO

A cultura de tecidos de plantas é uma das áreas de maior êxito da biotecnologia, possuindo destacada posição comercial e industrial de plantas em diversas aplicações, como melhoramento genético e também em pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários. A micropropagação é uma técnica de cultura de tecido, considerada a de maior impacto na agricultura, devido ao fato de contribuir com o desenvolvimento de plantas saudáveis e com maior qualidade. Um dos principais problemas do processo convencional de micropropagação é o gasto com mão de obra. Uma solução para esse problema é o uso de biorreatores para a produção de plantas *in vitro*, sendo a tecnologia mais recente e a alternativa mais promissora nessa área. Nesse contexto, esse trabalho teve por objetivo desenvolver um sistema de biorreator de imersão temporária integrado a um sistema computacional. O sistema desenvolvido pode ser utilizado para produção em escala e para experimentos com fins de pesquisas. Também foi apresentado parte de um protocolo, demonstrando que as quantidades de meio de cultura entre 175 e 180 ml obtiveram melhores resultados para a produção de Amora Preta Cv. Tupy em sistemas de biorreatores de imersão temporária.

Palavras-chave: Biotecnologia, Sistema de imersão temporária, Automação.

ABSTRACT

The culture of plant tissues is one of the most successful areas of biotechnology, having highlight in industrial and commercial plants for various applications, such as genetic improvement and also for plant physiology research and in vitro industrial production of secondary compounds. The micropropagation is a tissue culture technique, considered the greatest impact on agriculture due to the fact contribute to the development of healthy plants and higher quality. One of the main problems of conventional micropropagation process is spent on labor. One solution to this problem is the use of bioreactors for the production of plants in vitro, being the latest technology and the most promising alternative in this area. In this context, this study aimed to develop an integrated temporary immersion bioreactor system to a computer system. The system developed can be used for production in large scale and research. It was also shown part of a protocol, demonstrating that the amounts of culture medium between 175 ml and 180 have best results for the production of Blackberry Cv. Tupy in temporary immersion bioreactors systems.

Keywords: Biotechnology, Temporary immersion system, Automation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micropropagação convencional.....	17
Figura 2 - Sistema de frascos duplos.....	22
Figura 3 - Sistema de inundação e drenagem.....	23
Figura 4 - Sistema RITA®.....	24
Figura 5 - Bioreator foto termo.....	25
Figura 6 - Sistema híbrido de inundação e drenagem.....	27
Figura 7 - Biorreator de imersão por bolhas BIB®.....	28
Figura 8 - Biorreator de tambor rotatório.....	29
Figura 9 - Sistema de balanço.....	30
Figura 10 - Sistema BioMINT.....	30
Figura 11 - Biorreator RALM.....	31
Figura 12 - Sistema de biorreator de imersão temporária SETIS.....	32
Figura 13 - Biorreator PLANTFORM.....	32
Figura 14 - Biorreator de onda.....	33
Figura 15 - Biorreator desenvolvido pela Embrapa.....	34
Figura 16 - Recursos disponíveis do Arduino.....	38
Figura 17 – Materiais eletrônicos.....	41
Figura 18 - Materiais pneumáticos.....	41
Figura 19 - Esquema elétrico e eletrônico.....	44
Figura 20 - Unidade controladora.....	45
Figura 21 - Módulo para transferência de ar pressurizado.....	45
Figura 22 - Esquema do funcionamento pneumático do biorreator.....	46
Figura 23 - Biorreator com recipientes de 1l.....	47
Figura 24 - Biorreator com recipientes de 500 ml.....	47
Figura 25 - Tela principal.....	48
Figura 26 - Tela de status de produção.....	49
Figura 27 - Tela de configuração do sistema.....	50
Figura 28 - Gráfico de distribuição de número de folhas, número de brotação, comprimento de raiz, comprimento total do explante e massa fresca.....	52
Figura 29 - Médias e agrupamento de Tukey para número de folhas, número de brotação, comprimento de raiz, comprimento total e massa fresca.....	53
Figura 30 - Gráfico de curvas.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicação de biorreator de imersão temporária desde 2005	35
Tabela 2 - Materiais utilizados	42
Tabela 3 - Quantidade de meio de cultura ideal	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. OBJETIVO GERAL.....	13
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
1.3. ESTRUTURA DO TRABALHO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. MICROPROPAGAÇÃO.....	15
2.2. BIORREATORES.....	17
2.2.1. Biorreator aerador agitador (<i>aeration-agitation bioreactor</i>).....	19
2.2.2. Biorreator com filtro rotatório (<i>spin filter bioreactor</i>).....	19
2.2.3. Biorreator de borbulhamento (<i>air-driven bioreactor</i>).....	19
2.2.4. Biorreator de aeração simples e biorreator de coluna de bolha (<i>simple aeration bioreactors and bubble column bioreactor</i>).....	19
2.2.5. Biorreator de elevação por ar (<i>air-lift bioreactor</i>).....	20
2.2.6. Biorreator de fase gasosa (<i>gaseous phase bioreactor</i>).....	20
2.2.7. Biorreator de aeração por membrana permeável a oxigênio (<i>oxygen permeable membrane aerator bioreactor</i>).....	20
2.2.8. Biorreator de sobreposição de aeração (<i>overlay aeration bioreactor</i>).....	21
2.3. BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	21
2.3.1. Sistema de frascos duplos (<i>twin-frask system</i>).....	21
2.3.2. Sistema de inundação e drenagem (<i>ebb-and-flow or ebb-and-flood</i>).....	22
2.3.3. Sistema RITA (<i>RITA system</i>).....	23
2.3.4. Biorreator foto termo (<i>thermo-photo-bioreactor</i>).....	25
2.3.5. Sistema híbrido de inundação e drenagem (<i>hybrid ebb-and-flow</i>).....	26
2.3.6. Biorreator de imersão por bolhas (<i>bioreactor of immersion by bubbles</i>).....	27
2.3.7. Biorreator de tambor rotatório (<i>rotating drum system</i>).....	29
2.3.8. Sistema de balanço (<i>rocker system</i>).....	29
2.3.9. Biorreator RALM (<i>bioreactor RALM</i>).....	31
2.3.10. Sistema de biorreator de imersão temporária SETIS (<i>SETIS temporary immersion bioreactor system</i>).....	32
2.3.11. Biorreator PLANTFORM (<i>PLANTFORM bioreactor</i>).....	32
2.3.12. Biorreator de onda (<i>WAVE bioreactor</i>).....	33
2.3.13. Biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa.....	34

2.4.	APLICAÇÃO DE BIORREADORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....	35
2.5.	PLACA CONTROLADORA ARDUINO.....	37
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1.	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE BIORREATOR.....	39
3.2.	EXPERIMENTO COM AMORA PRETA.....	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1.	BIORREATOR IMERSÃO TEMPORÁRIA DESENVOLVIDO.....	44
4.2.	EXPERIMENTO COM AMORA PRETA REALIZADO.....	52
5.	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Segundo Giacometti (1990), uma das áreas de maior êxito da biotecnologia é a cultura de tecidos de plantas. Essa tecnologia possui destacada posição comercial e industrial de plantas em diversas aplicações, como melhoramento genético e também em pesquisas relacionadas à fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários.

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecido, considerada a de maior impacto na agricultura, devido ao fato de contribuir com o desenvolvimento de plantas saudáveis e com maior qualidade. Outra característica importante é que essa metodologia pode ser utilizada na cultura de diversas espécies de plantas (TEIXEIRA, 2011).

Uma das características da micropropagação, também chamada de clonagem vegetal, é que esta técnica de cultivo *in vitro* de plantas abrange de forma interdisciplinar diversas áreas como genética, bioquímica, fitopatologia, morfologia, fisiologia, entre outras. Devido ao fato de que a micropropagação incrementa a produtividade de plantas, essa metodologia se destaca em vários setores agrícolas, como horticultura, floricultura, área florestal e também a fruticultura (ULISSES et al., 2010).

Gerald (2011) expõe que o cultivo *in vitro* em escala industrial é uma abordagem bastante difundida em agroindústrias de flores, por ser um método biotecnológico consagrado e principalmente por permitir a produção de plantas com melhor qualidade e maior velocidade se comparado aos métodos convencionais. Outro fator importante a se considerar, é que essa tecnologia pode ser utilizada na produção de todas as plantas que se propagam de forma vegetativa, sendo a mais utilizada para a produção de plantas ornamentais, porém dependendo da região, também se aplica com bastante frequência em plantas frutíferas.

Um dos principais problemas do processo convencional de micropropagação, o qual utiliza meio de cultura, é o gasto com mão de obra, podendo chegar a 70% do custo final da muda. Esse custo ocorre principalmente na fase de enraizamento da planta. Outro fator é a necessidade da utilização de uma grande quantidade de frascos e da manipulação dos explantes em capela de fluxo laminar para a subdivisão dos agregados de gemas em segmentos menores (TEIXEIRA, 2011).

No sistema convencional de micropropagação, são utilizados meios de cultura com consistência gelatinosa para melhor fixação dos explantes, sendo esses posicionados verticalmente nos recipientes. Para obter essa consistência normalmente

são utilizados agentes gelificantes, geralmente a base de ágar, o qual é produzido por algas marinhas, porém também podem ser utilizadas gomas tipo *gellan* produzidas por bactérias. Uma das principais desvantagens desse método tradicional se deve ao custo dos componentes e a diminuição da taxa de multiplicação e biomassa devido à baixa taxa de absorção dos nutrientes pelos explantes (LEMOS, 2013).

Considerando os problemas expostos do sistema convencional de micropropagação, porém não descartando essa metodologia visto que dependendo do tipo de cultivo ainda é o método mais viável, Teixeira (2011) afirma que o uso de biorreatores para a produção de plantas *in vitro* é a tecnologia mais recente e a alternativa mais promissora nesse campo, sendo uma técnica econômica e simples, resultando em plantas muito melhores que as produzidas no sistema convencional.

Biorreatores são equipamentos utilizados na cultura de tecidos de plantas, por meio de células, gemas, embriões ou qualquer outro tipo de propágulo. Os biorreatores utilizam meio líquido de cultura, a qual pode ser exposta sob imersão temporária ou permanente, ambas com renovação de ar durante o cultivo, podendo controlar ou monitorar parâmetros de interesse ao crescimento dos explantes, como temperatura, nível de oxigênio, entre outros (TEIXEIRA; CID, 2010).

Os biorreatores podem ser construídos utilizando diversas tecnologias como elétricas e eletrônicas, mecânicas, pneumáticas, entre outras. No caso específico de biorreatores de imersão temporária, foco desse trabalho, é necessária uma metodologia para configurar e controlar o tempo em que as plantas ficaram submersas ao meio de cultura. Dessa forma, podem ser utilizados microcontroladores responsáveis pelo controle do tempo.

Uma alternativa para o desenvolvimento de sistemas para a automação de biorreatores é a aplicação da placa controladora Arduino, a qual possui um microcontrolador programável sendo possível definir as funcionalidades específicas que serão executadas. Outra vantagem dessa plataforma é o baixo custo e por isso é muito utilizada em protótipos de equipamentos.

1.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sistema de biorreator de imersão temporária e um sistema computacional específico para o mesmo.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o sistema em relação à contaminação por fungos e bactérias.
- Implementar ao sistema computacional, funcionalidades como: configuração, monitoramento, armazenamento de informações de experimentos e situação do sistema;
- Realizar um experimento com explantes de amora preta Cv. Tupy para demonstrar que o equipamento desenvolvido é funcional.

1.3. ESTRUTURA DO TRABALHO

No capítulo 2 é descrita a revisão de literatura, separada em micropropagação, biorreatores, biorreator de imersão temporária, aplicação de biorreatores de imersão temporária e placa controladora Arduino. Essa divisão foi realizada com o intuito de descrever uma área mais abrangente como a micropropagação e ir ao longo dos capítulos especificando técnicas e formas de aplicação dessa metodologia.

O capítulo 3 descreve os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento do trabalho e está dividido em 2 subcapítulos, sendo um específico para a construção do biorreator e outro para a realização do experimento.

Os resultados obtidos e discussões são expostos no capítulo 4, que também está dividido em 2 subcapítulos, um demonstrando o biorreator construído e o outro apresentando os resultados alcançados com o experimento realizado.

No capítulo 5 são descritas as conclusões do trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nas seções seguintes é realizado um levantamento bibliográfico, abordando características da micropropagação, biorreatores de forma geral, tipos e aplicações específicas de biorreatores de imersão temporária e tecnologias que podem ser utilizadas para a construção de sistemas de imersão temporária.

2.1. MICROPROPAGAÇÃO

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é segundo Grattapagli e Machado (1990) a aplicação de maior impacto na cultura de tecidos, a qual possui resultados promissores para a agricultura.

O cultivo *in vitro* é designado para acomodar e cultivar células em ambientes assépticos e para assegurar a capacidade máxima de crescimento, provendo condições ótimas de microambiente, nutrientes e transferências de massa gasosa (GEORGIEV et al., 2014).

Uma das principais características da micropropagação é a produção de plantas saudáveis em larga escala, mantendo as características agronômicas da planta mãe. Ao contrário da propagação assexuada convencional, a micropropagação produz uma grande quantidade de plantas em um curto espaço de tempo e livre de doenças (ULISSES et al., 2010).

Teixeira (2002) comenta que são necessários laboratórios bem estruturados e mão de obra especializada para a prática da micropropagação, sendo essa uma forma vegetativa de propagação de plantas por meio da técnica de cultura de tecidos.

A micropropagação é um método eficiente por utilizar de forma completa a totipotencialidade, ou seja, a capacidade de originar uma nova planta que as células vegetais apresentam. É necessário disponibilizar as condições necessárias para os explantes iniciais, como estímulos químicos e físicos. Por meio da resposta a esses estímulos, a planta poderá se desenvolver e crescer com padrões diferenciais de formação estrutural, atingindo sua formação completa (DEBIASI, 2011).

O trabalho de Murashige (1974) apresenta o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*. Esses estágios são divididos da seguinte forma:

Estágio I – Seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas. Segundo Ulisses et al. (2010), nesse estágio geralmente são selecionadas plantas matrizes, as quais possuem características agronômicas superiores e recebem tratamento fitossanitário, nutricional e hídrico, para aumentar a probabilidade de sucesso nos estágios seguintes da micropropagação. Depois é retirado um segmento de tecido (explante) da planta matriz, desinfestado e inoculado em meio nutritivo sob condições assépticas.

Estágio II – Multiplicação dos propágulos por meio de sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação.

Estágio III – Transferência das partes aéreas produzidas para o meio de enraizamento e transplante das plantas obtidas para substrato ou solo.

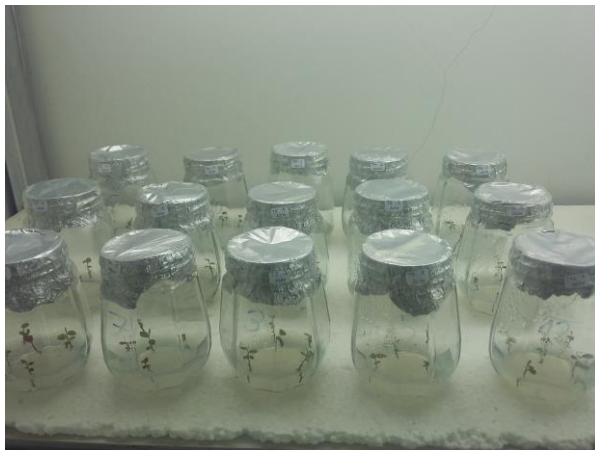
Conforme o explante utilizado e sua manipulação, a micropropagação pode ser conduzida de três maneiras (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990):

1. Multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares;
2. Multiplicação por meio da indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase do calo);
3. Multiplicação por meio de embriogênese somática;

Grattapaglia e Machado (1990) afirmam que a composição do meio de cultura, ou meio nutritivo, não é a variável determinante no sucesso da micropropagação, pois a função dos componentes utilizados no meio de cultura é suficientemente conhecida. Murashige e Skoog (1962) desenvolveram um meio com alta concentração de sais minerais como meio de cultura aplicado na cultura de tecidos de tabaco, essa solução contribuiu e ainda contribui para o sucesso no desenvolvimento de várias espécies.

