

# 12. Reactores para cultura de células vegetais

M<sup>a</sup> Emília Lima-Costa e Sara Raposo

## 12.1. INTRODUÇÃO

As plantas são um valioso recurso natural para obtenção, de diversos produtos químicos com aplicações medicinais, na indústria alimentar, na indústria de detergentes, de curtumes, pesticidas, tintas entre outras. Usualmente estes compostos são obtidos por via extractiva em que a indústria química tem tido um papel determinante. Cerca de 25% dos medicamentos farmacêuticos que hoje se utiliza, são obtidos por extracção química a partir da planta *in vivo*. Estes produtos são, em geral, compostos com uma estrutura química não-proteica e complexa. Os compostos de origem vegetal mais interessantes do ponto de vista comercial são aqueles em que a síntese química, devido à complexidade da estrutura molecular, é pouco viável quer por razões tecnológicas ou económicas, ou em que a síntese realizada por microrganismos não seja possível.

A utilização da tecnologia de culturas de células vegetais aparece como uma via alternativa à produção dos chamados produtos naturais obtidos por síntese química ou microbiana e, particularmente, no caso em que a espécie vegetal seja rara ou se encontre em extinção. As culturas de células em suspensão representam um importante recurso para a obtenção de produtos vegetais de valor acrescentado elevado, desde que a viabilidade económica do processo seja demonstrada.

A possibilidade de obter em laboratório produtos naturais, em condições controladas e reprodutíveis, independentemente da sazonalidade dos ciclos agrícolas e com uma tecnologia mais limpa do que a síntese química, são importantes vantagens que permitem encarar esta via com potencial inovador na indústria biotecnológica. Contudo, apenas um reduzido número de compostos tem sido produzido e comercializado a partir da cultura de células em suspensão.

Na tabela 12-1 estão indicados alguns produtos vegetais e respectivos processos biotecnológicos, que se encontram actualmente comercializados ou em via de comercialização. Uma reduzida actividade molecular do composto, ou aspectos da engenharia do bioprocessamento tem condicionado os valores de produtividade volumétrica que podem variar desde 0,05g/L.dia para a berberina até 0,75g/L.dia para o taxol.

A utilização de células vegetais na biotransformação (Yokoyama, 1996), na produção de proteínas recombinantes, anticorpos e fragmentos de anticorpos recombinantes e proteínas de elevado valor terapêutico, como a interleucina humana IL-2 e IL-4 (Magnuson *et al.*, 1998), ricina (Sehnke & Ferl, 1999) e a  $\alpha_1$ -antitripsina humana (Terashima *et al.*, 1999a; 1999b), são aplicações que se encontram em desenvolvimento e que poderão contribuir para a inovação na biotecnologia, tornando o uso da célula vegetal como unidade de produção de metabolitos primários ou secundários com vantagens relativamente ao uso da célula animal ou microbiana.

Outro aspecto a considerar na tecnologia da cultura de células vegetais é a sua aplicação como modelo biológico nos estudos da engenharia metabólica do stresse biótico ou abiótico. Tem sido utilizada em estudos de fitorremediação (Vanek *et al.*, 2001) e em estudos de salinidade (Lima-Costa *et al.*, 2002) em que através da resposta bioquímica e molecular da célula se avalia a capacidade de determinadas espécies vegetais induzirem tolerância às agressões ambientais ou nutricionais facilitando a selecção das variedades a utilizar na agricultura ou em processos de recuperação de solos.

Tabela 12-1 Produtos vegetais obtidos a partir de cultura de células em suspensão em escala industrial, já comercializados ou em fase de pré-comercialização

| <i>Produto</i>         | <i>Espécie Vegetal</i>  | <i>Tipo de reactor/<br/>Volume Escala</i> | <i>Empresa</i>   | <i>Aplicação</i>                                     |
|------------------------|---|---|--|--|
| Berberina              | <i>Coptis japonica</i>  | STR, 6000 L                               | Mitsui,<br>Chemicals.Inc.,Japão  | Medicinal  |
| Ginseng                | <i>Panax ginseng</i><br>(ginseng)                                 | STR, 20 000L,<br>25 000 L                 | Nino Denk<br>Corporation, Japão  | Suplemento<br>alimentar                              |
| Paclitaxel-<br>genexol | <i>Taxus spp.</i> (teixo)   | STR, 32 000 L                             | Samyang Genex Corp,<br>Coreia  | Medicinal  |
| Paclitaxel-<br>Taxol   |   | STR, 75 000 L                             | Phyton Inc. USA,<br>Alemanha.  |  |
|                        |   | STR, 200 L                                | Mitsui Chemicals, Inc,<br>Japão  |  |
| Polissacarídeos        | <i>Polianthes tuberosa</i>  | ALR, 1000 L<br>STR, 4 000 L,<br>10 000 L  | Coop. Res. Centre Ind.<br>Plant Biopolymers<br>Kao Corporation,<br>Japão | Aditivos<br>alimentares,<br>medicinal,<br>cosméticos |
| $\alpha$ -amilase      | <i>Glycine max.</i> (soja);<br><i>Hordeum vulgare</i><br>(cevada) | STR, 10 000 L                             | Novo Nordisk,<br>Dinamarca   | Fabrico de pão                                       |
| Chiconina              | <i>Lithospermum<br/>erythorhizon</i>                              | STR, 200 L,<br>750 L                      | Mitsui,<br>Chemicals.Inc.,Japão  | Cosméticos   |

Adaptado de Kieran (2001).

