

Reduzindo custos em biofábricas.

Teixeira, Silvio Lopes¹.

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense - CCTA / Laboratório de Fitotecnia - Av. Alberto Lamego, 2.000, CEP: 28015-180, Campos dos Goytacazes, RJ – Tel: (022) 2733-7828, e-mail: teixeira70@yahoo.com.br

Até onde é do conhecimento do autor, a idéia de se utilizar a cultura de tecidos vegetais como técnica comercial para propagação de plantas em larga escala, surgiu após a publicação do artigo “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures” por Murashige & Skoog (1962). Pouco depois desta data já surgiam os primeiros laboratórios comerciais na região de Los Angeles, com a orientação do Dr. Toshio Murashige, então professor da Universidade da Califórnia – Riverside. Inicialmente, foram montados pequenos laboratórios, anexos a viveiros comerciais já existentes, com a finalidade de clonar espécies que oferecem dificuldades neste sentido, ou para as quais a cultura in vitro poderia ser mais vantajosa do que as técnicas convencionais de clonagem, como é o caso de orquídeas, samambaias e outras plantas ornamentais. Em pouco tempo aumentava, tanto o número de laboratórios instalados, quanto o número de espécies clonadas comercialmente in vitro, além da difusão de tais laboratórios para outras regiões.

Inicialmente, os laboratórios instalados com esta finalidade apresentavam estrutura simples, constituindo cópias dos laboratórios de pesquisa das universidades, utilizando utensílios e equipamentos típicos de laboratórios de pesquisa, tais como erlenmeyers, beckers, agitadores magnéticos, além de outros de custo elevado e sensíveis a manuseio por pessoal não habilitado. Com a instalação de laboratórios de maior capacidade, resultou na necessidade da sua sofisticação, devido ao aumento dos riscos de contaminação e a necessidade de uma estrutura e metodologias mais aprimoradas, que permitam maior controle da assepsia. E esta necessidade aumentou à medida que os laboratórios comerciais evoluíram para instalações de grande porte, hoje denominadas “biofábricas”, algumas produzindo até 20.000.000 de plantas por ano, ou mais. Com isto resultou o aumento dos custos e a necessidade de medidas visando a sua redução.

As primeiras iniciativas visando a redução de custos nos laboratórios comerciais já eram vistas nos primeiros laboratórios montados na região de Los Angeles. Um destes laboratórios, visitados pelo autor, na década de 70, já utilizava utensílios de cozinha, de aço inoxidável, no lugar de erlenmeyers e beckers, bem como frascos de conserva de 250 mL como frascos de cultura, em substituição aos tubos de ensaio e erlenmeyers utilizados na época com esta finalidade, além de um misturador comum de restaurante, em substituição ao agitador magnético. Este mesmo laboratório já procurava aumentar o rendimento da mão de obra, fazendo o enchimento dos frascos de cultura com um pequeno dispensador comercial de líquidos, que dosava mecanicamente a quantidade de meio de cultura a ser vertido em cada frasco, dotado de uma extensão que permitia encher até 5 frascos por vez. Em outro laboratório, de maior porte, uma casa de vegetação foi transformada em sala de crescimento, resfriada com aparelhos de ar condicionado. Esta foi certamente a primeira iniciativa destinada a utilizar a energia solar em substituição à luz artificial na sala de crescimento. Desde então, muitas outras modificações vêm sendo adicionadas, algumas delas no sentido da redução de custos e outras visando melhorar a qualidade do produto final.

A redução de custos é essencial para se produzir plantas a custo competitivo com as técnicas convencionais. Mas é preciso que as medidas adotadas neste sentido não resultem em prejuízo à qualidade do produto final e nem resultem em aumento dos riscos de contaminação, já que as perdas por esta causa concorrem para o aumento dos custos.