O método convencional de propagação de plantas por meio de cultura de tecidos (Figura 1) possui um elevado custo de mão de obra, como exposto por Teixeira (2011). Teixeira (2002) expõe que a intensa manipulação das culturas *in vitro* resulta em prejuízos causados por perdas por contaminação e misturas varietais. Outro fator que eleva o custo de produção na micropropagação convencional se deve a necessidade de utilização de um grande número de recipientes pequenos, agentes gelificantes para tornar o meio sólido e repicagens manuais do material vegetal. Devido à exaustão do meio nutritivo e ao crescimento do explantes, é necessária a transferência periódica das plantas para um novo meio de cultura (MAENE; DEBERGH, 1985).

Figura 1 - Micropropagação convencional



Fonte: O autor

Para tornar a micropropagação de tecidos mais acessível comercialmente, buscando a redução de mão de obra, o custo de produção e a propagação em grande quantidade de plantas *in vitro*, é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias, principalmente com equipamentos como os biorreatores (TAKAYAMA; AKITA, 2006).

2.2. BIORREATORES

Segundo Takayma e Akita (1994), pioneiros na utilização de biorreatores para micropropagação, estes podem ser definidos como recipientes contendo meio de cultura líquido, onde gemas e embriões são cultivados em condições de completa imersão. Dessa forma, as condições e características da cultura são diferentes das encontradas na cultura utilizando ágar.

O cultivo em meio de cultura líquido, utilizando biorreatores permite a micropropagação em larga escala, prevenindo distúrbios fisiológicos dos explantes e a hiper-hidricidade¹. Outra característica importante é a possibilidade de utilizar computadores no controle de sistemas de biorreatores, apresentando vantagens sobre a micropropagação convencional em termos de automação e redução de trabalho (SILVA et al., 2007).

Sistemas de biorreatores normalmente consistem de um cultivo *in vitro* e controle em bloco automatizado. O controle automatizado é computadorizado, podendo

¹ Desordem fisiológica, bioquímica e morfológica decorrente do acúmulo anormal de água no interior das células e tecidos.

ser totalmente automatizado ou semi-automatizado, designado para controlar e monitorar as condições de cultivo (GEORGIEV et al., 2014).

Teixeira e Cid (2010) expõem que o cultivo de células vegetais nos primeiros biorreatores foi realizado em equipamentos já existentes, denominado fermentadores, utilizados para o cultivo de fungos e bactérias. Esses fermentadores foram utilizados com poucas modificações para o cultivo de células, sendo que apenas na década de 80 esse tipo de cultivo começou a ser amplamente estudado e uma série de modelos de biorreatores específicos para plantas começou a ser desenvolvido.

Segundo Takayama e Akita (1994), a primeira aplicação de biorreator para propagação de plantas foi realizada por Takayama e Misawa (1981) na propagação de begônia a partir de segmentos nodais estabelecidos *in vitro*, de forma similar aos cultivos convencionais.

Nos primeiros biorreatores utilizados para a micropropagação, os propágulos cultivados permaneciam imersos continuamente no meio de cultura, causando problemas como hiperidratação em tecidos, órgãos e plântulas. A hiperidratação dos tecidos, dependendo do tipo do meio de cultura e da espécie da planta cultivada, pode causar sérios distúrbios fisiológicos, que afetam no crescimento e desenvolvimento da planta cultivada (TEIXEIRA, 2002).

Desde a década de 90, como exposto por Takayama e Akita (1994), vários tipos de biorreatores já estavam sendo desenvolvidos e utilizados, ou possuíam potencial para a utilização na cultura de embriões. Esses biorreatores são classificados conforme seu método de agitação e construção de recipientes em:

- Biorreatores agitados mecanicamente: biorreator aerador agitador, biorreator de tambor giratório e biorreator com filtro rotatório;
- Biorreatores agitados pneumáticamente: biorreator de aeração simples, biorreator de borbulhamento e biorreator de elevação por ar;
- Biorreatores não agitados: biorreator de fase gasosa, biorreator de aeração por membrana permeável a oxigênio e biorreatores de sobreposição de aeração;

As características de cada biorreator exposto no trabalho de Takayama e Akita (1994), descritas também por Teixeira e Cid (2010), são descritas abaixo.

2.2.1. Biorreator aerador agitador (*aeration-agitation bioreactor*)

Esse tipo de biorreator é o mais próximo dos fermentadores convencionais. Esse modelo é equipado com vários tipos de impulsor e aspersor de ar e é classificado dessa forma, devido à estrutura do impulsor utilizado, como turbina, hélices e pás. Normalmente são utilizados para a cultura de células e embriogênese somática (KESSEL; CARR, 1972; PREIL et al., 1988). Para assegurar a homogeneidade do meio de cultura, a hélice existente nesse tipo de biorreator necessita girar em velocidade elevada e, dessa forma, pode causar danos mecânicos ao material cultivado.

2.2.2. Biorreator com filtro rotatório (*spin filter bioreactor*)

O biorreator com filtro rotatório é equipado com um filtro onde o meio de cultura é descarregado (STYER, 1985). Esse filtro realiza a agitação do meio de cultura sem danos as plantas como ocorre nos biorreatores agitados por hélices. A propagação em massa mais adequada para esse tipo de biorreator é a produção por meio de embriogênese somática (WHEAT et al., 1986).

2.2.3. Biorreator de borbulhamento (*air-driven bioreactor*)

Biorreatores de borbulhamento ou movidos a ar, são o modelo mais simples de biorreatores. A aeração e agitação do meio de cultura são realizadas por meio de um pulverizador conectado no fundo do recipiente (TAKAYAMA; MISAWA, 1981).

2.2.4. Biorreator de aeração simples e biorreator de coluna de bolha (*simple aeration bioreactors and bubble column bioreactor*)

Biorreatores com proporção de altura e diâmetro de 1 a 2 são considerados de aeração simples. Se a proporção for de 3 ou mais é um biorreator de coluna de bolhas. Esses biorreatores são indicados para a cultura de órgãos de planta, especificamente para a propagação de diversas espécies por meio de cultura de tecidos, de hastes caulinares, de bulbos, de cormos e de tubérculos (TAKAYAMA; MISAWA, 1981; TAKAYAMA et al., 1991).

Uma das vantagens da utilização de biorreatores de coluna de bolhas é que esse equipamento não necessita de compartimentos com vedação e não possui partes móveis, o que facilita a operação de esterilização (PANDA et al., 1989).

2.2.5. Biorreator de elevação por ar (*air-lift bioreactor*)

Nesse tipo de biorreator o meio de cultura é movido verticalmente, de baixo para cima, por meio de um tubo localizado no interior do recipiente, causado por bolhas de ar produzidas no fundo do recipiente de cultura.

Segundo Panda et al. (1989), o biorreator de elevação por ar é um dos tipos de biorreatores mais adequados para o cultivo de células de plantas em larga escala, pois possui uma agitação e transferência de oxigênio razoável e o nível de danos causados as plantas é baixo. Uma desvantagem é o desenvolvimento de zonas mortas no interior do biorreator e mistura insuficiente em alta densidade de células.

2.2.6. Biorreator de fase gasosa (*gaseous phase bioreactor*)

Esse tipo de biorreator possui um filtro, ou suporte perfurado, onde os segmentos de tecidos são fixados. O meio de cultura é pulverizado sobre o material de cultivo e em seguida drenado no fundo do recipiente do biorreator. Esse procedimento é realizado em intervalos preestabelecidos (USHIYAMA, 1984). Esse modelo é excelente para o cultivo de células vegetais, cultura de tecidos e órgãos, pois não causa dano mecânico na cultura por meio de agitação mecânica ou pneumática.

2.2.7. Biorreator de aeração por membrana permeável a oxigênio (*oxygen permeable membrane aerator bioreactor*)

Os recipientes desse modelo de biorreator são equipados com um aerador, o qual é constituído por uma canalização fina no formato de espiral que pode ser feita de teflon, goma de silicone, policarbonato ou polipropileno. Por meio desse aerador o oxigênio é transferido para o meio de cultura. Segundo Luttmann et al. (1994) esse biorreator é mais adequado para a cultura de suspensões de células embrionárias. As vantagens desse modelo em relação aos outros sistemas de dispersão por bolhas de ar

são a não formação de espuma no meio de cultura e a possibilidade de controle mais preciso do ponto de ajuste de oxigênio desejado.

2.2.8. Biorreator de sobreposição de aeração (*overlay aeration bioreactor*)

Nesse biorreator a aeração é realizada pelo sopro de ar sobre a superfície do meio de cultura, podendo ser combinado com agitação suave desse meio (ISHIBASHI et al., 1987). Esse modelo pode ser aplicado na cultura de embriões, porém não tem sido bem sucedido para a cultura de tecidos.

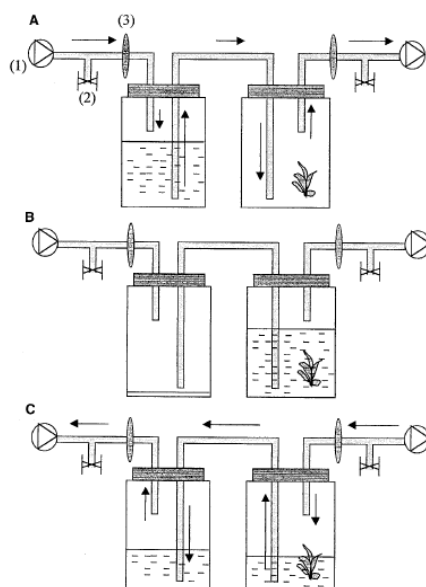
2.3. BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

2.3.1. Sistema de frascos duplos (*twin-frask system*)

O sistema de frascos duplos (BIT[®]) foi um dos primeiros desenvolvidos, e consiste basicamente em dois recipientes conectados por meio de um tubo de silicone ou outro material. Em um dos recipientes é armazenado o meio de cultura e em outro são colocados os explantes (ESCALONA et al., 1999). Como demonstrado na Figura 2, cada recipiente é conectado em uma linha pressurizada, controlados por *timers* independentes acoplados em válvulas solenoides. Esse modelo é composto por compressor de ar (1), válvula solenoide (2) e filtro de ar (3).

Seguindo a Figura 2 no estado A inicialmente os explantes estariam no intervalo entre imersões, onde se realiza a transferência do meio de cultura entre o primeiro e o segundo recipiente, por meio de pressurização de ar. No estado B, os explantes permanecem sob imersão de meio de cultura. Finalizando o ciclo, no estado C, é realizada a transferência do meio do recipiente contendo o material de cultivo para o recipiente de armazenamento, também com pressurização de ar.

Figura 2 - Sistema de frascos duplos



Fonte: Escalona et al. (1999)

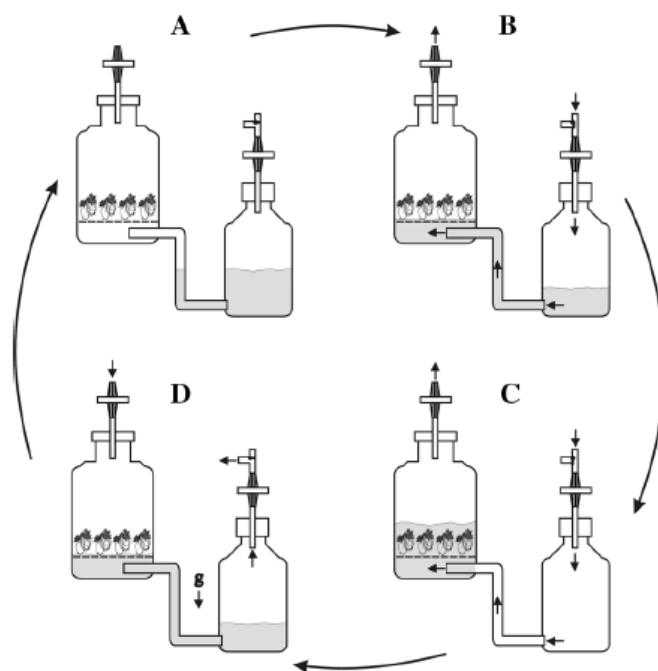
Georgiev et al. (2014) expõe que uma das maiores desvantagens desse modelo é o custo de automação, pois necessita de dois *timers* e duas válvulas solenoides de três vias por par de recipientes e a falta de opções para a renovação de meio e ventilação.

Uma característica importante desse tipo de biorreator demonstrado por Yang et al. (2010), é a possibilidade de ser adaptada uma fonte de CO₂ externa, o que garante concentrações mais elevadas desse gás no recipiente de cultura.

2.3.2. Sistema de inundação e drenagem (*ebb-and-flow or ebb-and-flood*)

Segundo Georgiev et al. (2014), esse tipo de sistema pode ser descrito como uma modificação do sistema de frascos duplos. Como observado na Figura 3, o sistema é constituído também por pares de frascos, porém a transferência de meio entre esses recipientes é realizada por meio de uma conexão existente no fundo de cada recipiente. O recipiente onde fica o meio de cultura normalmente é menor e é colocado abaixo do recipiente que contém o material em cultivo. Dessa forma, é necessária energia apenas para a transferência de meio do recipiente de armazenamento para o recipiente de cultura, sendo que o inverso é realizado por gravidade.

Figura 3 - Sistema de inundação e drenagem



Fonte: Georgiev et al. (2014)

Demonstrado na Figura 3, no estado A o material de cultivo estaria no período de intervalo de exposição ao meio de cultura. No estado B é realizada a transferência do meio para o recipiente com o material de cultivo por meio de ar pressurizado. Em C a transferência de meio está completa e por fim, no estado D, o meio de cultura retorna ao recipiente de armazenamento por meio de gravidade.

As vantagens desse biorreator são a construção e automação simples e confiável e menor consumo de energia, devido à transferência realizada por gravidade. Algumas desvantagens incluem a entrada de luz não uniforme no recipiente de cultura e a falta de opção para aeração e enriquecimento de CO₂ (GEORGIEV et al., 2014).

2.3.3. Sistema RITA (*RITA system*)

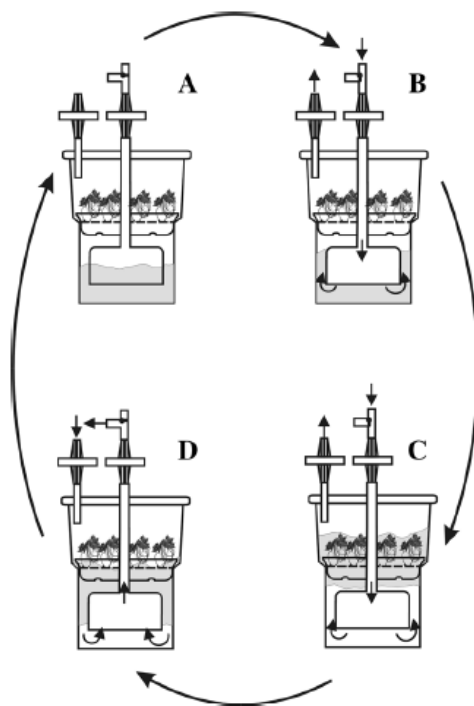
Segundo Teixeira (2010), o modelo de biorreator construído por Alvard et al. (1993), foi modificado em relação a sua construção original, porém mantendo suas características principais de funcionamento, originando o sistema de biorreator RITA[®] (TEISSON et al., 1995), estabelecendo segundo Lemos (2013) um novo conceito de cultivo *in vitro* em biorreatores de imersão temporária.