O desenvolvimento tecnológico de processos industriais com viabilidade económica a partir da cultura de células vegetais, implica estudos de aumento de escala do reactor para optimização da produtividade do composto que se pretende produzir e utilização de linhas celulares geneticamente estáveis. Neste contexto, é fundamental nos estudos laboratoriais caracterizar a morfologia celular e a cinética de crescimento da referida cultura em suspensão.

### 12.1.1. A CÉLULA VEGETAL: MORFOLOGIA CELULAR E AGREGADOS

O estudo da morfologia durante o ciclo de crescimento celular possibilita uma melhor compreensão do comportamento da cultura face às diferentes condições nutricionais e operacionais a que a suspensão celular está sujeita durante o crescimento. A dimensão da célula vegetal pode variar entre 10 a 100  $\mu\text{m}$ , enquanto que a célula bacteriana apresenta uma dimensão inferior a 1  $\mu\text{m}$ , as leveduras variam entre 5-10  $\mu\text{m}$  e a célula animal varia entre 10 e 20  $\mu\text{m}$ .

A maior parte das culturas de células vegetais em suspensão são constituídas por agregados, contrariamente às culturas microbianas que são constituídas por células individualizadas. A dimensão dos agregados varia ao longo do perfil de crescimento e das condições estabelecidas em biorreactor. *Morinda citrifolia* tem sido descrita como sendo uma linha celular em que as células apresentam uma forma alongada e se encontram agrupadas em cadeias lineares de 2 a 10 células (Figura 12-1.a) e com um comprimento a variar entre 100 e

1700  $\mu\text{m}$  (Kieran *et al.*, 1993; MacLoughlin *et al.*, 1998). Os agregados celulares de *Centaurea calcitrapa* variam entre 50 e 3000  $\mu\text{m}$  de diâmetro, podendo o número de células de cada agregado ser de 3 a 50 células (Raposo, 2003). A forma dos agregados é em geral arredondada, podendo no entanto ocorrerem agregados alongados (Figura 12-1.b).

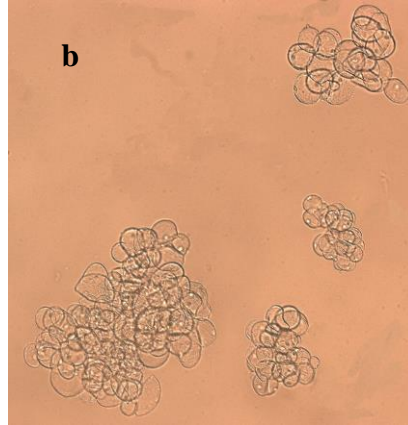
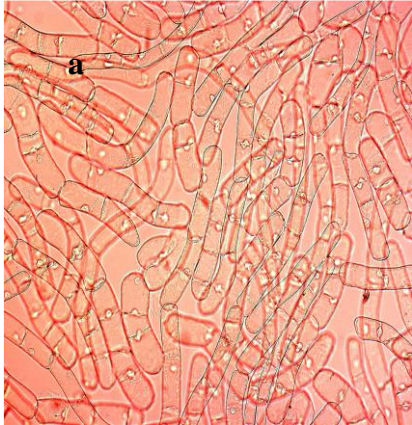


Figura 12-1 – Células em suspensão de *Morinda citrifolia* (a) (Jeffers *et al.*, 2003) e *Centaurea calcitrapa* (b) (Raposo, 2003), com 7 dias de cultura, cultivadas em Erlenmeyer

As variações de tamanho e da forma dos agregados celulares estão normalmente associadas ao ambiente hidrodinâmico a que se encontram expostos e como tal, dependentes da geometria do reactor. Assim sendo, e devido à acção de forças de tensão durante o crescimento, a maioria das linhas celulares têm tendência a diminuir o tamanho dos agregados celulares, formando células individuais ou agregados de menores dimensões (Kieran *et al.*, 1993, Jeffers *et al.*, 2003, Raposo, 2003). A maior ou menor capacidade de agregação celular tem sido atribuída à presença de polissacarídeos extracelulares, principalmente nas fases finais do crescimento celular, sendo responsáveis pela resistência à obtenção de células individualizadas (Mavituna & Park, 1987). Foi igualmente, observado mudança da forma da célula numa cultura de *Nicotiana tabacum* (Curtis & Emery, 1993), de uma forma alongada em sistema descontínuo para uma forma esférica, em sistema semi-contínuo. Os agregados celulares de *Solanum chrysotrichum* sofreram igualmente alteração da forma, de alongada para arredondada, quando transferidos do Erlenmeyer para biorreactor mecanicamente agitado (Trejo-Tapia *et al.*, 2001).