Devido ao custo elevado de produção nas biofábricas, a maioria das espécies produzidas com esta técnica e destinadas à venda direta ao consumidor final, tem sido de plantas ornamentais, em razão do valor mais elevado deste produto no mercado, se

comparado com plantas produtoras de alimento. Dentre estas últimas, apenas algumas podem ser clonadas economicamente em biofábricas, em razão de características especiais que envolvem as suas técnicas culturais, como é o caso da banana, morango e batata inglesa. Destas, a banana é a única espécie cujos propágulos provenientes da biofábrica podem ser utilizados com vantagem econômica, diretamente para a formação de plantios comerciais. Devido ao problema de patógenos sistêmicos que afetam as duas outras espécies e que reduzem drasticamente a sua produtividade, elas precisam obrigatoriamente ser clonadas in vitro, após terem sido submetidas a limpeza clonal, sendo, os propágulos-matrizes provenientes da biofábrica, utilizados para a formação de viveiros conduzidos sob condições controladas, os quais fornecerão propágulos livres de patógenos sistêmicos, a serem empregados nos plantios comerciais. Desta forma, o custo mais elevado dos propágulos provenientes da biofábrica se dilui pelos propágulos produzidos no viveiro e não afeta significativamente os custos de produção do produto final.

A introdução contínua de novos procedimentos de propagação in vitro, novos equipamentos, novos utensílios e outros artifícios, vêm permitindo o aumento também contínuo do número de espécies que se tornam aptas a serem clonadas mais economicamente nas biofábricas. Assim, a clonagem de eucalipto em biofábricas por empresas florestais já é uma realidade, através de um artifício que utiliza propágulos provenientes de biofábricas, para a formação de mini-matrizes em viveiros, que por sua vez fornecerão as mini-estacas para enraizamento e produção de mudas para os plantios comerciais.

Para a redução de custos nas biofábricas, a primeira medida a adotar é o cuidado com a localização e o desenho da instalação. Qualquer erro cometido nesta fase, poderá resultar em prejuízos permanentes. Uma instalação propriamente localizada e desenhada adequadamente resulta em menores riscos de contaminação, menor custo com energia e melhor rendimento das operações (Bridgen & Bertok, 1997). Por exemplo, o clima da região pode afetar sensivelmente os gastos com a energia necessária para o resfriamento ou aquecimento da sala de cultura. Segundo Ahloowalia & Prakash (2004), em Nova Delhi, onde as temperaturas do verão são elevadas, o custo com energia, numa biofábrica produzindo 5.000.000 de plantas por ano, é de US\$ 0,80 por mil plantas, enquanto nas regiões de Bangalore e Prune, com clima mais ameno, este custo é de US\$ 0,30. Por isso, das 76 biofábricas da Índia, 52 se localizam em Bangalore e Prune, e apenas 24 em Nova Delhi.

Uma biofábrica instalada em local onde o ar ambiente seja rico em poeira, substâncias químicas, microorganismos e outros contaminantes pode exigir medidas especiais para contornar o problema, o que acarreta gastos extras na construção e manutenção e, conseqüentemente, aumento dos custos.

O desenho da instalação deve levar em conta a separação das atividades do laboratório em salas separadas, de modo a constituir diferentes ambientes dentro da instalação, quanto ao nível de assepsia desejado, ou seja, uma zona com índice elevado de assepsia, formada pela "sala de transferência" e "sala de crescimento", onde as condições de assepsia são mais rígidas. Uma zona de mediana assepsia, formada pelas salas de preparo e esterilização de meio de cultura e depósito de vidraria limpa. Uma zona ordinária, com nível de assepsia normal, formada pelas demais salas, como sala de limpeza, banheiro, escritório, almoxarifado e área de expedição. Na sala de transferência, a mais exigente em cuidados, é recomendável a instalação de um sistema de pressão positiva. A adoção de energia solar para iluminação da sala de crescimento exige que esta sala se destaque das demais na planta, devendo assim, também ter o seu sistema de pressão positiva.