É um dos pioneiros em sistema de imersão temporária e foi desenvolvido em um centro de pesquisa na França, chamado CIRAD (*Centre de Coopération Internationale em Recherche Agronomique pour le Développement*).

O sistema de biorreator RITA[®] é utilizado em diversos laboratórios em todo o mundo, como na Uganda onde há um laboratório industrial para produção de café e banana, contendo duas câmaras de cultura equipados com um total de 1600 biorreatores (CIRAD, 2015).

Esse modelo consiste basicamente em um recipiente, onde o meio de cultura fica na parte inferior e o material de cultivo na parte superior, como pode ser visualizado na Figura 4. As plantas são expostas ao meio de cultura por meio de ar pressurizado e o retorno do meio a parte inferior é realizada por gravidade.

Figura 4 - Sistema RITA[®]



Fonte: Georgiev et al. (2014)

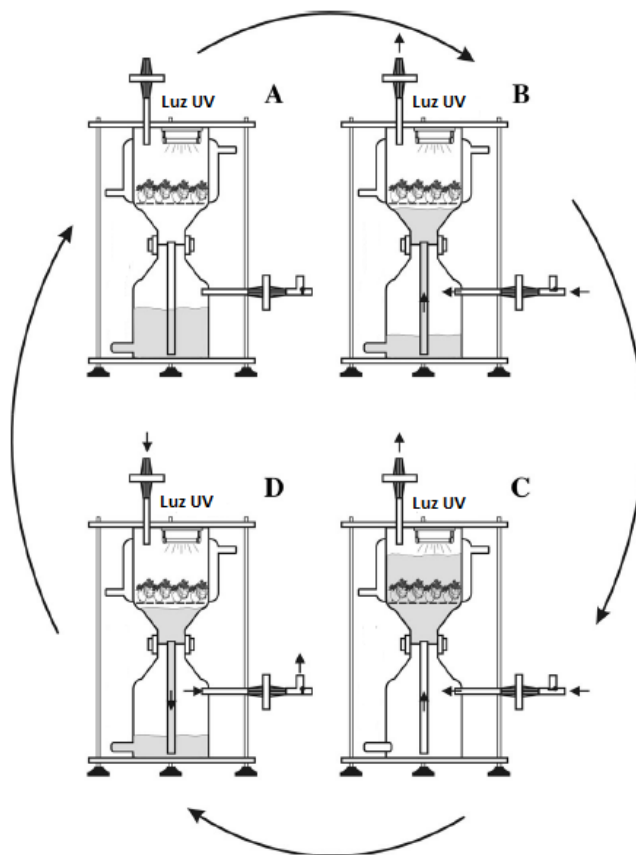
A Figura 4 demonstra, no estado A as plantas estriam no período de intervalo entre as imersões. Em B é iniciada a transferência por meio de ar pressurizado do meio de cultura para a parte superior do recipiente, onde está localizado o material de cultivo. A transferência é finalizada no estado C, sendo que o ar pressurizado continua ligado para que as plantas fiquem imersas com o meio de cultura. Por fim, no estado D, por meio da gravidade a meio de cultura retorna a parte inferior do recipiente.

Dentre as vantagens desse sistema (CIRAD, 2015), destaca-se a facilidade de uso, o espaço para a instalação do equipamento e a total separação dos explantes no período de imersão devido a formação de bolhas de ar.

2.3.4. Biorreator foto termo (*thermo-photo-bioreactor*)

O biorreator foto termo desenvolvido por Navarro et al. (2011), visualizado na Figura 5, consiste em um biorreator de imersão contínua para a micropropagação de biomassa, incluindo os meios para a incorporação de agentes químicos como sais, metais, componentes orgânicos, entre outros. O sistema também possui meio próprio de iluminação, fornecendo radiação ultravioleta e temperatura durante o período de crescimento do material vegetal. Esse sistema foi desenvolvido especificamente para a micropropagação *in vitro* de erva-pilosa-antártica (*Deschampsia antarctica*), com o intuito de produzir metabólitos que podem ser utilizados para a saúde humana e cuidados pessoais.

Figura 5 - Bioreator foto termo



Fonte: Adaptado de Georgiev et al. (2014)

Esse biorreator possui duas entradas e saídas de ar em cada recipiente. Semelhante ao sistema RITA[®], o recipiente é constituído por dois compartimentos, sendo que o meio de cultura é armazenado na parte inferior do recipiente enquanto que o meio a ser cultivado permanece na parte superior. Seu diferencial é uma fonte de luz ultravioleta instalado na parte superior do recipiente, a qual permanece ligada durante todo o processo. O funcionamento ocorre conforme a Figura 5. No estado A os explantes estariam no período de intervalo entre imersões. Em B é iniciado o processo de transferência de meio para o compartimento onde se encontram as plantas. Esse processo é realizado por meio de ar pressurizado colocado na parte inferior do recipiente, dessa forma o meio de cultura passa por um tubo localizado no centro do recipiente e é direcionado para o compartimento superior. No estado C os explantes estariam em imersão. Finalizando, em D o meio de cultura retorna a parte inferior do recipiente por gravidade.

Georgiev et al. (2014), expõe que esse modelo possui algumas desvantagens como a complexa forma de operação, o uso limitado à cultura de raízes e a dificuldade de colheita da biomassa radicular imobilizada.

2.3.5. Sistema híbrido de inundação e drenagem (*hybrid ebb-and-flow*)

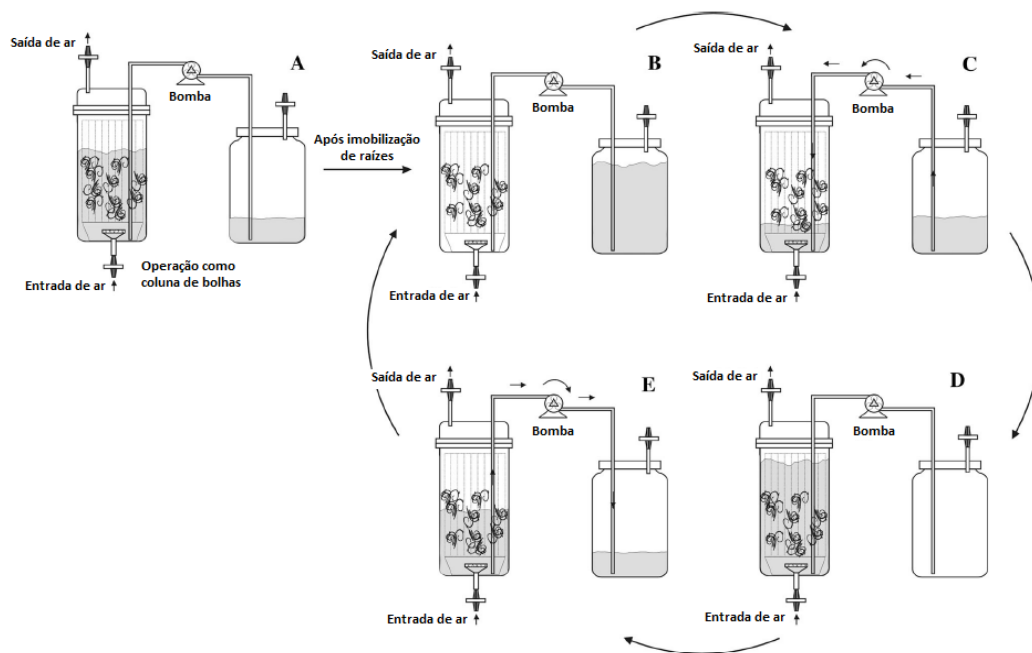
O sistema híbrido de inundação e drenagem foi desenvolvido por Cuello e Yue (2008), e é aplicado especificamente para o cultivo de culturas de raízes de alta intensidade.

Segundo Georgiev et al. (2014), esse sistema funciona basicamente em duas fases. Inicialmente opera como um biorreator de coluna de bolhas nos primeiros dias de inoculação e na segunda fase opera semelhante a um sistema de frascos duplos (Figura 6). A operação na primeira fase com colunas de bolhas é necessária para assegurar a distribuição uniforme e imobilização das raízes.

A única diferença de projeto em relação ao biorreator por colunas de bolhas e sistema de frascos duplos é a utilização de uma bomba peristáltica² na tubulação de transferência de meio de cultura entre os recipientes.

² Tipo de bomba hidráulica de deslocamento positivo.

Figura 6 - Sistema híbrido de inundação e drenagem



Fonte: Adaptado de Georgiev et al. (2014)

No processo de operação como coluna de bolhas a bomba peristáltica não é acionada, apenas existe uma entrada de ar na parte inferior do recipiente e uma saída na parte superior. Depois desse processo finalizado, é iniciado o processo semelhante ao sistema de frascos duplos, com a diferença de que a transferência do meio é realizada pela bomba peristáltica e não por ar pressurizado. Com exceção dessa diferença, os estados B, C, D e E ocorrem iguais ao sistema de frascos duplos descrito anteriormente.

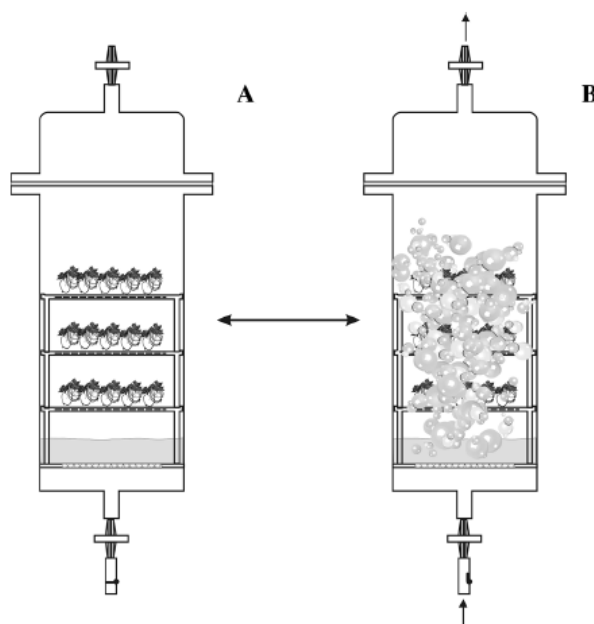
A vantagem desse sistema é a renovação de oxigênio durante o cultivo de biomassa de raízes de alta intensidade. A principal desvantagem, assim como o biorreator foto termo, é o uso limitado à cultura de raízes e a dificuldade de colheita da biomassa radicular imobilizada (GEORGIEV et al., 2014).

2.3.6. Biorreator de imersão por bolhas (*bioreactor of immersion by bubbles*)

Esse modelo de biorreator, denominado biorreator de imersão por bolhas ou BIB[®], foi desenvolvido por Soccol et al. (2008). Segundo Scheidt (2008), a aplicação desse biorreator é viável e eficaz na produção de mudas e metabólitos secundários e aumenta consideravelmente a capacidade de produção, pois pode trabalhar com vários estágios.

Esse sistema utiliza uma nova estratégia de cultivo, a qual é baseada na imersão temporária, porém os explantes são expostos a uma espuma ao invés de meio líquido de cultura. Como demonstrado na Figura 7, o sistema consiste de um único recipiente de vidro com dois compartimentos. O compartimento inferior é para o armazenamento do meio de cultura, no qual é adicionado um detergente para a geração da espuma. O material de cultivo é implantando em prateleiras localizadas no compartimento superior do recipiente.

Figura 7 - Biorreator de imersão por bolhas BIB[®]



Fonte: Georgiev et al. (2014)

No estado A (Figura 7) os explantes estariam em repouso durante o período de intervalo. Em B, é inserido ar comprimido na parte inferior do recipiente, o qual em contato com o meio de cultura contendo detergente cria uma espuma que se dispõe sobre o material de cultivo.

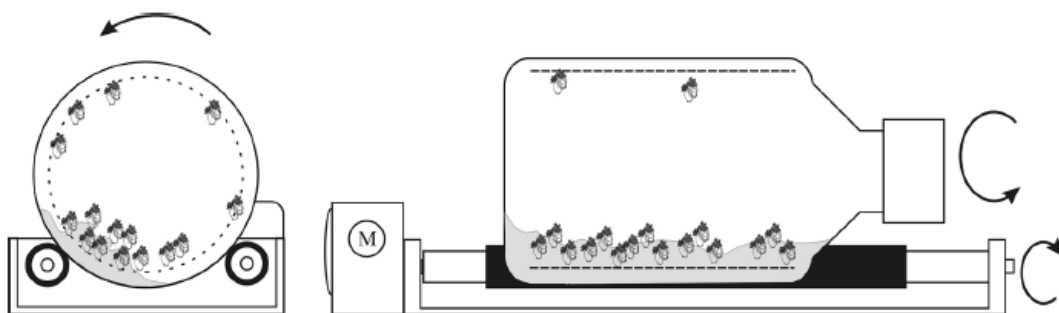
Scheidt (2008) realizou um experimento com a cultura do abacaxizeiro (*Ananas comosus*), comparando o BIB[®] com o sistema RITA[®] e com o método tradicional de micropropagação, o resultado demonstrou que o BIB[®], obteve melhor desempenho de produção.

2.3.7. Biorreator de tambor rotatório (*rotating drum system*)

O funcionamento desse tipo de biorreator consiste na rotação dos recipientes de cultura sobre dois eixos, os quais são responsáveis pela condução dos movimentos rotacionais (Figura 8). É superior ao biorreator mecânico aerador agitador em relação à oxigenação quando utilizados meios de cultura com alta viscosidade (TANAKA et al., 1983).

Um modelo similar a esse foi desenvolvido por Akita e Ohta (1998), para a micropropagação em massa de batata, com o diferencial de possuir um suporte cilíndrico para os recipientes de cultura.

Figura 8 - Biorreator de tambor rotatório



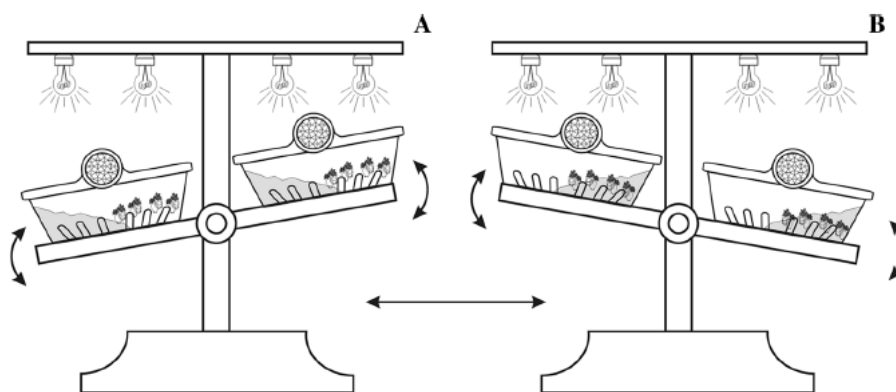
Fonte: Gorgiev et al. (2014)

Esse sistema possui algumas desvantagens como a incapacidade de configurar tempos independentes de imersão e intervalo, danos mecânicos causados no material de cultura e falta de opções para troca interna de oxigênio (GEORGIEV et al., 2014).