Hulst *et al.* (1989) e Keßler *et al.* (1999) demonstraram haver um clara correlação entre a dimensão dos agregados e o metabolismo celular, pelo que a análise morfológica celular pode ser um importante contributo para a compreensão do comportamento da cultura em determinado tipo de biorreactor e em determinadas condições nutricionais.

A análise digital de imagem é uma técnica que permite medir com rigor a dimensão de cada um dos agregados, sendo particularmente útil no estudo dos agregados que apresentam uma grande variabilidade de tamanho e de forma. Na figura 12-2 pode observar-se uma distribuição típica da dimensão dos agregados celulares de *Centaurea calcitrapa* ao longo do ciclo de crescimento, verificando-se nesta linha celular, uma redução do tamanho dos agregados. Contudo, o tamanho médio dos agregados celulares da cultura de *Beta vulgaris* manteve-se constante ao longo do ciclo de crescimento (Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999).

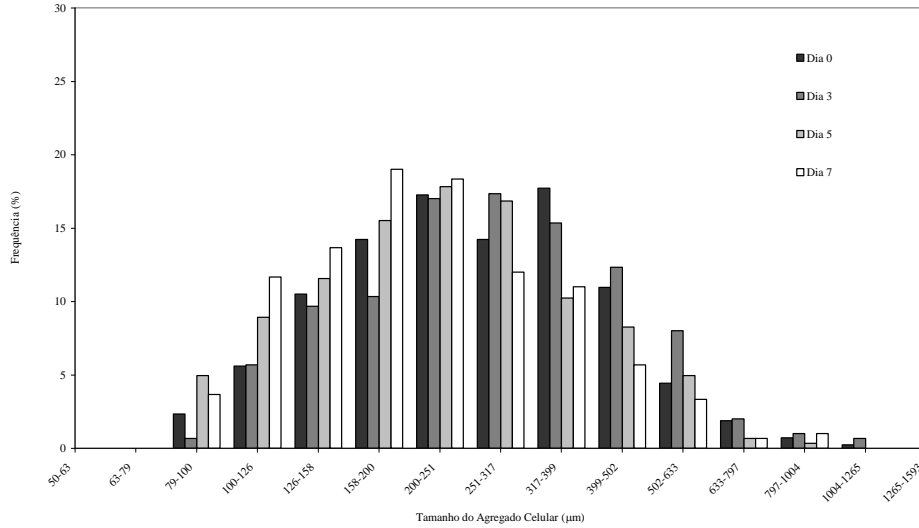


Figura 12-2. – Distribuição do tamanho dos agregados, ao longo do ciclo de crescimento, das células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer de 1 L.

Os estudos de análise morfológica pretendem contribuir para uma melhor compreensão da linha celular de modo a otimizar a produção de metabolitos vegetais secundários ou primários. Contudo, a maior parte dos trabalhos apontam que a produção dos compostos é independente da dimensão dos agregados, desde que não ultrapassem os 250 µm (Keßler *et al.*, 1999), valor a partir do qual ocorre, em geral, diminuição da produtividade.

### 12.1.2. PERFIL DE CRESCIMENTO CELULAR VEGETAL

Para além das características inerentes a cada espécie celular, o perfil de crescimento de uma cultura vegetal em suspensão depende das condições de cultivo quer nutricionais quer operacionais. A agitação e o arejamento são parâmetros determinantes para uma adequada transferência de massa e necessitam de ser otimizados para se obter elevada produtividade do produto.

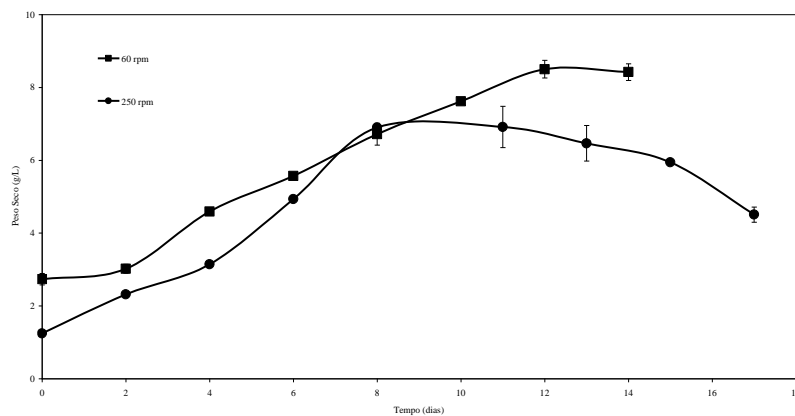


Figura 12-3. - Variação do peso seco ao longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