As operações do laboratório devem se dispor de modo a evitar caminhadas longas e excessivo movimento de pessoas. Isto se consegue dispondo, em ordem, as salas de limpeza, de preparo de meio, de transferência, e de crescimento. É recomendável que as zonas mais assépticas fiquem separadas da zona ordinária por uma porta. As salas de transferência e de crescimento devem ter visores de vidro, para reduzir a entrada de visitantes a estas salas. Ambas salas não devem ter passagem através delas. O banheiro deve se situar logo à entrada da instalação e possuir chuveiros e vestiário, para troca de

roupa e calçados pelos operários logo na entrada. A estrutura se completaria com a instalação de um gerador de emergência, para suprir eventuais cortes de energia pelo menos para a sala de crescimento.

O conjunto destas medidas resulta no desenho de uma estrutura equilibrada, com redução das caminhadas pelos operários dentro do laboratório e um controle eficiente da contaminação, resultando em redução de custos. A não adoção destes cuidados poderá resultar numa estrutura defeituosa e sujeita a perdas irremediáveis e permanentes, com reflexo negativo no custo de produção.

Outras medidas podem ser tomadas com a finalidade de redução de custos, mas vão depender da escala de produção. A automação das operações, com a finalidade de aumentar a escala de produção, tem sido testada mas não tem sido considerada econômica.

De acordo com o Dr. Pedro Orellana, da Universidade de Las Villas, em Cuba (informação pessoal), tem-se considerado como mais econômicas naquele país, biofábricas com capacidade de produção entre 4.000.000 e 5.000.000 de plantas por ano.

Ahloowalia & Prakash (2004) relatam a existência de uma biofábrica na Índia, resultante da transformação de uma casa de três quartos, em laboratório, com a adoção das medidas adequadas de redução de custos, que produz economicamente cerca de 2.500.000 plantas por ano.

A substituição de componentes mais purificados do meio de cultura, por outros com menor grau de pureza, pode constituir uma boa medida para redução de custos numa produção em larga escala. Uma mistura de amido de mandioca + amido de batata + semolina, na proporção de 2 : 1:1 é citado como substituto barato para o Agar (Prakash et al, 2004). Zimmerman (1995) e Stanley (1995) relatam que amido de milho + “Gelrite” na proporção de 50g + 0,5g respectivamente, substituíram vantajosamente o Agar para o cultivo de maçã, pêra, banana, cana-de-açúcar, gengibre e outras espécies. Outros autores relataram o uso do amido de mandioca, de milho e outros, com bons resultados. Melhor ainda seria substituir qualquer agente gelificante por meio líquido. Segundo Prakash et al (2004), o custo do litro de meio de cultura varia em torno de US\$0,18 para meio sólido e US\$0,08 para meio líquido. Os mesmos autores relatam o uso de fibra de algodão no Paquistão e Bangladesh, como suporte em meio líquido para banana, orquídea, crisântemo e batata, tendo a orquídea e banana crescido muito mais rapidamente do que em Agar. Esta é uma substituição altamente vantajosa, já que o Agar tem custo elevado e ainda complica o preparo do meio de cultura, pela necessidade de aquecimento para sua fusão. Outros produtos, como lã de vidro, blocos de espuma de polystireno e outros (Bhattacharya et al, 1994) têm sido usados com sucesso como suporte para a cultura em meio líquido (Prakash et al, 2004), para eliminação do Agar. Já utilizamos blocos de espuma de polystireno com sucesso para a cultura de bromélia.

Outro componente de custo elevado e que se usa em grande quantidade, a sacarose PA, tem sido substituída sem problemas por açúcar refinado, em culturas-estoque das mais diversas espécies, no laboratório de cultura de tecidos da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

A água dessalinizada em laboratório tem sido substituída por água de chuva e até mesmo água potável doméstica (Ganapathi et al, 1995; Sharma & Sing, 1995). Em ambos os casos são necessários alguns cuidados na utilização de água destas origens. O emprego de água simplesmente deionizada tem sido usado no laboratório de cultura de tecidos da UENF e funciona perfeitamente, a um custo muito mais baixo do que a destilada.