2.3.8. Sistema de balanço (*rocker system*)

O sistema de balanço consiste em uma plataforma mecânica móvel, a qual expõe os explantes ao meio de cultura conforme a angulação do equipamento (Figura 9).

Figura 9 - Sistema de balanço



Fonte: Georgiev et al. (2014)

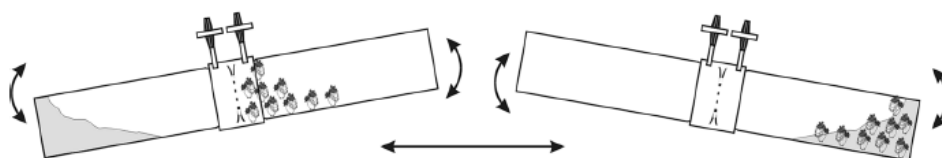
No estado A, os explantes estariam em período de intervalo. Para expor as plantas ao meio de cultura é realizado um leve movimento no sentido horário (B).

A principal vantagem desse modelo é a capacidade de suporte para um grande número de recipientes para cultivo. Algumas desvantagens incluem a necessidade de um motor eletromecânico para o movimento da plataforma e maior espaço necessário para acomodação se comparado com os modelos de biorreatores citados anteriormente (Georgiev et al., 2014).

Os recipientes de cultura presentes nesse tipo de biorreator não possuem renovação de ar e também não fornecem meios para forçar a ventilação ou troca de meio de cultura. Considerando esses problemas, Robert et al. (2006) desenvolveram o biorreator BioMINT.

O BioMINT (Figura 10), consiste em dois recipientes, sendo um para o meio de cultivo e o outro para o meio de cultura. Esses recipientes são acoplados por meio de um adaptador perfurado, permitindo a transferência do meio de cultura entre eles. Essa transferência de meio é realizada por gravidade, utilizando o sistema de balanço descrito (ROBERT et al., 2006).

Figura 10 - Sistema BioMINT



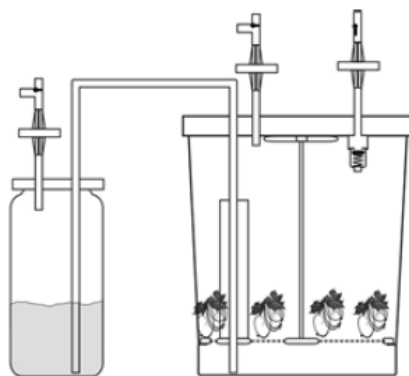
Fonte: Adaptado de Georgiev et al. (2014)

A vantagem do sistema BioMINT é que o adaptador responsável pelo fluxo do meio de cultura entre os recipientes possui duas portas externas, as quais podem ser utilizadas para ventilação forçada ou entrada de CO₂.

2.3.9. Biorreator RALM (*bioreactor RALM*)

Desenvolvido pela empresa brasileira RALM (RALM, 2016), esse biorreator é baseado no modelo de frascos duplos (Figura 11). O recipiente de meio de cultura é menor que o recipiente para o material a ser cultivado. Seu diferencial é o funcionamento em linhas de pares de recipientes, aumentando a capacidade de produção. É controlado por meio de sistema de ar via CLP (controlador lógico programável).

Figura 11 - Biorreator RALM



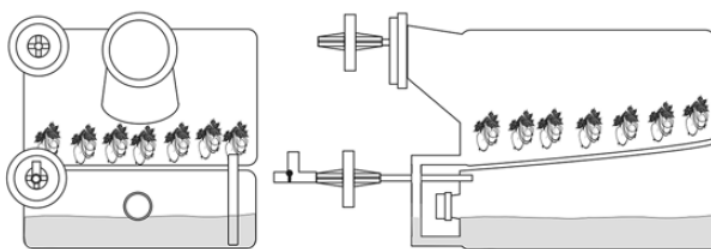
Fonte: Georgiev et al. (2014)

Suas vantagens são que esse equipamento possui conexão para enriquecimento de CO₂ e o recipiente de cultivo é equipado com um suporte para sustentação dos explantes. Uma desvantagem é a não modularização do biorreator, ou seja, caso sejam necessários recipientes maiores ou compressor de ar com maior potência, seria complexa a alteração dessas características, pois esses equipamentos são desenvolvidos especificamente para esse modelo.

2.3.10. Sistema de biorreator de imersão temporária SETIS (*SETIS temporary immersion bioreactor system*)

O funcionamento do biorreator de imersão temporária SETIS segue os princípios do sistema de inundação e drenagem, com uma diferença na disposição dos recipientes (Figura 12).

Figura 12 - Sistema de biorreator de imersão temporária SETIS



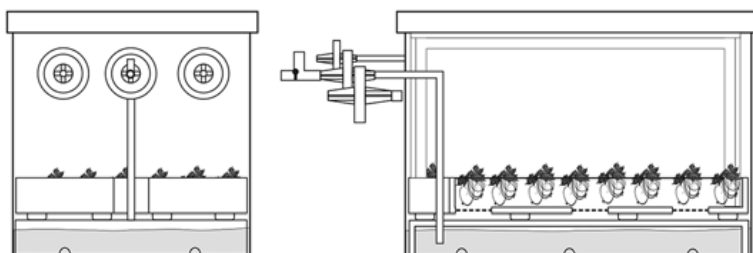
Fonte: Georgiev et al. (2014)

O sistema SETIS possui um recipiente com dois compartimentos, o superior para o material de cultivo e o inferior para o meio de cultura. O meio de cultura é direcionado ao compartimento superior por meio de ar pressurizado e retorna ao compartimento inferior por gravidade. Uma vantagem desse modelo é o menor espaço ocupado pelo equipamento e a economia de energia devido ao uso da gravidade.

2.3.11. Biorreator PLANTFORM (*PLANTFORM bioreactor*)

Esse modelo de biorreator desenvolvido na Suécia (PLANTFORM, 2016), (Figura 13), segue os princípios de funcionamento do sistema RITA[®].

Figura 13 - Biorreator PLANTFORM



Fonte: Georgiev et al. (2014)

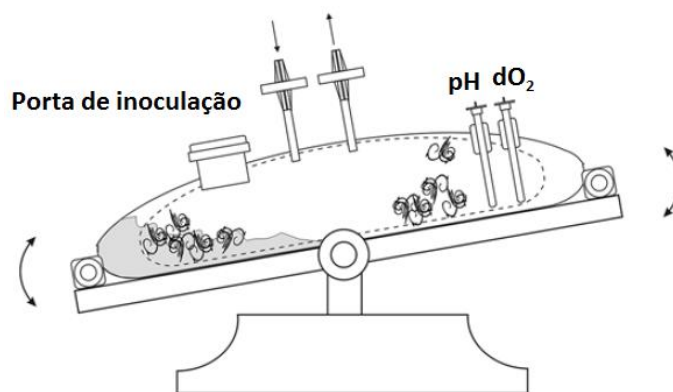
Semelhante ao sistema SETIS, esse biorreator possui um recipiente com dois compartimentos, um superior para o material de cultivo e o inferior para o meio de cultura.

A principal vantagem desse sistema é o tamanho do recipiente, tornando possível o cultivo de espécies de plantas de maior estrutura como eucalipto, bananeira, entre outros.

2.3.12. Biorreator de onda (*WAVE bioreactor*)

O biorreator de onda consiste em uma plataforma de agitação mecânica similar ao sistema de balanço (Figura 14), que utiliza sacos descartáveis de culturas esterilizados (EIBL; EIBL, 2008).

Figura 14 - Biorreator de onda



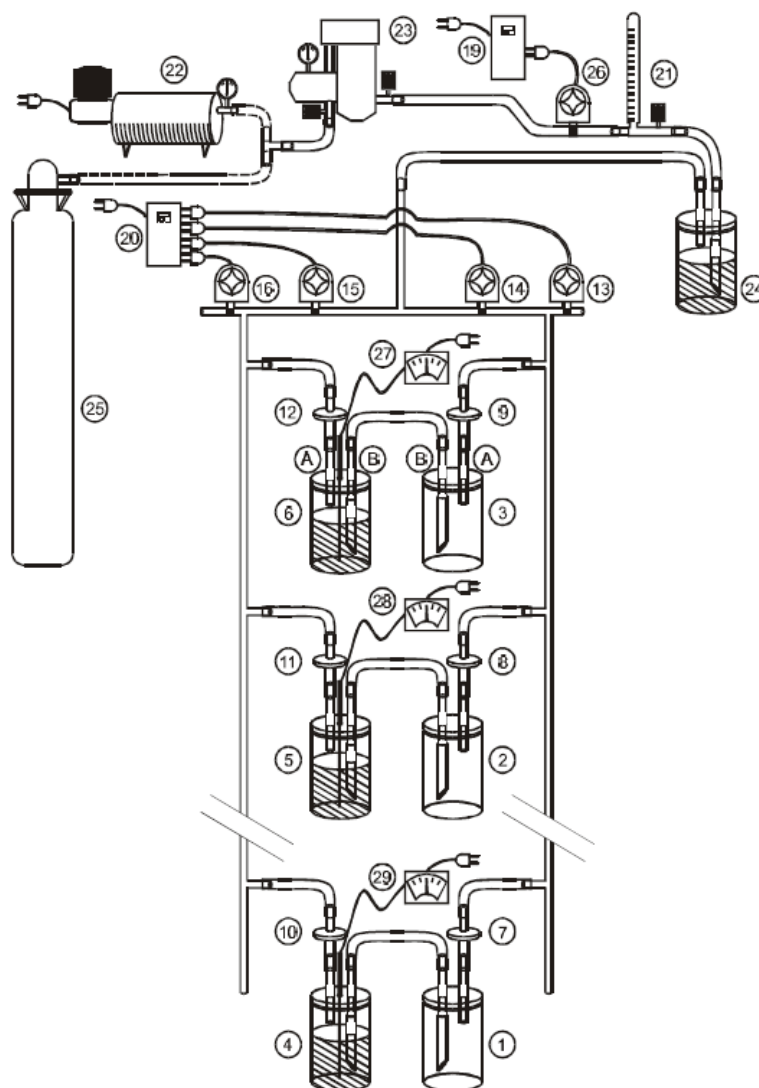
Fonte: Adaptado de Georgiev et al. (2014)

Nesse modelo, os explantes são expostos ao meio de cultura conforme o movimento horário ou anti-horário do biorreator. As principais vantagens presentes nesse modelo são os meios para aeração presentes e os sensores para determinar o pH e CO_2 do meio de cultura. Assim como o sistema de balanço, uma desvantagem desse biorreator é o espaço necessário para a acomodação do equipamento e a utilização de motor eletromecânico.

2.3.13. Biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa

Teixeira (2001) descreve um sistema de biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, baseado no sistema de frascos duplos. Conforme Figura 15, o biorreator é composto por um tanque de ar comprimido (22) ou cilindro de ar artificial (25), filtro de ar seco (23), válvulas solenoides (13, 14, 15, 16 e 26), temporizadores (19 e 20), fluxômetro (21), recipientes para armazenamento do meio (4, 5 e 6), recipientes para o material a ser cultivado (1, 2, 3), filtros de ar (7, 8, 9, 10, 11 e 12), recipiente com carvão ativado suspenso em água deionizada (24) e eletrodos para o monitoramento do meio (27, 28 e 29).

Figura 15 - Biorreator desenvolvido pela Embrapa



Fonte: Teixeira (2001)

O funcionamento desse biorreator é semelhante ao sistema de frascos duplos, com o diferencial de possuir uma linha contendo diversos pares de recipientes, e um recipiente contendo carvão ativado para filtragem e umedecimento do ar, antes de entrar nos recipientes de meio e cultura.

Como exposto por Teixeira (2001) esse sistema apresentou resultados satisfatórios no cultivo de gemas de abacaxi, microestacas de batata e microtuberização de batata.

A principal vantagem é à disposição dos pares de recipientes em linhas, facilitando seu uso. Uma desvantagem é a quantidade de válvulas solenoides e temporizadores utilizados, aumentando significativamente o custo do equipamento.

2.4. APLICAÇÃO DE BIORRETORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Desde os primeiros modelos de biorreatores desenvolvidos, diversas aplicações estão sendo realizadas nesses equipamentos. Na Tabela 1 são demonstradas algumas aplicações de sistemas de imersão temporária.

Tabela 1 - Aplicação de biorreator de imersão temporária desde 2005

Espécie	Tipo de Sistema de imersão temporária	Imersão/Intervalo	Referência
<i>Alocasia mazonica</i>	<i>Ebb and flood</i>	30 min / 8 h	Jo et al. (2008)
<i>Ananas comosus</i>	RITA®	15 min / 2 h	Scheidt et al. (2009)
<i>Ananas comosus</i>	BIB®	15 min / 2 h	Scheidt et al. (2009)
<i>Anoectochilus formosanus</i>	<i>Ebb and flood</i>	15 min / 1 h	Wu et al. (2007)
<i>Apple rootstock M26</i>	RITA®	3 -5 min / 1.5 h	Zhu et al. (2005)
<i>Apple rootstock M9 EMLA</i>	RITA®	15 min / 8 h	Chakrabarty et al. (2007)
<i>Camptotheca acuminata</i>	RITA®	1 min / 6 h	Sankar-Thomas et al. (2008)
<i>Camptotheca acuminata</i>	<i>Dual vessel system</i>	1 min / 6 h	Sankar-Thomas et al. (2008)
<i>Charybdis sp.</i>	<i>Flasks in series</i>	5 min / dia	Wawrosch et al. (2005)
<i>Coffea arabica</i>	RITA®	1 min / 4 h	Albarran et al. (2005)
<i>Discorea spp.</i>	<i>Glass flasks</i>	10 min / 6 h	Jova et al. (2005)
<i>Elaeis guineensis</i>	<i>Similar to RITA®</i>	3 min / 6 h	Sumaryono et al. (2008)
<i>Eleocharis dulcis</i>	<i>Similar to Twin flasks system</i>	15 min / 8 h	Gao et al. (2015)
<i>Eucalyptus globulus</i>	BIT®	2 min / 12 h	Gonzáles et al. (2011)

<i>Eucalyptus grandis</i> , and hybrids	RITA®	30 s / 10 min	McAlister et al. (2005)
<i>Fragaria x ananassa</i>	RITA®	5 min / 4 h	Hanhineva et al. (2005)
<i>Hydrastis canadensis</i>	RITA®	3 min / 1 h	He et al. (2007)
<i>Hippeastrum x</i> <i>chmielli</i>	BIT®	15 min / 4 h	liczuk et al. (2005)
<i>Jacaranda decurrens</i>	RITA®	15 min / 4 h	Malosso et al. (2012)
<i>Lessertia frutescens</i>	BIB®	30 min / 4 h	Shaik et al. (2010)
<i>Musa</i>	BIT®	4 min / 3 h	Aragón et al. (2005)
<i>Panax quinquefolius</i>	Rocker system	30 s / 1 - 2 h	Uchendu et al. (2011)
<i>Phoenix dactylifera</i>	RITA®	15 min / dia	Fki et al. (2011)
<i>Quercus suber</i>	RITA®	1 min / 4 - 6 h	Pérez et al. (2013)
<i>Saccharum spp.</i>	RITA®	1 min / 72 h	Snyman et al. (2011)
<i>Theobroma cacao</i>	BIT®	1 min / 6 h	Niemenak et al. (2008)
<i>Vaccinium</i> <i>angustifolium</i>	RITA®	15 min / 4 h	Debnath (2009)
<i>Vanilla planifolia</i>	RITA®	2 min / 4 h	Ramos-Castellá et al. (2014)

Fonte: Adaptado de Watt (2012)

Como demonstrado nos trabalhos citados, os períodos de imersão e intervalo são fatores importantes na utilização de biorreatores de imersão temporária. Esses valores podem ser muito específicos em relação às espécies e tipos de plantas. Dessa forma, torna-se importante o estudo de novos protocolos para a produção de plantas em sistemas de imersão temporária, específicos para cada tipo de planta e cultura.