Na figura 12-3. são apresentados os perfis de crescimento de uma cultura de *C. calcitrapa* em biorreactor de 2 L agitado mecanicamente a 60 rpm e 250 rpm. O crescimento que decorreu a 60 rpm apresenta uma fase exponencial mais longa, cerca de 10 dias, enquanto a que decorreu a 250 rpm tem uma fase exponencial relativamente curta de 6 dias e após o 8º dia, esta cultura entrou em fase estacionária seguida de declínio, indiciando uma situação de stresse celular devido a uma agitação mais elevada. A análise das viabilidades celulares ao longo do ciclo de crescimento (Figura 12-4.) veio comprovar este resultado visto que, para 60 rpm a viabilidade manteve-se elevada ao longo de todo o ciclo de crescimento 80-90%, enquanto que a 250 rpm se verificou um decréscimo na viabilidade atingindo um valor inferior a 40% no 14º dia do ciclo. Com esta agitação de 250 rpm a população celular de *C. calcitrapa* apresentou um maior índice de mortalidade ao longo de todo o ciclo, mantendo elevada viabilidade apenas durante a fase inicial do ciclo, sugerindo susceptibilidade da cultura às forças de tensão existentes no seio da suspensão (*shear stress*).

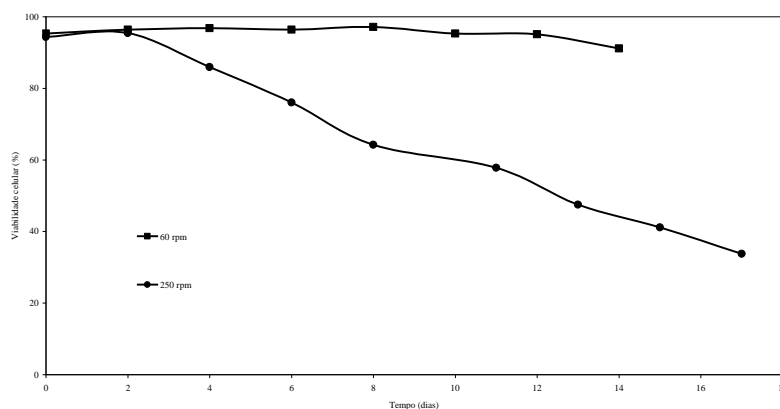


Figura 12- 4. – Viabilidade relativa das células em suspensão de *C. calcitrapa*, para 60 e 100 rpm de agitação, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

As condições operacionais, agitação e caudal de arejamento, a estabelecer num reactor biológico assim como, a sua geometria são fundamentais no dimensionamento do reactor, condicionando a eficácia, a viabilidade quer tecnológica quer económica do bioprocessos.

## 12.2. DESCRIÇÃO DE UM PROCESSO UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS

A produção biotecnológica a partir de culturas celulares tem possibilitado a obtenção de grandes quantidades de taxol para fazer face às necessidades da indústria farmacêutica, sem ser necessário abater árvores que se encontram em extinção na natureza. Este composto pertence à família dos terpenos e é utilizado na terapia de diversas neoplasias, do ovário, do pulmão ou da mama.

O taxol tem sido extraído de diferentes espécies de *Taxus*, sendo o teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) uma das dez espécies conhecidas e das primeiras a ser utilizado como recurso natural deste composto.

Os rendimentos de extracção a partir da camada interior do tronco da árvore adulta, são geralmente baixas, cerca de 100 mg/kg de biomassa, pelo que se torna necessário recorrer à síntese química ou a processos biotecnológicos. A produção do taxol utilizando culturas celulares de *Taxus spp.* tem sido alvo de várias patentes nos EUA.

O procedimento a seguir descrito é um dos bioprocessos implementado a nível industrial, a partir de células de *Taxus chinensis*, utilizando a adição de um precursor da biossíntese para incrementar a produtividade do taxol (Japanese Patent Publication No. 7-255495).

### 12.2.1. PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DO TAXOL

Retira-se um explante da folha, caule, semente ou raiz do teixo que é esterilizado com uma solução de etanol a 70% (v/v) e coloca-se em meio nutriente Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd & McCown, 1980; Owen & Miller, 1992) suplementado com ácido  $\alpha$ -naftaleno-acético ( $10^{-5}$  M) gelificado com agar. É mantido às escuras a 25 °C, até se observar a obtenção de *callus* não diferenciado e sem organogênese e com taxa específica de crescimento constante. A repicagem periódica do explante, durante este período de iniciação favorece a obtenção de tecido calogénico.

Este *callus* é transferido para um meio de cultura líquido (WPM), sem a adição de agar sendo mantido neste meio nutriente até se obter um crescimento celular uniforme. A formação de agregados de maior ou menor dimensão, durante o crescimento em meio líquido, é uma das características das culturas em suspensão vegetais. Através de um sistema de crivos, os agregados de maior dimensão, existentes no seio do líquido, são removidos de forma a se obter uma cultura mais homogénea. A produção de taxol foi otimizada para agregados com um diâmetro médio entre 0,12 mm e 1,0 mm.

A obtenção de um perfil de crescimento da cultura reprodutível e de uma população celular com estabilidade genética são atingidos, em geral, ao fim de 5-10 sub-culturas periódicas.

Com este procedimento obtém-se uma pré-cultura em condições de ser utilizada como inóculo do reactor biológico de produção de taxol.