O protocolo de preparação do meio de cultura é outro fator a considerar, quando o objetivo é reduzir custos. A preparação de grandes volumes de meio de cultura para uso em dias sucessivos não é recomendável, principalmente quando envolve componentes de rápida decomposição, como certos reguladores de crescimento. Pior ainda é armazenar meio de cultura ainda não esterilizado, por período superior a 24 horas. O ideal é a preparação de soluções-estoque concentradas, com todos os componentes, em quantidade que permita o preparo de cinco ou mais litros de meio de cultura, embala-las em sacos

plásticos e congela-las, para uso subsequente. Com esta medida se economiza tempo e mão de obra no preparo dos meios.

Os frascos de cultura hoje existentes abrangem diversos tipos, variando quanto ao volume, formato e material de fabricação. Dentre os mais baratos estão os frascos de conserva de vidro, de até 500 ml, sendo os de 250 ml com tampa de polipropileno, os mais usados. Apresentam a vantagem da durabilidade ilimitada, podendo ser autoclavados indefinidamente sem perda da transparência.

O recipiente denominado MagentaTM, muito usado em outros países, além de muito caro, o produto nacional permite contaminação através dos bordos da tampa, que precisam ser envolvidos por filme plástico, o que significa uma exigência extra de mão de obra; além disso, o recipiente perde a transparência com a sucessão de autoclavagens.

Recipientes descartáveis do tipo saco plástico flexíveis, semi-permeáveis a gases, de baixo custo, vêm sendo desenvolvidos atualmente (Ahloowalia, 1995, 1999; Tanaka et al, 1988, 1991), e permitem boa redução de custos, mas ainda não usados no Brasil. São sacos plásticos de 10 x 15 cm), que já vêm esterilizados da indústria e são fechados com uma seladora de sacos plásticos. Assim, não precisam de tampa e podem ficar pendurados, dispensando as tradicionais prateleiras de custo elevado.

Segundo Prakash et al (2004), o emprego de ingredientes e recipientes de baixo custo pode reduzir de 50 a 90% o custo do meio de cultura.

Em países com mão de obra barata como o Brasil, a lavagem dos frascos de cultura e outros recipientes de vidro pode ser feita de maneira mais econômica do que em máquinas de lavar ou instalações automáticas, apenas improvisando uma lavadora consistindo em uma escova adaptada a um pequeno motor elétrico.

O emprego de biorreatores em substituição a outros tipos de frascos de cultura é uma alternativa que promete reduzir substancialmente os custos. Dentre os diferentes tipos de biorreatores, destaca-se o SIT - Sistema de Imersão Temporal, que além de usar meio líquido, o material vegetal não permanece em contato permanente com o meio de cultura, reduzindo assim o problema freqüente de hiperhidricidade, sendo banhado com a solução nutritiva periodicamente, além de fazer a troca periódica da atmosfera do frasco. Tudo isto resulta em melhor crescimento e multiplicação da plantas, além da formação de plantas com anatomia, morfologia e metabolismo mais normais, capazes de sobreviver melhor às condições ex-vitro, sem a necessidade de longo período de aclimatização. Todavia, o seu emprego exige cuidados especiais quanto ao manuseio, para evitar contaminação, o que resulta na necessidade de operários bem treinados. Este fator, associado ao custo elevado dos recipientes, bem como o custo elevado da autoclavagem dos mesmos, tem limitado o seu emprego.