Welander et al. (2014) avaliaram um novo modelo de biorreator em plataforma baseado no princípio do sistema de imersão temporária para a micropropagação de *Digitalis lutea x purpurea*, *Echinacea purpúrea* e *Rubus idaeus*. Em seus resultados demonstraram que a taxa de multiplicação e qualidade dos explantes foram semelhantes e em alguns casos melhores comparados ao cultivo com meio de ágar. O número de brotações foi semelhante nos dois sistemas para *Digitalis* e *Rubus*, enquanto *Echinacea* teve um número significativamente maior em biorreator. Porém, a massa seca foi similar entre os dois sistemas para as três espécies.

No trabalho de Lemos et al. (2001), foram utilizados biorreatores de imersão temporária com o objetivo de aumentar a taxa de multiplicação e diminuir os custos de produção de mudas de bananeiras do tipo Terra. Como resultado foi comparado o uso do biorreator com o sistema tradicional em semissólido para a micropropagação, observando que com a utilização de biorreatores, as microplantas apresentaram maior

comprimento, produção de biomassa 2,86 vezes maior e 2,20 vezes mais brotos do que no sistema tradicional.

Silva et al. (2007) desenvolveram um trabalho comparando diferentes métodos de micropropagação de abacaxizeiro. Foram comparados os tratamentos utilizando micropropagação convencional em meio sólido, em meio líquido e micropropagação em biorreator de imersão temporária. Como resultado o sistema de imersão temporária, com as plântulas imersas a cada 2 horas por 3 minutos de imersão, proporcionaram maior número, altura e massa de matéria seca de brotos. Concluindo que o sistema de imersão temporária é o método mais eficiente na micropropagação de abacaxizeiro em larga escala.

Todos os sistemas de imersão temporária possuem alguma tecnologia para o controle do tempo de imersão. Essa tecnologia pode ser mecânica, como a utilização de engrenagens ou eletrônica com o uso de CLPs (Controlador lógico programável) ou microcontroladores.

2.5. PLACA CONTROLADORA ARDUINO

A placa controladora ou microcontrolador Arduino é uma plataforma de prototipagem *open-source* baseada na facilidade de uso e integração entre *hardware* e *software*. Com o Arduino, é possível realizar diversas ações, desde a leitura de sensores até a ligação de um LED ou motor (ARDUINO, 2016).

A utilização dessa tecnologia se destaca devido ao seu baixo custo para o desenvolvimento e se aplica em diversas áreas de conhecimento, como na área de educação (FRANCISCO et al., 2016; SOUZA et al., 2011), construção de equipamentos de laboratório (D'AUSILIO, 2012), pesquisas de comportamento animal (DEVARAKONDA et al., 2015), entre outros. Outra característica importante é a facilidade de integração do Arduino com outras tecnologias, como demonstrado nos trabalhos de Pineño (2014) e Francisco (2016).

Buscando facilitar a sua utilização e aplicação, existem diversas opções de funcionalidades e recursos oferecidas pelo Arduino, como demonstrado na Figura 16.

Figura 16 - Recursos disponíveis do Arduino



Fonte: Adaptado de Arduino (2016)

Os recursos disponíveis para o Arduino incluem placas controladoras, módulos e *shields*, os quais são elementos que podem ser conectados a placa controladora para expansão de características. Além dos componentes demonstrados na Figura 16, existem diversos outros compatíveis com o Arduino, como sensores, atuadores, *shields* para comunicação sem fio, entre outros. As placas convencionais possuem processadores com *clock* de 16 MHz, porém para aplicações que exijam maior capacidade de processamento mantendo as características básicas do Arduino, podem ser utilizadas as placas Intel Galileo e Intel Galileo Gen 2, as quais possuem processadores Intel® com até 400MHz de *clock* e funcionalidades disponíveis do Arduino Uno R3.

O desenvolvimento lógico das aplicações com o Arduino é realizado por meio de um ambiente de desenvolvimento, denominado Arduino IDE atualmente na versão 1.6.7 em linguagem C.

A utilização do Arduino possui algumas vantagens, descritas abaixo (ARDUINO, 2016):

- Baixo custo: os microcontroladores Arduino são relativamente mais baratos se comparados com outras plataformas;
- Ambiente de desenvolvimento simples: o *software* de desenvolvimento do Arduino é fácil para a utilização por iniciantes, porém é flexível ao ponto de oferecer vantagens para a utilização de usuários mais experientes;
- *Software* extensível e *open source*: o ambiente de desenvolvimento do Arduino é de código aberto. Dessa forma, programadores experientes podem realizar alterações ou implementações de novas funcionalidades específicas para suas aplicações;
- *Hardware* extensível e *open source*: assim como o ambiente de desenvolvimento, o *hardware* do Arduino também é aberto, possibilitando que a criação de placas próprias estendendo ou aumentando as funcionalidades do microcontrolador.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir são detalhados em dois subcapítulos, os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento desse projeto. O primeiro subcapítulo aborda sobre o desenvolvimento do biorreator e o segundo sobre a realização do experimento com explantes de amora preta Cv. Tupy.

3.1. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE BIORREATOR

O projeto do biorreator construído foi baseado no sistema de frascos duplos distribuído em linhas e pode ser dividido em dois módulos, sendo um lógico e outro físico. O módulo lógico é responsável pela configuração, gerenciamento e monitoramento do biorreator e é constituído de dois níveis. O primeiro nível, mais alto, é executado por um *software* de computador, o qual se comunica com o segundo nível, constituído de um microcontrolador. O segundo nível interage diretamente com o módulo físico, enviando instruções, que são executadas pelo biorreator de forma

pneumática. Essas instruções consistem em abertura e fechamento de solenoides, e por meio dessas são realizadas ações de transferência de meio de cultura entre os recipientes.

O *software* de computador responsável pela configuração e monitoramento do biorreator foi desenvolvido na linguagem de programação Java (ORACLE, 2016), com a tecnologia *Java Standard Edition* (JAVASE, 2016) utilizando o ambiente de desenvolvimento NetBeans (NETBEANS, 2016) e o *framework* JavaFX (ORACLE, 2016) para a construção da *interface*.

Para o desenvolvimento do sistema controlador do biorreator foi utilizado uma placa controladora Arduino Uno (Figura 17 - A), a qual possui 14 portas digitais de entrada e saída sendo 6 dessas com saídas de tensão variante e 6 portas de entrada analógicas. O microcontrolador também possui memórias flash de 32 KB, SRAM de 2 KB e EEPROM de 1 KB e velocidade de *clock* de 16 MHz. Foi utilizada a IDE do Arduino 1.6.4 (ARDUINO, 2016) como ambiente de desenvolvimento para a implementação dos códigos em linguagem C, responsáveis pelo funcionamento do biorreator.

Complementando o módulo eletrônico foram utilizados uma placa de relé (Figura 17 – B) com 8 terminais utilizada para ligar as válvulas solenoides, um módulo RTC (*real timer clock*) (Figura 17 – C) responsável por controlar e manter o tempo, mesmo com o equipamento desligado e uma fonte de alimentação de corrente contínua com tensões de 5v e 12v.

A memória EEPROM do Arduino foi utilizada para armazenar os dados de configuração do biorreator. Dessa forma e em conjunto com o módulo RTC, caso haja um desligamento indesejado do equipamento, devido à queda de energia elétrica ou outro problema, assim que a alimentação for reestabelecida o biorreator voltará a funcionar baseado na ação que deveria estar executando naquele momento.

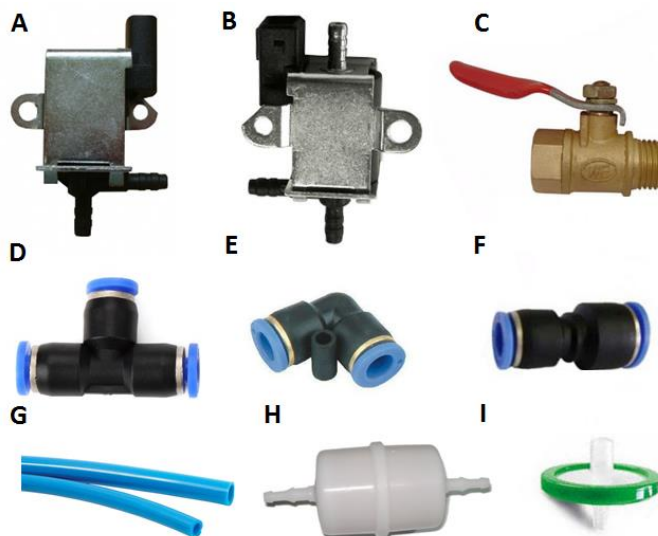
Figura 17 – Materiais eletrônicos



Fonte: Arduino (2016)

Para o desenvolvimento do módulo pneumático do biorreator foram utilizadas válvulas solenoides de duas (Figura 18 - A) e três vias (Figura 18 - B), válvula esférica (Figura 18 - C), conectores em T de 6mm (Figura 18 - D) e L de 6mm (Figura 18 - E), redutores de 10mm para 6mm (Figura 18 - F), mangueiras PU de 4mm e 6mm (Figura 18- G), filtro para retirada de umidade (Figura 18 - H) e filtros de ar de 0,22 μ m (Figura 18- I).

Figura 18 - Materiais pneumáticos



Fonte: O autor

Na Tabela 2, é detalhada a quantidade de material que foi utilizado para o desenvolvimento do biorreator, considerando que o modelo desenvolvido é constituído por 4 linhas com 4 pares de recipientes em cada linha.

Tabela 2 - Materiais utilizados

Material	Quantidade por linha	Quantidade Total
Compressor de ar com reservatório	1 para as 4 linhas	1
Placa controladora Arduino	1 para as 4 linhas	1
Fonte de Alimentação	1 para as 4 linhas	1
Placa de relé	1 para as 4 linhas	1
Módulo RTC	1 para as 4 linhas	1
Válvula esférica	1	4
Válvula solenoide 2 vias	1	4
Válvula solenoide 3 vias	2	8
Filtro para umidade	1	4
Filtro de ar de 0,22µm	2	8
Redutor de 10mm para 6mm	2	8
Conector em T de 6mm	6	24
Conector em L de 6mm	4	16
Mangueira PU 6mm	2m	8m
Mangueira PU 4mm	1m	4m

Fonte: O autor

Como o funcionamento do biorreator desenvolvido é realizado de forma pneumática, é necessária uma fonte de ar com pressão positiva. Para suprir essa necessidade foram analisados diversos tipos de compressores de ar, como compressor de 12v sem reservatório de ar, compressor de tensão alternada sem reservatório de ar, compressor a óleo sem reservatório de ar e compressor de tensão alternada com reservatório de ar. De todos esses testados, foi utilizado o compressor de tensão alternada com reservatório de ar, pois com esse tipo de compressor, o sistema de biorreator se torna mais modular, ou seja, esse equipamento pode ser trocado, devido a defeito ou falta de capacidade para frascos maiores, sem interferir no funcionamento do restante do sistema.

3.2. EXPERIMENTO COM AMORA PRETA

Depois de desenvolvido o biorreator foi utilizado para a realização de um experimento funcional com plantas. O experimento foi executado utilizando explantes axilares de Amora preta Cv. Tupy, cultivar desenvolvido pela Embrapa em 1988 (EMBRAPA, 2015).

Antes de implantar o experimento, todo o equipamento utilizado e a linha de recipientes do biorreator foram autoclavados a 120° C e expostos à luz Ultra Violeta

(UV) por 40 minutos. Da mesma forma, todo o processo de fixação dos explantes foi realizado em uma câmara de fluxo com o intuito de extinguir qualquer possível fonte de contaminação.

O experimento foi implantado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), pois as condições ambientais e do material experimental eram homogêneas. Foram utilizados 20 explantes, considerando cada explante como uma repetição, nos tratamentos, com uma perda de 2 repetições no primeiro tratamento.

Durante todo o período do experimento a temperatura foi controlada e mantida em 27° C, e exposto à iluminação artificial. Os explantes foram fixados em uma espuma fenólica com 8 cm de diâmetro por 1 cm de espessura e ficaram em contato com o meio de cultura por 2 minutos em intervalos de 2 horas em recipientes com capacidade de 1L. Para o meio de cultura foi utilizada a solução MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,01 g.L⁻¹ mio-inositol e 5,1 µM de BAP (6-benzilaminopurina). O período total do experimento foi de 35 dias.

Com o intuito de analisar a relação da quantidade de meio de cultura com o desenvolvimento dos explantes, foram realizados três tratamentos, diferenciando apenas a quantidade do meio de cultura presente em cada um, sendo esses, 200 ml, 175 ml e 150 ml respectivamente.

Depois que o experimento foi finalizado foram obtidos e analisados os dados do desenvolvimento dos explantes a partir das seguintes medidas (por explante): número de folhas, número de brotações, comprimento da maior raiz, comprimento do explante, massa fresca.

A análise dos dados foi realizada com análise de variância (ANOVA), teste de Tukey e regressão. Os *softwares* utilizados para as análises foram: SAS Studio Academic Edition (SAS, 2015) para ANOVA e Excel 2010 (MICROSOFT, 2015).