Os meios nutrientes utilizados na produção do taxol podem ser os normalmente utilizados nas culturas de células vegetais tais como, o meio Murashige & Skoog (1962), meio Linsmaier & Skoog (1965), meio Woody Plant (1980), meio Gamborg's B-5 (1976) e meio Schenk & Hildebrandt (1972), entre outras.

Nestes meios estão presentes fito-hormonas, fonte de carbono, compostos inorgânicos, vitaminas e aminoácidos. As fito-hormonas normalmente usadas são auxinas, como o ácido indolacético (IAA), ácido naftaleno-acético (NAA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); as citocianinas usadas são a cinetina, zeatina e a dihidro zeatina. (0,01-10 M). Como fonte de carbono utilizaram-se dissacarídeos, como a sacarose, maltose e lactose; monossacarídeos, como a glucose, frutose e galactose; amido; ou uma mistura de dois ou mais açúcares, usualmente na concentração de 2-3% (p/v).

Os elementos inorgânicos normalmente usados são fósforo, azoto, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, manganês, zinco, boro, cobre, molibdénio, cloro, sódio, iodo e cobalto. As vitaminas mais utilizadas são a biotina, tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6), ácido pantoténico, inositol, ácido nicotínico. Os aminoácidos, são a glicina, leucina, glutamina, cisteína e a fenilalanina (0,1-100 mg/L).

O taxol foi produzido em reactor mecanicamente agitado, equipado com agitadores em hélice ou de pás, com uma agitação de 40-120 rpm e arejamento de 0,05 vvm . O diâmetro do agitador foi  $\frac{1}{2}$  do diâmetro interno do vaso e a altura da pá do agitador foi  $\frac{1}{4}$  da altura ocupada pelo líquido.

A duração da cultura varia de 15-30 dias, decorrendo a uma temperatura de 25 °C. O coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio foi estabelecido no intervalo de valores entre 15 –50  $\text{h}^{-1}$ , de forma a garantir a oxigenação necessária à produção do composto. Para valores superiores a 50  $\text{h}^{-1}$  verificou-se danificação celular. O oxigénio dissolvido no seio da cultura não deverá ser inferior a 30%, sendo a produção de taxol favorecida para concentrações entre 50-75%. Os valores de agitação e do coeficiente volumétrico de transferência de massa estabelecidos estão dependentes da volumetria do tanque e do tipo de agitador.

Para aumentar a produtividade volumétrica do taxol foi adicionado um precursor do metabolismo, ácido jasmónico ou um derivado metilado deste ácido, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

No final do ciclo de crescimento celular a biomassa é separada por filtração e liofilizada. O taxol é extraído da cultura de células utilizando como solvente orgânico, o metanol e quantificado por HPLC.

## 12.3. DESCRIÇÃO DO REACTOR E CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO

As culturas de células vegetais têm sido cultivadas, em geral, em reactores agitados mecanicamente e em reactores *air-lift*. Uma das desvantagens destes reactores biológicos são os efeitos que as forças de tensão criadas no seio do vaso, por acção da agitação e de intenso caudal de arejamento forçado, podem provocar na estrutura celular, afectando a produtividade da reacção biológica.

Foi desenvolvido para células animais um reactor munido com uma membrana difusora de ar (Lehmann *et al.*, 1987) e recentemente adaptado para células vegetais à escala laboratorial (Piehl *et al.*, 1988, Böhme *et al.*, 1997, Raposo, 2003). Este *novo* reactor permite a utilização de culturas com elevada densidade de biomassa para a obtenção de elevadas produtividades, em que o stress hidrodinâmico é minimizado.

Em qualquer dos reactores referidos é necessário projectar e dimensionar o vaso e os equipamentos de agitação e arejamento, de forma a promover uma homogeneização eficiente da suspensão celular.

É fundamental que o estabelecimento de um adequado coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio permita uma adequada transferência de massa, com valores de arejamento e agitação adequados a uma boa homogeneização, sem sedimentação celular e em que seja mantida elevada viabilidade celular ao longo do crescimento.

**O reactor agitado mecanicamente** é um dos sistemas mais usados na indústria, particularmente estudado e aplicado em produções biotecnológicas a partir de culturas microbianas. Tem sido igualmente, utilizado nas culturas celulares vegetais.

Estas suspensões celulares, quando são homogéneas ou com pequenos agregados (<25 células) têm um comportamento similar ao das culturas microbianas, o que tem possibilitado a validação de modelos teóricos de crescimento microbiano, assim como da tecnologia e equipamentos disponíveis para microrganismos. O modelo de Monod é um dos modelos que tem sido validado para diferentes tipos de culturas vegetais (Raposo, 2003).

A aplicação deste tipo de reactor no cultivo industrial tem sido largamente referenciada (Tanaka, 1981, Hooker *et al.*, 1990; Konstas & Kinzios, 2003; Xie *et al.*, 2003, O'Kennedy *et al.*, 2003; Oniscu *et al.*, 2003).

Uma das principais vantagens deste reactor é a eficiente mistura e homogeneização das suspensões celulares, a eficácia na quebra das bolhas de ar, aumentando a oxigenação da cultura e a prevenção da formação de agregados celulares de grandes dimensões (Hooker *et al.*, 1990).