A substituição da autoclavagem por outra técnica de esterilização do meio de cultura permitiria uma economia substancial, já que autoclavagem é uma técnica de custo elevado. Teixeira et al (2006) mostraram a possibilidade de se esterilizar o meio de cultura com hipoclorito de sódio, utilizando um novo protocolo de preparo do meio. O protocolo já foi usado para diversas espécies, como eucalipto, fáfia, sequóia, abacaxi e outras, sem inconvenientes. A taxa de multiplicação e a produção de biomassa do abacaxi no meio esterilizado quimicamente foram duas e meia vezes superiores às do meio autoclavado. Além disso, foi evidenciado que microorganismos contaminantes das culturas-estoque de onde provieram os explantes, ou que caíram dentro dos frascos de cultura no momento da inoculação dos explantes, não sobreviveram às condições do meio esterilizado com hipoclorito de sódio. Assim, a economia com a eliminação da autoclavagem, o maior rendimento da mão de obra para preparação do meio de cultura e a redução da taxa de contaminação resultam em substancial redução dos custos. Em Cuba também se utiliza a esterilização química com uma mistura de dois produtos patenteados.

Um novo conceito em micropropagação que vem sendo desenvolvido ultimamente, é o SCTF - Sistema de Cultura de Tecidos Fotoautotrófico (FTCS - Fotoautotrophic Tissue Culture System), no qual as culturas se desenvolvem em meio nutritivo isento de sacarose e ambiente in-vitro enriquecido com dióxido de carbono. O Sistema permite a utilização de frascos de cultura mais volumosos, meio de cultura mais simples e barato, taxa de

multiplicação mais elevada, além de ser menos sujeito a contaminação e produzir plantas já adaptadas ao ambiente ex-vitro, tudo isto resultando em custos mais baixos. Segundo Prakash et al (2004), com a eliminação da sacarose, o custo do litro de meio de cultura se reduz para US\$0,13 para meio sólido e US\$0,03 para meio líquido.

O gasto com a iluminação artificial da sala de crescimento é um dos mais elevados da biofábrica, além de produzir plantas com morfologia, anatomia e metabolismo alterados (Ahloowalia & Savangikar, 2004), o que as torna frágeis quanto à adaptação ao ambiente ex-vitro, podendo resultar na sua morte ou na exigência de cerca de duas semanas de aclimatização na casa de vegetação. Assim, o emprego da iluminação solar na sala de crescimento é outra medida já consagrada, que reduz os gastos com energia e produz plantas já adaptadas às condições ex-vitro, resultando em maior porcentagem de sobrevivência e redução de mão de obra e de tempo de permanência das plantas na casa de vegetação durante a fase de aclimatização. A opção mais barata para uso da luz solar consiste em se destacar a sala de crescimento do restante do corpo da biofábrica e posiciona-la de tal forma que suas paredes e teto, que são de vidro, formem sempre um ângulo com os raios solares em qualquer parte do dia. Esta alternativa vem sendo usada com sucesso em biofábricas cubanas (Baezas-Lopez, 1995). Uma alternativa menos sofisticada, usada na Índia (Ahloowalia & Savangikar, 2004), para cultura em pequena escala, tem sido o cultivo nos já referidos sacos plásticos especiais, de polypropileno, pendurados na casa de vegetação. Todavia, esta alternativa depende de temperatura ambiente amena e homogênea durante o dia, já que nenhum controle artificial é feito, exceto pelo uso de cortinas, visando evitar a incidência direta da luz solar nos sacos. Alternativa semelhante tem sido tradicionalmente usada no Brasil pelos orquidófilos amadores, com resultados satisfatórios, mantendo os frascos de cultura em telados ou ripados, ou ainda dentro de casa, em cômodos bem iluminados com luz indireta. Economia adicional com energia pode ser conseguida projetando janelas de vidro amplas nos vários cômodos da biofábrica, o que permite dispensar a necessidade de lâmpadas acesas durante boa parte do dia e do ano.