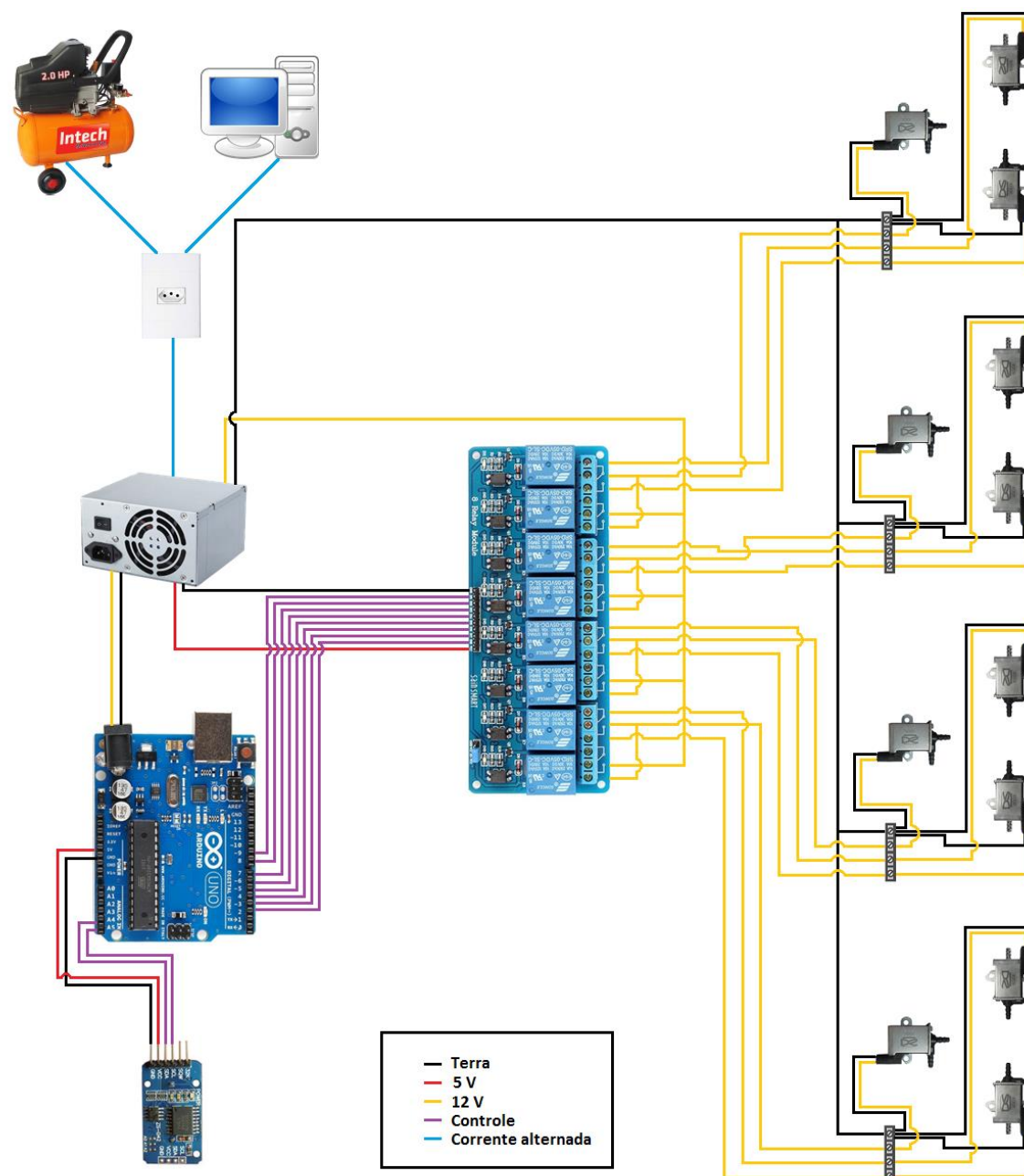
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados obtidos e discussão, separados em dois subcapítulos, um expondo o biorreator construído e o seguinte descrevendo os resultados obtidos com o experimento realizado no biorreator com Amora preta Cv. Tupy.

4.1. BIORREATOR IMERSÃO TEMPORÁRIA DESENVOLVIDO

O biorreator de imersão temporária construído é demonstrado a seguir dividido em três módulos, sendo eles elétrico e eletrônico, pneumático e o *software* para controle e monitoramento. O módulo elétrico e eletrônico é ilustrado na Figura 19.

Figura 19 - Esquema elétrico e eletrônico



Fonte: O autor

A unidade controladora responsável pela comunicação com o *software* de gerenciamento e pelo envio de comandos para a realização das transferências de meio de cultura entre os recipientes é demonstrada na Figura 20. Essa unidade tem capacidade para o controle de até 4 linhas distintas de pares de recipientes.

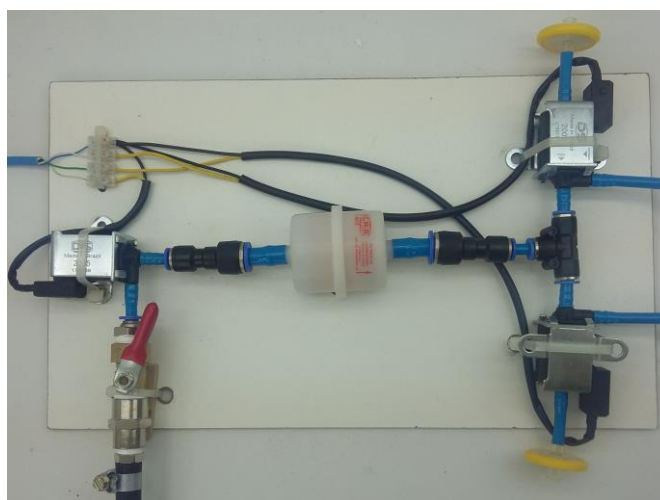
Figura 20 - Unidade controladora



Fonte: O autor

Para que cada linha do biorreator opere de forma independente foi construído um módulo responsável pela transferência e filtragem do ar pressurizado. Cada uma das 4 linhas possui um módulo igual o exposto na Figura 21.

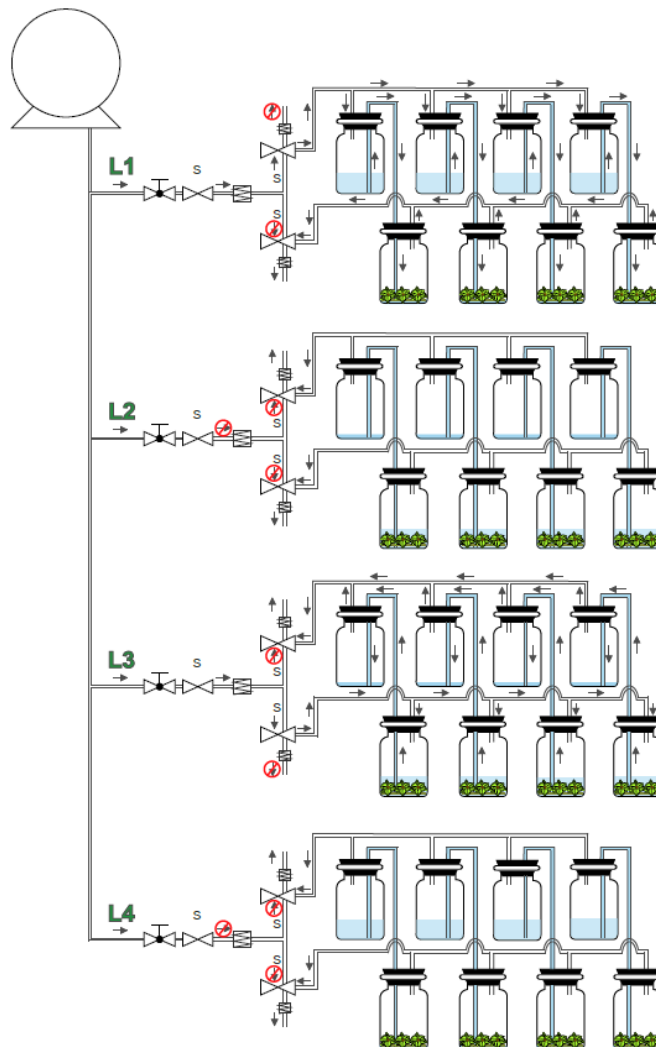
Figura 21 - Módulo para transferência de ar pressurizado



Fonte: O autor

Um esquema geral do funcionamento pneumático realizado pelo biorreator é exposto na Figura 22.

Figura 22 - Esquema do funcionamento pneumático do biorreator



Fonte: O autor

Na Figura 22, também é demonstrado o funcionamento independente de cada uma das linhas (L1, L2, L3, L4). Na primeira linha seria realizada a transferência do meio de cultura para o recipiente contendo o material de cultivo. A segunda linha está em período de imersão, onde os explantes ficam expostos sob o meio de cultura. Em L3 está sendo realizada a transferência do meio de cultura para o recipiente de armazenamento desse meio. E por fim, a última linha está no período de intervalo.

Para garantir que o biorreator desenvolvido possa ser utilizado com diferentes tipos de recipientes, respeitando o modelo de fracos duplos, foram realizados experimentos com sucesso em recipientes com capacidade de 1L (Figura 23) e 500 mL (Figura 24).

Figura 23 - Biorreator com recipientes de 1l



Fonte: O autor

Figura 24 - Biorreator com recipientes de 500 ml



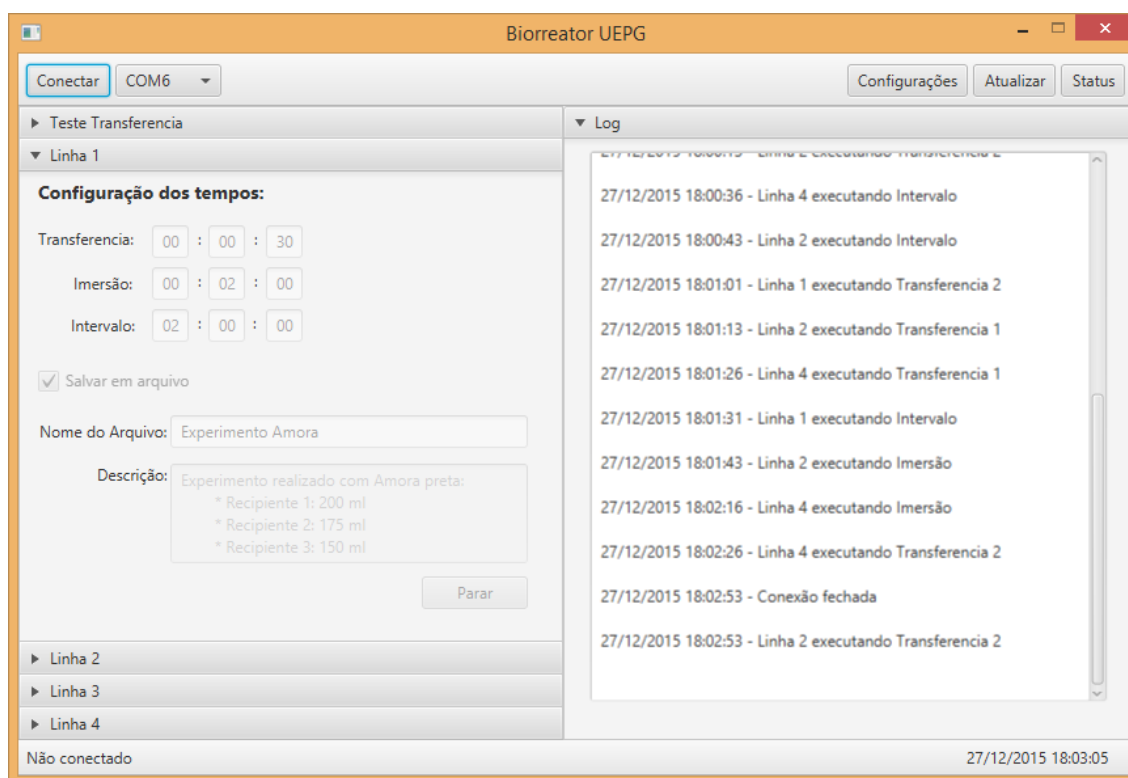
Fonte: O autor

O sistema foi validado em relação à contaminação por meio de experimentos realizados durante o processo de desenvolvimento do biorreator. Foram realizados 4 experimentos com 3 pares de frascos em cada, todos com explantes de amora preta Cv. Tupy, totalizando 12 pares. Desses, apenas em um ocorreu contaminação. Uma vez que esse par de recipiente se encontrava no final da linha, ou seja, era o terceiro frasco a

receber o ar pressurizado, descarta-se a possibilidade de que a contaminação tenha se originado pelo reservatório de ar. Mesmo com a contaminação, o experimento foi continuado por mais duas semanas e não ocorreu contaminação nos outros dois pares da mesma linha, demonstrando que o sistema não transfere a contaminação em pares de recipientes de mesma linha.

O sistema funciona basicamente por meio das configurações de tempo de transferência, intervalo e imersão. Esses tempos são configurados no *software* responsável pelo gerenciamento e monitoramento do estado do biorreator. A tela principal do *software* pode ser visualizada na Figura 25.

Figura 25 - Tela principal



Fonte: O autor

Na parte superior da tela, encontra-se um botão “Conectar”. Quando clicado esse botão irá criar uma conexão com o biorreator conectado na porta descrita pelo componente ao lado do botão, que nesse caso é a porta “COM 6”. Caso haja mais de um biorreator conectado no mesmo computador, é possível escolher em qual deseja se conectar. Na parte central esquerda existe uma aba para a configuração de cada linha. Para configurar uma linha é necessário informar os tempos de transferência, imersão e intervalo e também informar se deseja que as datas em que cada ação ocorrerá sejam

salvas em um arquivo de texto. O tempo de transferência refere-se ao tempo necessário para que seja realizada a transferência completa do meio de cultura entre um recipiente e outro. O tempo de imersão é o período em que os explantes ficaram expostos ao meio de cultura e o tempo de intervalo é o período entre uma imersão e outra. Por fim, ao lado direito são descritas todas as ações realizadas pelo biorreator, como cada ação e em qual linha foi realizada, abertura e fechamento de comunicação entre o *software* e o biorreator e também se ocorreu algum tipo de erro, como falha na comunicação ou escrita de arquivo.

O estado atual de cada linha de produção pode ser visualizado na tela “Status de Produção” (Figura 26), a qual é aberta pelo botão “Status” da tela principal.

Figura 26 - Tela de status de produção

Info Linha 1	Info Linha 2
Ação em execução: Intervalo	Ação em execução: Transferencia
Tempo restante: 01:58:25	Tempo restante: 00:00:17
Próxima ação: Transferencia	Próxima ação: Intervalo
Imersões: 1	Imersões: 2
Início: 27/12/2015 17:58:30	Início: 27/12/2015 17:58:32
Info Linha 3	Info Linha 4
Ação em execução: Nenhuma	Ação em execução: Transferencia
Tempo restante: 00:00:00	Tempo restante: 00:00:10
Próxima ação: Nenhuma	Próxima ação: Intervalo
Imersões: 0	Imersões: 2
Início: 00/00/0000 00:00:00	Início: 27/12/2015 17:58:45
Última sincronia: 27/12/2015 17:58:30	

Fonte: O autor

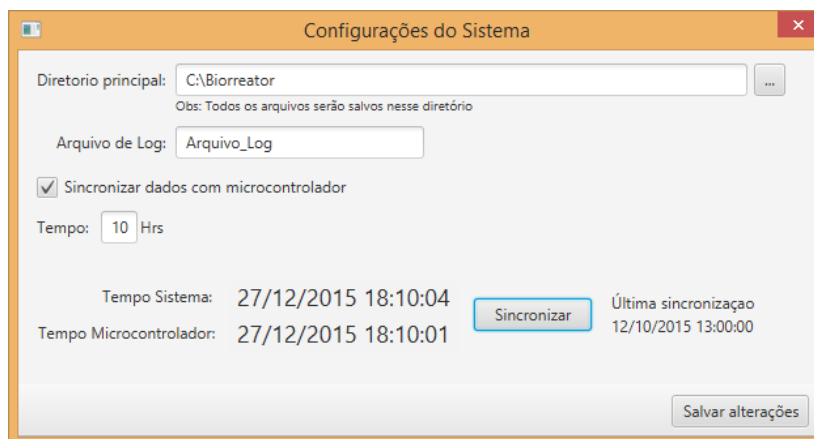
Na tela de *status* de produção são expostas informações como a ação que a linha está executando no atual momento, o tempo restante para a finalização dessa ação e qual a próxima ação a ser executada. Também podem ser visualizadas quantas imersões foram realizadas em cada linha e quando foi iniciado o experimento.

O *software* e o microcontrolador são executados de forma sincronizada sem comunicação, ou seja, a conexão é aberta apenas para a configuração dos tempos no

microcontrolador e depois de configurado, a conexão pode ser fechada. Dessa forma, pode ser necessário realizar uma atualização das informações exibidas na tela. Essa atualização é realizada por meio de uma sincronização entre o *software* e o microcontrolador, que é realizada automaticamente ou quando o botão “Atualizar” da tela principal é acionado.

Existem algumas configurações que podem ser realizadas no *software*, as quais são realizadas na tela de configuração (Figura 27).