Na produção biológica, a partir de cultura de células vegetais tem sido utilizado diferentes configurações de reactor e de agitadores. A escolha da geometria do reactor e do tipo de agitador é condicionada por diferentes parâmetros, quer operacionais quer associados à cultura de células em suspensão:

- as características da suspensão celular, como a morfologia celular, o nível de agregação das células, a sensibilidade que as células apresentam às forças de tensão e as necessidades respiratórias da suspensão.
- as propriedades físicas do caldo fermentativo, como a viscosidade, densidade, e regime do fluido;
- a dimensão do tanque

Os agitadores normalmente usados nas fermentações são classificados em axiais e radiais, influenciando o fluxo de convecção produzido. No caso dos agitadores axiais, o fluxo do fluido é paralelo ao eixo do agitador, enquanto nos radiais os fluxos produzidos deslocam-se do agitador para as paredes laterais do reactor.

Neste capítulo, apenas faremos referência às turbinas de Rushton, agitadores radiais e aos agitadores em hélice, agitadores de fluxo axial, visto serem os mais utilizados no cultivo de células vegetais (Figura 12-5.).

As turbinas de Rushton (Figura 12-5.a) são agitadores radiais, que atingem velocidades de rotação moderadamente elevadas e baixa potência consumida. São recomendadas para aplicações em que é importante a combinação da dispersão de gás com a agitação intensa. Os agitadores em hélice (Figura 12-5.b) são pequenos agitadores de elevada velocidade, que promovem o movimento axial do fluido, mas não são apropriados para meios com elevada viscosidade. Habitualmente são usados em operações de pequena escala.

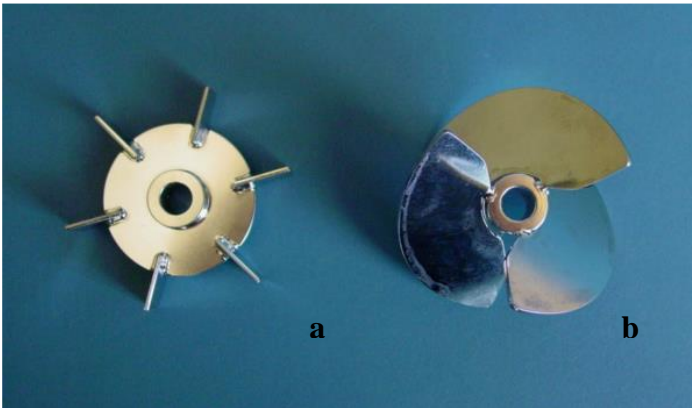


Figura 12-5. – Turbina de Rushton (a) e agitador em hélice (b).

Os dispersores de ar mais utilizados são os dispersores poroso e em L (Figura 12- 6.). O dispersor em L é perfurado na base e o dispersor poroso é constituído por um crivo metálico ou de poliuretano em que os diâmetros dos orifícios são variáveis de acordo com a dimensão das micro-bolhas de ar que se pretende difundir no seio da suspensão celular.

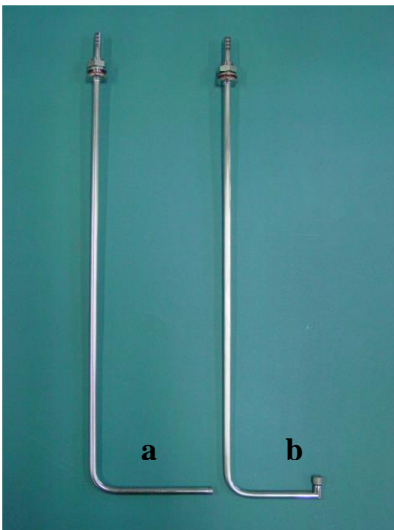


Figura 12- 6. – Dispersores de ar em forma de L (a) e poroso (b).

A formação de espuma é outra importante condicionante do processo e que se encontra relacionada com o caudal de arejamento, com a composição do meio nutriente e com a geometria do reactor. As bolhas de ar ao emergirem à superfície do meio, juntamente com compostos de elevada viscosidade que são excretados pelas células, como sendo polissacarídeos e/ou proteínas, formam uma espuma. Esta, forma uma estrutura mais ou menos densificada pela retenção das células, formando uma zona de elevada heterogeneidade e de difícil transferência de massa.

A formação de biofilmes aderentes às paredes dos vasos, às sondas e agitadores, existentes no seio do caldo fermentativo, são outro dos problemas do cultivo de células vegetais que tem de ser dimensionado.

Os parâmetros operacionais, caudal do arejamento e a velocidade de agitação da turbina podem afectar de forma determinante o crescimento das células vegetais no reactor, pelo que são variáveis fundamentais nas condições de produção.

O reactor *air-lift* tem sido muitas vezes utilizado em cultivo de células vegetais. A sua principal vantagem reside em provocar reduzidas forças de tensão na cultura de células associado ao facto de uma grande simplicidade de operação. Tem uma maior capacidade de manutenção de assepsia, ao longo do tempo de



produção, comparativamente com o reactor mecanicamente agitado. No entanto, a homogeneização da cultura pode ser insuficiente neste tipo de reactores quando se utiliza uma escala industrial ou pré-industrial.