Outro fator a considerar, visando redução de custos, é o gasto com mão-de-obra. Considera-se como boa produtividade do operador na capela de fluxo laminar, 2.500 transferências por dia. Em condições excepcionais, este rendimento pode atingir 5.000 transferências por dia (Ahloowalia & Savangikar, 2004). Utilizando a combinação da fase de multiplicação em biorreator e as fases finais em sacos plásticos, bem como o manuseio mecanizado dos propágulos, alternativas ainda não comumente usadas no Brasil, pode-se reduzir entre 50% e 75% os custos com os trabalhos na capela de fluxo laminar (Savangikar et al, 2002). O uso de música ambiente e a limitação do tempo de trabalho do operador na capela de fluxo laminar para 4 horas diárias aumentam o rendimento do operador. No tempo restante do dia, o operador seria direcionado para outras atividades. Considera-se, também, que o trabalho de mulheres apresenta maior rendimento na sala de transferência e no transplante das plântulas para os vasos na casa de vegetação.

Finalmente, o treinamento adequado dos funcionários e o envolvimento de um especialista bem qualificado no gerenciamento do empreendimento podem, à primeira vista, significar elevação de custos. Contudo, falhas de planejamento, de gerenciamento e procedimentos inadequados podem resultar em grandes perdas por contaminação e por outros motivos. Assim, o não investimento neste sentido, pode resultar em repetidos insucessos, que acabarão por inviabilizar o negócio a longo prazo, com resultados tanto mais desastrosos quanto maior for o volume da produção.

REFERÊNCIAS

AHLOOWALIA, B.S. Waston module – A new system of plant micropropagation. **Biolink**, v. 2, p. 17, 1995.

AHLOOWALIA, B.S. Production of mini-seed tubers using a modular system of plant micropropagation. **Potato Res.**, v. 42, p. 569-575, 1999.

AHLOOWALIA, B.S.; PRAKASH, J. Physical components of tissue culture technology. In: **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. Vienna: IAEA, 2004. p. 17-28.

ALOOWALIA, B.S.; SAVANGIKAR, V.A. Low cost options for energy and labour. In: **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. Vienna: IAEA, 2004. p. 17-28.

BAEZAS-LOPEZ, P. Cubans enlist the sun in virus-free propagation. **Ceres**, v. 156, p. 15-16, 1995.

BHATTACHARYA, P., DEY, S.; BHATTACHARYA, B.C. Use of low-cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant tissue culture. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 37, p. 115-123. 1994.

BRIDGEN, M.P.; BERTOK JR, J.W. Designing a plant micropropagation laboratory. **Proc. Intern. Plant Propagators Soc.**, v. 37, p. 462-467, 1997.

GANAPATHI, T.R., MOHAN, J.S.S., SUPRASANNA, P., BAPAT, V.A.; RAO, P.S. A low-cost strategy for *in vitro* propagation of banana. **Current Science**, v. 68, p. 646-665, 1995.

MURAHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PRAKASH, S., HOQUE, M.I.; BRINKS, T. Culture media and containers. In: **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. Vienna: IAEA, 2004. p. 17-28.

SAVANGIKAR, V.A., SAVANGIKAR, C., DAGA, R.S.; PATHAK, S. Reduction in cost in micropropagation: Achievements and further prospects. **Ist International symp. liquid system for *in vitro* mass propagation of plants**, 29 May-2 June 2002. Agricultural Univ. Norway. Norway. 2002.

SHARMA, T.R.; SINGH, B.M. Simple and cost-effective medium for propagation of ginger (*Zingiber officinale*). **Indian J. Agricult. Sciences**, v. 65, p. 506-508, 1995.

TANAKA, M., HIRANO, T., GOI, M., HIGASHIURA, T., SASAHARA, H.; MURASAKI, K. Practical application of a novel disposable film culture vessel in micropropagation. **Acta Hort.**, v. 300, p. 77-84, 1991.

TANAKA, M., JINNO, K., GOI, M.; HIGASHIURA, T. The use of disposable fluorocarbon polymer film culture vessel in micropropagation. **Acta Hort.**, v. 230, p. 73-80, 1988.

TEIXEIRA, S.L., RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, v. 86, p. 375-378, 2006.

ZIMMERMAN, R.H. Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 43, p. 207-213, 1995.

PALAVRAS-CHAVE:
biofábrica, planejamento, estrutura, administração.