Figura 27 - Tela de configuração do sistema



Fonte: O autor

A primeira configuração é o diretório principal, onde todos os arquivos de experimentos e log serão salvos. Caso algum erro ocorra com o *software* como falha na abertura de comunicação com o microcontrolador, erro em escrita de arquivo, entre outros, esse será salvo no arquivo de log informado. Há uma opção para a sincronização dos dados entre o *software* e o microcontrolador. Se essa opção estiver marcada, será realizada uma conexão e sincronia de dados no período inserido pelo usuário. Por fim, é exibido o horário configurado no computador e no microcontrolador. Caso esses horários sejam diferentes, com o botão “Sincronizar” o horário do microcontrolador é atualizado com o horário do computador.

Uma característica importante do sistema desenvolvido é que caso não tenha necessidade de monitoramento do estado do biorreator, depois de configurado o microcontrolador pode ser desconectado do computador e continuará com seu funcionamento normalmente. Se for necessário verificar o estado do biorreator, basta conectar o microcontrolador ao computador novamente, por meio de cabo USB e atualizar as informações.

Como demonstrado o biorreator construído pode ser utilizado com recipientes de diferentes capacidades. Porém para essa aplicação deve ser considerada a capacidade do compressor utilizado, o qual também pode ser substituído sem alterações em outras partes do sistema, respeitando apenas o limite de pressão suportado pelas válvulas solenoides.

Debnath (2011) expõe que condições ambientais do biorreator, como temperatura, pH do meio de cultura, concentrações de oxigênio e CO₂, oxigênio dissolvido e período de transferência ou agitação podem ser controladas e monitoradas. O biorreator descrito nesse trabalho apenas controla os períodos de imersão, transferência e intervalo referentes ao meio de cultura, dessa forma, em trabalhos futuros podem ser adicionadas funcionalidades para o controle das variáveis ambientais supracitadas.

No trabalho de Kana et al. (2010) é descrita a implementação de um biorreator de imersão temporária computadorizado. O *software* foi desenvolvido utilizando a linguagem de programação PHP e o banco de dados MySQL, já no presente trabalho, foi utilizado a tecnologia JAVA para a implementação do *software* de controle e não foi utilizado nenhum banco de dados, pois os dados são salvos em arquivos de texto. Outra diferença, é que o sistema desenvolvido por Kana et al. (2010) necessita estar conectado a um computador durante todo o processo, ao contrário, o sistema descrito nesse trabalho apenas necessita estar conectado para a configuração dos dados.

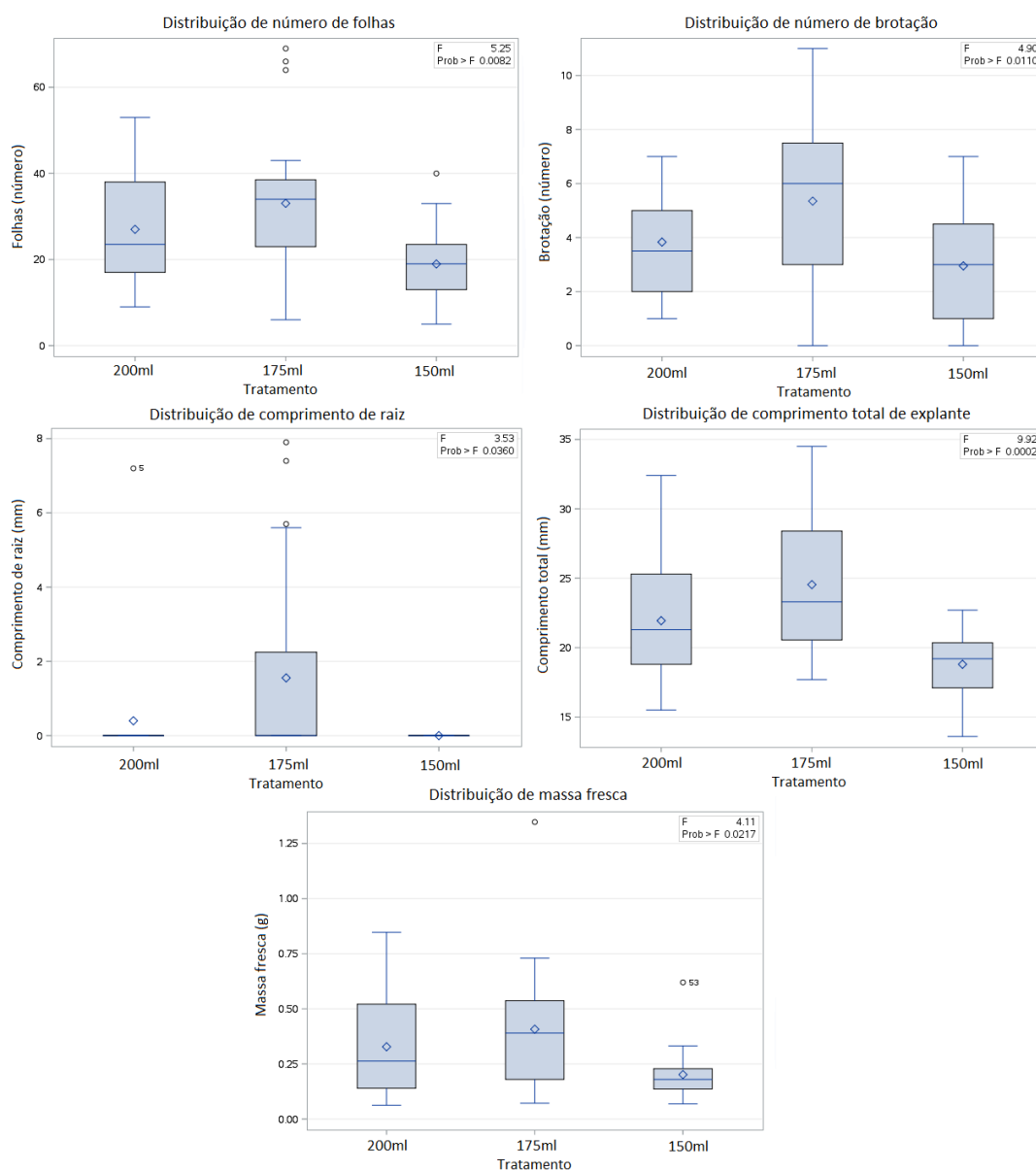
Poonnoy e Topoonyanont (2012) também desenvolveram um *software* para o controle de biorreatores de imersão temporária, porém utilizando a metodologia de computação paralela. Semelhante ao presente trabalho, as transferências de meio são realizadas de forma pneumática e similar ao trabalho de Kana et al. (2010) os autores utilizaram quatro válvulas solenoides de duas vias para abertura e fechamento da pressão positiva. Diferentemente, no sistema descrito nesse trabalho foram utilizadas três válvulas solenoides, duas de três vias e uma de duas vias, dessa forma diminui-se o custo de fabricação e energia.

4.2. EXPERIMENTO COM AMORA PRETA REALIZADO

Por meio da análise de variância de regressão, foi determinado o grau do polinômio que melhor se aplica as médias. Depois, foi encontrada a equação para gerar a curva e com a derivada dessa equação foi determinado qual o ponto mais alto do eixo x de cada medida, indicando a quantidade de meio de cultura ideal para cada aplicação.

Na Figura 28, são ilustrados os gráficos das distribuições dos dados obtidos.

Figura 28 - Gráfico de distribuição de número de folhas, número de brotação, comprimento de raiz, comprimento total do explante e massa fresca

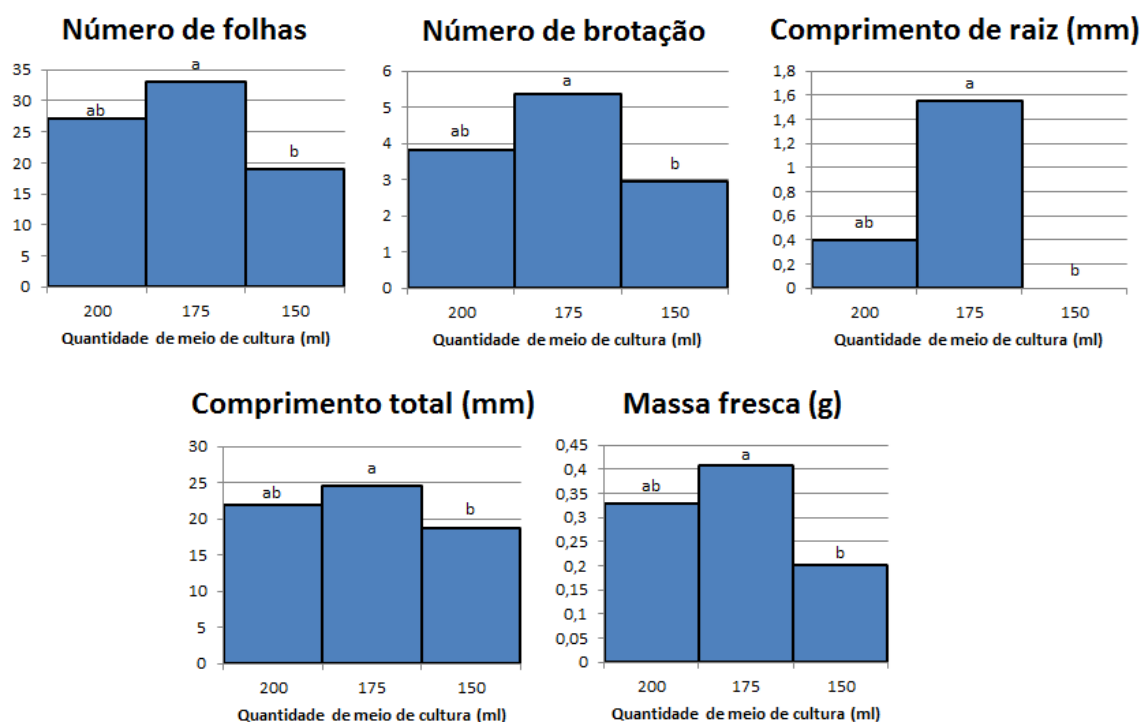


Fonte: O autor

Como pode ser observado, o número de folhas e comprimento do explante apresentaram valor de $Pr > F$ menor que 0,01, sendo significativo ao nível de 1% de probabilidade, e o número de brotação, comprimento de raiz e massa fresca obtiveram valores $Pr > F$ menor que 0,05, sendo significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Na Figura 29, podem ser visualizadas as médias e o grupo de Tukey em cada tratamento. Em todos os casos, o grupo de Tukey dos resultados do tratamento 2 diferiu do tratamento 3, porém, ambos não diferiram do tratamento 1.

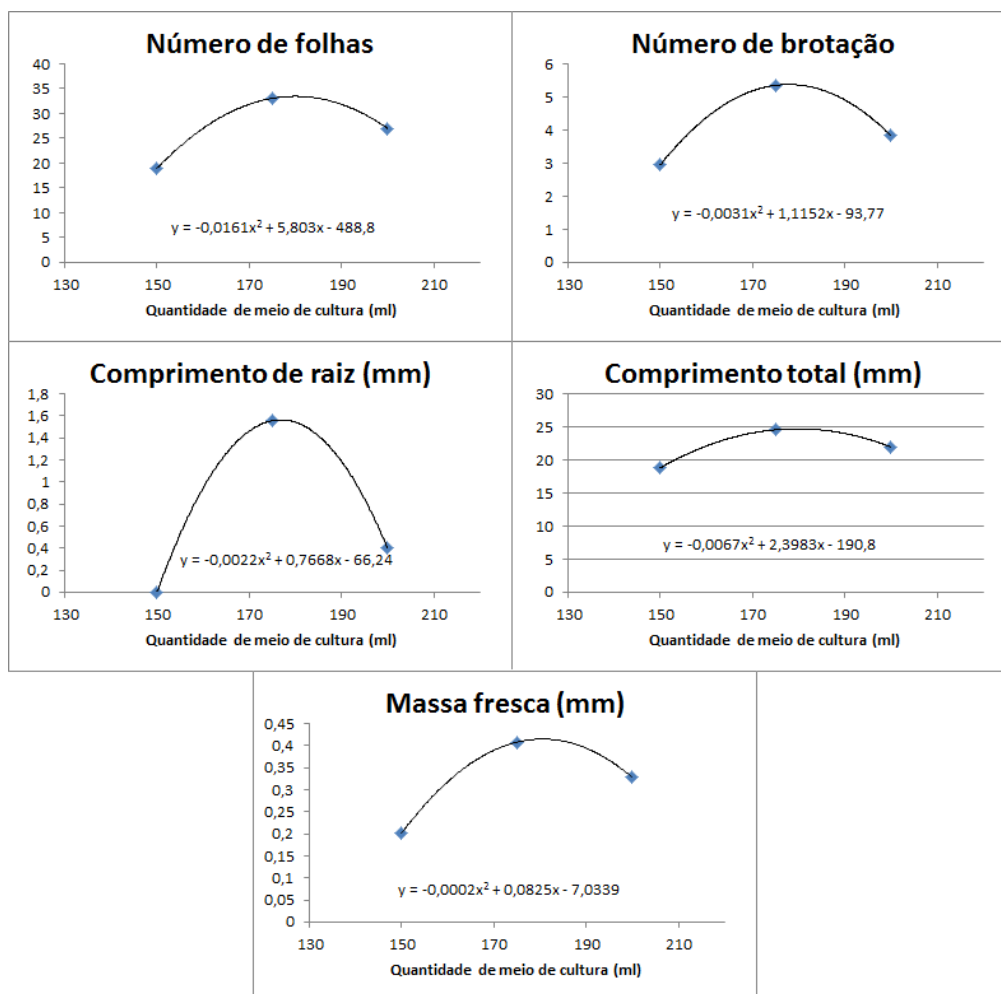
Figura 29 - Médias e agrupamento de Tukey para número de folhas, número de brotação, comprimento de raiz, comprimento total e massa fresca



Fonte: O autor

Para a análise de regressão a equação que melhor se adapta é a quadrática (Figura 30).

Figura 30 - Gráfico de curvas



Fonte: O autor

A partir das funções resultantes, foi calcula a derivada de cada função, a fim de determinar o ponto de inflexão, que nesse caso, expressa a quantidade de meio de cultura ideal para cada aplicação, exposto na Tabela 3.

Tabela 3 - Quantidade de meio de cultura ideal

Aplicação	Quantidade de meio (ml)
Número de folhas	180,22
Número de brotação	179,87
Comprimento de raiz	174,27
Comprimento total	178,95
Massa fresca	180,54

Fonte: O autor

Depois de retirado do experimento, notou-se que alguns explantes apresentaram hiper-hidricidade, uma hipótese da causa é o intervalo em que os explantes ficaram sem meio, sendo que em outros experimentos onde o tempo de intervalo foi maior, não foi encontrado nenhum explante hiper-hídrico. Debnath (2007), também obteve explantes hiper-hídricos de *cloudberry* micropropagados em biorreator com meio de cultura líquido. Esses explantes foram transferidos para um meio de cultura sólido em um processo chamado de dois passos e após quatro semanas produziram brotos normais. Esse método de regeneração também foi utilizado por Debnath (2009) e Debnath (2014). Considerando que a propagação em biorreatores é realizada em menor tempo se comparado ao meio convencional, essa metodologia de dois passos pode ser utilizada como uma solução para o explantes hiper-hídricos.

Analisando todos os experimentos realizados, desde os iniciais para verificar contaminação até o apresentado nesse trabalho, foi levantada a hipótese de trabalhar com diferentes intervalos de tempo durante o desenvolvimento do explante. Configurando um menor intervalo no início do processo e aumentando esse tempo gradativamente.