Os reactores *air-lift* não são adequados para meios celulares de elevada densidade de biomassa, superiores a 30 g PS/L, visto a baixa eficiência de mistura neste tipo de reactor poder conduzir a limitações na homogeneização do meio e na transferência de oxigénio, essencial para uma boa resposta biológica do sistema e elevadas produtividades. Têm tido poucas utilizações à escala industrial, contudo existem referências de utilização de *air-lift* de 1000 L e 1500 L em processos em desenvolvimento (Tabela 12-1).

Foi desenvolvido por Curtis *et al.* (1999) um reactor em coluna, geometria similar a um reactor *air-lift*, em que é utilizado um vaso de plástico não esterilizável e descartável no final de cada utilização. O arejamento forçado no seio do reactor é realizado através de um dispersor acoplado a chicanas, localizadas à volta da superfície lateral do cilindro do vaso, assegurando a circulação do fluido e uma adequada homogeneização da cultura celular. Este reactor foi utilizada numa escala de 100 L com biomassa de cerca de 400g PF/L.

O desafio da inovação em reactor biológico para células vegetais é desenvolver um novo reactor em que seja possível minimizar o stresse nas células sem comprometer a homogeneização, a transferência de massa dos nutrientes e evitando a sedimentação celular.

O desenvolvimento de um **reactor de membrana** veio resolver problemas associados à reconhecida sensibilidade das células vegetais a elevado stresse hidrodinâmico. Como referido anteriormente, com o desenvolvimento da tecnologia membrana foi projectado um reactor por Lehmann *et al.* (1987) em que a homogeneização é promovida por um agitador equipado com uma membrana com microporos, enrolada ao eixo do agitador, de acordo com a figura 12-7. Esta membrana permite a difusão de pequenas bolhas de ar para o meio celular ao longo de toda a sua extensão, o que possibilita elevada intensificação do arejamento do meio.



Figura 12- 7. - Agitador com a membrana de silicone enrolada no eixo.

A agitação no reactor é realizada através de um magneto integrado na extremidade do agitador. O arejamento utilizando uma membrana com uma extensa área de difusão combinada com a agitação magnética garante uma mistura homogénea da cultura, com reduzido risco de causar danos celulares devido às forças de tensão exercidas sobre as células.

Embora seja necessário melhorar as condições da membrana utilizada, esta geometria de reactor mostrou ter um reduzido efeito na viabilidade celular das células em cultura de *C. calcitrapa* (Raposo, 2003), pelo que parece promissora a sua aplicação na obtenção de produtos vegetais em escala industrial.

Estabeleceu-se o crescimento da cultura de *Centaurea calcitrapa*, em sistema descontínuo, num reactor munido com uma membrana para arejamento (Raposo, 2003), agitado magneticamente a uma temperatura de 25 °C e com um inóculo de 30% (v/v).

Foi utilizada uma membrana de silicone com um comprimento de 440 cm e diâmetro de 0,37 cm enrolada num suporte metálico ligado ao eixo (Figura 12-7). Para diminuir a adesão celular à membrana foi deixado algum espaço entre as diferentes fiadas de membrana. A agitação definida foi de baixa velocidade, localizada entre valores de 30-60 rpm. Este sistema de agitação e arejamento garante uma adequada homogeneização da cultura e um reduzido stresse hidrodinâmico. Tanto o ar forçado introduzido no reactor como os gases à saída foram esterilizados pela passagem através de um filtro de membrana hidrofóbica com porosidade 0,2 µm. Foram utilizados sensores de oxigénio e de pH ligados a uma unidade digital de controlo.