5. CONCLUSÃO

O Biorreator de imersão temporária construído demonstrou ser eficiente.

Com o *software* desenvolvido, além de configurar o funcionamento do biorreator, também é possível armazenar informações dos experimentos utilizados. Dessa forma, o sistema construído pode ser utilizado tanto em produção de larga escala como em laboratórios de pesquisa.

Os melhores resultados foram obtidos com quantidades de meio entre 175 e 180 ml obtiveram melhores resultados, dessa forma esses valores podem ser utilizados para a determinação de um protocolo para a produção de mudas de amora preta Cv. Tupy em biorreatores de imersão temporária.

REFERÊNCIAS

- ALBARRAN, J.; BERTRAND, B.; LARTAUD, M.; ETIENNE, H. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 81, p. 27-36, 2005.
- 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.
- ARAGÓN, C. E.; ESCALONA, M.; CAPOTE, I.; PINA, D.; CEJAS, I.; RODRIGUEZ, R.; CAÑAL, M. J.; SANDOVAL, J.; ROELS, S.; DEBERGH, P.; GONZALEZ-OLMEDO, J. Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*Musa AAB*) plantlets growing in temporary immersion bioreactors and during *ex vitro* acclimatization. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 41, p. 550-554, 2005.
- ARDUINO. Disponível em: <<http://arduino.cc/>>. Acesso em 5 de jan. de 2016.
- CHAKRABARTY, D.; DEWIR, Y. H.; HAHN, E. J.; DATTA, S. K.; PAEK, K. Y. The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock 'M9 EMLA' in temporary versus continuous immersion bioreactors. *Plant Growth Regulation*, v. 51, p. 11-19, 2007.
- CIRAD, Agricultural research for development. VITROPIC, RITA. Disponível em: <<http://www.vitropic.fr/rita>>. Acesso em 23 de dez. de 2015.
- CUELLO, J. L.; YUE, L. C. Ebb-and-Flow bioreactor regime and electrical elicitation: Novel strategies for hairy root biochemical production. *Electronic Journal of Integrative Biosciences*, v. 3, p. 45-56, 2008.
- D'AUSILIO, A. Arduino: A low-cost multipurpose lab equipment. *Behavior Research Methods*, v. 44, p. 305-313, 2012.
- DEBIASI, C. Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*: Capítulo 6 Utilização de biorreatores de imersão temporária em uma biofábricas de cultura de tecidos vegetais. São Paulo: Antiqua, 2011. 393p.
- DEBNATH, S. C. A two-step procedure for *in vitro* multiplication of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) shoots using bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 88, p. 185-191, 2007.
- DEBNATH, S. C. A Scale-up System for Lowbush Blueberry micropropagation using a bioreactor. *HortScience*, v. 44, p. 1962-1966, 2009.
- DEBNATH, S. C. Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation – A review. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 91, p. 147-157, 2011.

DEBNATH, S. C. Bioreactor-induced adventitious shoot regeneration affects genotype-dependent morphology but maintains clonal fidelity in red raspberry. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 50, p. 777-788, 2014.

DEVARAKONDA, K.; NGUYEN, K. P.; KRAVITZ, A. V. ROBuck: A low cost operant chamber based on the Arduino microcontroller. *Behavior Research Methods*, p. 1-7, 2015.

EIBL, R.; EIBL, D. Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochem Rev*, v. 7, p. 593-598, 2008.

EMBRAPA. Produção de mudas de amora-preta por meio de cultura de tecidos. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/ProducaoMudasAmoraPreta/cap04.htm>>. Acesso em 14 de dez. de 2015.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZÁLEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLEZ, 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.

FKI, L.; BOUAZIZ, N.; KRIAA, W.; BENJEMAA-MASMOUDI, R.; GARGOURI-BOUZID, R.; RIVAL, A.; DRIRA, N. Multiple bud culture of ‘Barhee’ date palm (*Phoenix dactylifera*) and physiological status of regenerated plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 168, p. 1694-1700, 2011.

FRANCISCO, M.; LÓPES-RODRIGUES; CUESTA, F. Andruino-A1: Low-Cost educational robot based on android and arduino. *Journal of Intelligent & Robotic Systems*, v. 81, p. 63-76, 2016.

GAO, M.; JIANG, W.; WEI, S.; LIN, Z.; CAI, B.; YANG, L.; LUO, C.; HE, X.; TAN, J.; CHEN, L. High-efficiency propagation of Chinese water chestnut [*Eleocharis dulcis* (Burm.f.) Trin. ex Hensch] using a temporary immersion bioreactor system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 121, p. 761-772, 2015.

GEORGIEV, V.; SCHUMANN, A.; PAVLOV, A.; BLEY, T. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, v. 14, p. 607-621, 2014.

GERALD, L. T. S. Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. São Paulo: Antiqua, 2011. 393p.

GIACOMETTI, D. C. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas: Parte I Introdução. Brasília: Embrapa CNPH, 1990. 433p.

GONZÁLEZ, R.; RÍOS, D.; AVILÉS, F.; SÁNCHEZ-OLATE, M. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. *Bosque*, v. 32, p. 147-154, 2011.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M. A. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas: Parte II Micropropagação. Brasília: Embrapa CNPH, 1990. 433p.

HANHINEVA, K.; KOKKO, H.; KÄRENLAMPI, S. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 41, p. 826-831, 2005.

HE, S.; LIU, C.; SAXENA, P. K. Plant regeneration of an endangered medicinal plant *Hydrastis canadensis* L. *Scientia Horticulture*, v. 113, p. 82-86, 2007.

IICZUK, A.; WINKELMANN, T.; RICHARTZ, S.; WITOMSKA, M.; SEREK, M. In vitro propagation of *Hippeastrum X chmielli* Chm. – influence of flurprimidol and the culture in solid or liquid medium and in temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 83, p. 339-346, 2005.

JAVASE. Oracle. Disponível em: < <http://www.oracle.com/technetwork/pt/java/javase/overview/index.html>>. Acesso em 10 de out. de 2014.

JO, U. A.; MURTHY, H. N.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Micropropagation of *Alocasia amazonica* using semisolid and liquid cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 44, p. 26-32, 2008.

JOVA, M. C.; KOSKY, R. G.; PÉREZ, M. B.; PINO, A. S.; VEGA, C. M.; TORRES, J. L.; CABRERA, A. R.; GARCÍA, M. G.; VENTURA, J. C. Production of yam microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 83, p. 103-107, 2005.

KANA, E. B. G.; OLOKE, J. K.; LATEEF, A.; KENFACK, R. H. A.; ADEYEMI, A. Implementation details of computerized temporary immersion bioreactor (TIB): a fermentation case of *pleurotus pulmonarius*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 24, p. 2149-2153, 2010.

KESSEL, R. H. J.; CARR, A. H. The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. *Journal of Experimental Botany*, London, v. 23, p. 996-1007, 1972.

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, n. 3, p. 482-487, 2001.

LEMOS, E. E. P. Aspectos práticos da micropropagação de plantas: Capítulo 4 Micropropagação de plantas por biorreatores. Brasília: Embrapa, 2013. 407p.

LUTTMAN R.; FLOREK, P.; PREIL, W. Silicone-tubing aerated bioreactors for somatic embryo production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 39, p. 157-170, 1994.

MAENE, L.; DEBERGH, P. Liquid médium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 5, n. 1, p. 23-33, 1985.

MALOSSO, M. G.; BERTONI, B. W. COPPEDE, J. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Jacaranda decurrens* Cham. Journal of Medicinal Plants Research, v. 6, p. 1147-1154, 2012.

MCALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 81, p. 347-358, 2005.

NAVARRO, G. E. Z.; HONORATO, A. E. S.; OYARZUN, A. G. C.; RODRIGUEZ, E. A. T.; ENCALADA, H. G. P.; CANTILLANA, P. A. Z. Thermo-photo-bioreactor and method for the culture and mass micropropagation of *Deschampsia antártica* in vitro. US Patents US20130344528 A1, 2011.

NETBEANS. Disponível em: <<https://netbeans.org/>>. Acesso em 10 de out. de 2014.

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. Plant Cell Reports, v. 27, p. 667-676, 2008.

ORACLE. Disponível em: < <http://docs.oracle.com/javase/8/javase-clienttechnologies.htm>>. Acesso em 10 de out. de 2014.

PANDA, A. K.; SAROJ, M.; BISARIA, V. S.; BHOJWANI, S. S. Plant cell reactors – a perspective. Enzyme and Microbial Technology, v. 11, p. 386-397, 1989.

PEREZ, M.; BUENO, M. A.; ESCALONA, M.; TOOROP, P.; RODRÍGUEZ, R.; CAÑAL, M. J. Temporary immersion systems (RITA[®]) for the improvement of cork oak somatic embryogenic culture proliferation and somatic embryo production. Trees, v. 27, p. 1277-1284, 2013.

PINEÑO, O. ArduiPod Box: A low-cost and open-source Skinner box using an iPod Touch and an Arduino microcontroller. Behavior Research Methods, v. 46, p. 196-205, 2014.

PLANTFORM. Plant Form AB, Sweden & TC propagation Ltd. Disponível em: <<http://www.plantform.se/>>. Acesso em 5 de jan. de 2016.

POONNOY, P.; TOPOONYANONT, N. Parallel computing and state machine software development for multiple temporary immersion bioreactor systems sequence control. International Conference of Agricultural Engineering - CIGR-AgEng 2012, Agriculture and Engineering for a Healthier Life, Valencia, Spain, 2012.

PREIL, W.; FLOREK, P.; WIX, U.; BECK, A. Towards mass propagation by use of bioreactors. Acta Horticulture, The Hague, v. 226, p. 99-100, 1988.

RALM. Biorreatores. Disponível em: <<http://www.bitralm.com.br/>>. Acesso em 5 de jan. de 2016.

RAMOS-CASTELLÁ, A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BELLO-BELLO, J.; LEE-ESPINOSA, H. Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 50, p. 576-581, 2014.

ROBERT, M.; HERRERA-HERRERA, J. L.; HERRERA-HERRERA, G. HERRERA-ALAMILLO, M. A.; FUENTES-CARRILLO, P. A new temporary immersion bioreactor system for micropropagation. *Plant Cell Culture Protocols*, v. 318, p. 121-129, 2006.

RODRIGUES, P. H. V. Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*: Capítulo 5 Produção de mudas em biorreator de imersão temporária: um novo desafio para as biofábricas. São Paulo: Antiqua, 2011. 393p.

SANKAR-THOMAS Y. D.; SAARE,SURMINSKI, K.; LIEBEREI R. Plant regeneration via somatic embryogenesis of *Camptotheca acuminata* in temporary immersion system (TIS). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 95, p. 163-173, 2008.

SCHEIDT, G. N. Desenvolvimento e validação de um biorreator do tipo imersão por bolhas para micropropagação de plantas. Tese de doutorado: Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2008. 105p.

SCHEIDT, G. N.; ARAKAKI, A. H.; CHIMILOVSKI, J. S.; PORTELLA, A. C. F.; SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; BIASI, L. A.; SOCCOL, C. R. Utilization of the biorreator of imersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, p. 37-43, 2009.

SETIS. Setis-systems. Disponível em: <<http://www.setis-systems.be/>>. Acesso 5 de jan. de 2016.

SHAIK, S.; DEWIR, Y. H.; SINGH, N.; NICHOLAS, A. Micropropagation and bioreactor studies of the medicinally important plant *Lessertia (Sutherlandia) frutescens* L. *South African Journal of Botany*, v. 76, p. 180-186, 2010.

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

SNYMAN, S. J.; MEYER, G. M.; KOCH, A. C.; BANASIAK, M.; WATT, M. P. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 47, p. 234-249, 2011.

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

SOUZA, A. R.; PAIXÃO, A. C.; UZÊDA, D. D.; DIAS, M. A.; DUARTE, S.; AMORIM, H. S. A placa Arduino: uma opção de baixo custo para experiências de física assistidas pelo PC. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 33, p. 1702, 2011.

STYER, D. J. Bioreactor technology for plant propagation. Tissue culture in forestry agriculture. New York: Plenum, p. 117-130, 1985.

SUMARYONO, RIYADI, I.; KASI, P. D.; GINTING, G. Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in temporary immersion system. Indonesian Journal of Agriculture, v. 1, p. 109-114, 2008.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. Plant tissue culture engineering. Dordrecht: Springer, 2006. p. 83-100.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of bioreactors used for shoots and embryos. Plant cell, tissue and organ culture v. 39 p.147-156, 1994;

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. Plant and Cell Physiology, v. 22, n. 3, p 461-467, 1981.

TAKAYAMA, S.; SWEDLUND, B.; MIWA, U. Automated propagation of microbulbs of lilies. Cell cultures and somatic cell genetics of plants. New York: Academic Press, v. 8, p. 11-131, 1991.

TANAKA, H.; NISHIJIMA, F.; SUWA, M.; IWAMOTO, T. Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. Biotechnology and Bioengineering, v. 25, p. 2359-2370, 1983.

TEISSON, C.; ALVARD, D. In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. Potato Research, v. 42, p. 499-504, 1999.

TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J. V.; ETIENNE, H. In vitro culture by temporary immersion: a new device. Plantations, recherche, Developpement, v. 2, n. 5, p. 32-33, 1995.

TEIXEIRA, J. B. Biorreator de imersão temporária desenvolvido pela Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. II Simpósio de Pesquisa dos Cafés no Brasil, p. 278-284, 2001.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais – Produção de mudas em larga escala. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n 24, p. 36-41, Fev. 2002.

TEIXEIRA, J. B.; CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas: Capítulo 6 Biorreatores para produção de mudas em larga escala. Brasília: Embrapa, 2010. 303p.

TEIXEIRA, J. B. Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*: Capítulo 2 Biorreator de Imersão Temporária – O futuro da produção industrial de plantas *in vitro*. São Paulo: Antiqua, 2011. 393p.

UCHENDU, E. E.; PALIYATH, G.; BROWN, D. C. W.; SAXENA, P. K. *In vitro* propagation of North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 47, p. 710-718, 2011.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C.; CÂMARA, T. R.; Clonagem Vegetal. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, vol. 7, p. 86-91, 2010.

USHIYAMA, K. Large scale culture techniques of plant cells and the secondary metabolite production. *Hakko to Kogyo*, Tokyo, v. 46, p. 7-11, 1984.

WATT, M. P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, p. 14025-14035, 2012.

WAWROSCHE, C.; KONGBANGKERD, A.; KOPF, A.; KÖPP, B. Shoot regeneration from modules of *Charybdis* sp.: a comparison of semisolid, liquid and temporary immersion culture systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 81, p. 319-322, 2005.

WELANDER, M.; PERSSON, J.; ASP, H.; ZHU, L. H. Evaluation of new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae*, v. 179, p. 227-232, 2014.

WU, RZ.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J.; PAK, K. Y. Micropropagation of an endangered jewel orchid (*Anoetochilus formosanus*) using bioreactor system. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, v. 48, p. 376-380, 2007.

YANG, L.; ZAMBRANO, Y.; HU, C. J.; CARMONA, E. R.; BERNAL, A.; PÉREZ, A.; ZAYAS, C. M.; LI, Y. R.; GUERRA, A.; SANTANA, I.; ARENCIBA, A. D. Sugarcane metabolites produced in CO₂-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum lycopersicum*) resistance against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 46, p. 558-568, 2010.

ZHU, L. H.; LI, X. Y.; WELANDER, M. Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 81, p. 313-318, 2005.