## BIBLIOGRAFIA

- Böhme C, M.-B. Schröder & H. Jung-Heiliger (1997) Plant cell suspension culture in a bench-scale fermenter with a newly designed membrane stirrer for bubble-free aeration. *App. Microbiol. Biotechnol.* 48: 149–154.
- Curtis, W. R. & A. H. Emery (1993) Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 520 – 525.
- Curtis, W.R., F. Bacani, T. Hsiao, E. Carvalho, C. Scrubar (1999) Development and application of a low capital investment bioreactor. 217<sup>th</sup> ACS National Meeting, Division of Biochemical Technology. Paper N°157. Anaheim, California.
- Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A., and Vasil, I.K. (1976) Plant tissue culture media. *In Vitro* 12 473-478.
- Hooker, B. S., J. M. Lee & G. An (1990) Cultivation of plant cells in a stirred vessel: effect of impeller design. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 296 – 309.
- Hulst, A., M. Meyer, H. Breteler & J. Tramper (1989) Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 18-25.
- Jeffers, P., S. Raposo, M. E. Lima-Costa, P. Connolly, B. Glennon & P. M. Kieran (2003) Focussed beam reflectance measurement (FBRM) monitoring of particle size and morphology in suspension cultures of *Morinda citrifolia* and *Centaurea calcitrapa*. *Biotechnology Letters.* 25: 2023-2028.
- Keßler, M., J. G. ten Hoopen & S. Furusaki (1999) The effect of the aggregate size on the production of ajmalicine and tryptamine in *Catharanthus roseus* suspension culture. *Enzyme Microb. Technol.* 24: 308 – 315.
- Kieran, P. M., D. M. Malone & MacLoughlin (1993) Variation of aggregate size in plant cell suspension batch and semi-continuous cultures. *Trans IChemE.* 71: 40 – 46.
- Kieran, P.M. (2001) Plant Cell Suspension Cultures. Em *Multiphase Bioreactor Design*, editado por J.M.S. Cabral, M. Mota e J. Tramper, pp. 391-425. London and New York, Taylor & Francis.
- Konstas, J. & S. Kintzios (2003) Developing a scale-up system for the micropropagation of cucumber (*Cucumis sativus* L.): the effect of growth retardants, liquid culture and vessel size. *Plant Cell Reports.* 21: 538-548.
- Lehmann J, G. W. Piehl & R. Schulz (1987) Bubble free cell culture aeration with porous moving membrane. *Dev. Biol. Stand.* 66: 227–240.
- Lima-Costa, E., A.L. Martins, A. Duarte, J. Beltrão. (2002) Saline Stress and Cell Toxicity Evaluation, using Suspended Plant Cell Culture of Horticultural Crops in Bioreactor. *Acta Horticulturae* 573: 219-225
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 18: 100-127.
- Lloyd, G. and McCown, B. (1980). *Proceedings of the International Plant Propagators Society.* 30:421-427.
- MacLoughlin, P. F., D. M. Malone, J. T. Murtagh & P. M. Kieran (1998) The effects of turbulent jet flows on plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 58: 595 - 604

- Magnuson, N.S., P.M. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. HayGlass & J.M. Lee (1998) Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expr. Purif.* 13: 45 – 52.
- Mavituna, F. & J. M. Park (1987) Size distribution of plant cell aggregates in batch culture. *Chem. Eng. J.* **35**: B9 - B14.
- Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 15 473-497.
- O'Kennedy, R. D., J. M. Ward & E. Keshavarz-Moore (2003) Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37: 83-90.
- Oniscu, C., A. I. Galaction & D. Cascaval (2003) The characterization of mechanical mixing bioreactors efficiency. *Rev. Chim.* 54: 241-249.
- Owen H.R. and Miller A.R. (1992) An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations. *Plant Cell Tiss. Org. Cult* 28: 147-150.
- Piehl, G. W. , J. Berlin, C. Mollenschott & J. Lehmann (1988) Growth and alkaloid production of *Thalictrum rugosum* in shake flasks and membrane-stirrer reactors with bubble free aeration. *App. Microbiol. Biotechnol.* 29: 456–461.
- Tanaka, H. (1981) Technological problems in cultivation of plant cells at high density. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 1203 – 1218.
- Terashima, M., Y. Murai, M. Kawamura, S. Nakanishi, T. Stoltz, L. Chen, W. Drohan, R.L. Rodriguez & S. Katoh (1999a) Production of functional human  $\alpha_1$ -antitrypsin by plant cell culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 516 – 523.
- Terashima, M., Y. Ejiri, N. Hashikawa & H. Yoshida (1999b) Effect of osmotic pressure on human  $\alpha_1$ -antitrypsin production by plant cell culture. *Biochem. Eng. J.* 4: 31 – 36.
- Trejo-Tapia, G., A. Jiménez-Aparicio, L. Villarreal & M. Rodríguez-Monroy (2001) Broth rheology and morphological analysis of *Solanum chrysotrichum* cultivated in a stirred tank. *Biotechnol. Lett.* 23: 1943-1946
- Raposo, S. (2003) Caracterização reológica e hidrodinâmica de uma suspensão de células vegetais de *Centaurea calcitrapa* em reactor biológico. *Dissertação de doutoramento.* Universidade do Algarve. Portugal.
- Rodríguez-Monroy, M. & E. Galindo (1999) Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 687 – 693.
- Schenk, R. & A. Hildebrandt (1972) Medium techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 22: 55-64.
- Sehnke, P.C. & R.J. Ferl (1999) Processing of preproricin in transgenic tobacco. *Protein Expr. Purif.* 15: 188 – 195.
- Vanek, T., Soudek, P. & Tykva, R. (2001) Study of radiophytoremediation, *Minerva Biotec.* 13, 177-121.
- Xie, L. Z., C. Metallo, J. Warren, W. Pilbrough, J. Peltier, T. Zhong, L. Pikus, A. Yancy, J. Leung, J. G. Aunins & W. C. Zhou (2003) Large-scale propagation of a replication-defective adenovirus vector in stirred-tank bioreactor PER.C6 (TM) cell culture under sparging conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **83**: 45-52.
- Yokoyama, M. (1996) Industrial application of biotransformations using plant cell cultures. Em *Plant Cell Culture Secondary Metabolism – Toward Industrial Application.* (F. DiCosmo & M. Misawa, eds), CRC Press, 79 – 121.
- Zhong, J. J. (2002) Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 591-599.