

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Rafael Carinha de Campos

**Estabelecimento da validade de um meio de cultura em cultivo
vegetal**

**São Paulo
2022**

Rafael Carinha de Campos

Estabelecimento da validade de um meio de cultura em cultivo vegetal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em. Processos Industriais: Desenvolvimento e Otimização de Processos Industriais.

Data da aprovação ____/____/____

Prof.^a Dr.^a Rosane A. M. Piccoli (Orientadora)
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Membros da Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Rosane A. M. Piccoli (Orientadora)
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Prof. Dr. Kleber Lanigra Guimarães (Membro)
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Prof. Dr. Marcos Henrique Luciano Silveira (Membro)
ChemnNova - Inovação para Novos Negócios

Rafael Carinha de Campos

Estabelecimento da validade de um meio de cultura em cultivo vegetal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Processos Industriais.

Área de Concentração: Desenvolvimento e Otimização de Processos Industriais.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosane A. M. Piccoli

São Paulo
Jan./2022

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Departamento de Acervo e Informação Tecnológica – DAIT
do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT

C198e	<p>Campos, Rafael Carinha de Estabelecimento da validade de um meio de cultura em cultivo vegetal. / Rafael Carinha de Campos. São Paulo, 2022. 62p.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Processos Industriais) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. Área de concentração: Desenvolvimento e Otimização de Processos Industriais.</p> <p>Orientador: Prof.^ª Dr.^ª Rosane A. M. Piccoli</p> <p>1. Prazo de validade 2. Meio de cultura 3. Controle de qualidade 4. Tese I. Piccoli, Rosane A. M., orient. II. IPT. Unidade de Negócios de Ensino Tecnológico III. Título</p>
2022-08	CDU 66.02(043)

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado às pessoas que estiveram ao meu lado ao longo de toda a vida: a meus pais, José Deodato Pereira de Campos e Maria Cristina Carinha de Campos, e à minha irmã, Daniele Carinha de Campos.

À minha esposa, Rosana Claudia Ferreira de Campos, e à minha filha Alice Ferreira Carinha de Campos, que não mediram esforços para me darem apoio e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Centro de Tecnologia Canavieira - CTC, e a toda a equipe técnica do projeto "Sementes Artificiais": Suleiman Hassuani, César Bueno, Debora Domiciano, Jussara Pereira, Geraldo Filipe, Celso Coaresma, Willian Jonas, Eder Chagas, pois foram pessoas que contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho.

Também agradeço ao grupo de professores do IPT, em especial, à Rosane Aparecida Moniz Piccoli, minha orientadora, por toda paciência e atenção.

RESUMO

Os meios de culturas são soluções químicas amplamente usadas para a realização de análises laboratoriais e a entrega de nutrientes fornecido pelo meio de cultura é um elemento crítico e fundamental na cultura de células vegetais, podendo ser utilizados para diversas finalidades. Atualmente utiliza-se o prazo de validade de 60 dias para os meios de cultura de células vegetais, porém sem nenhum critério. Este trabalho tem como objetivo propor a extensão do prazo de validade que hoje é 60 dias para 90 dias, através da aplicação de metodologia específica. Essa metodologia contemplou: i) Análise ao longo de 0, 30, 60 e 90 dias dos principais compostos presentes no meio de cultura: Maltose; Manitol e 2,4D; medidas do pH; Nitrato; Promoção do crescimento; Esterilidade; e Análise Visual; ii) Armazenamento do meio 1493 em três diferentes condições distintas. Os resultados experimentais foram analisados estatisticamente para um nível de precisão de 95%. Análise estatística realizada pelo software Minitab mostraram que os dados de pH, nitrato, PC e PC2, para 90 dias de armazenamento foram reprovados estatisticamente nas três diferentes condições de armazenamento, enquanto os dados de maltose, manitol e 2,4D foram aprovados em maior parte. No entanto, a exposição do material vegetal ao meio 1493 com 90 dias de armazenamento apresentou multiplicação como esperado para meios frescos e resultou numa taxa de germinação de 79%. Concluiu-se a necessidade da inclusão da taxa de germinação como parâmetro da metodologia aplicada, bem como a continuidade do estudo para a validação dos parâmetros avaliados. Portanto, recomenda-se a extensão do prazo de validade do meio de cultura 1493 de 60 para 90 dias, bem como a adoção da metodologia para outros meios de cultura. Essa possibilidade de extensão da validade do meio de cultura 1493 implicará em considerável redução de custos e perdas no processo.

Palavras-chave: Controle de qualidade; estabilidade; meio de cultura; prazo de validade.

ABSTRACT

Application of the validity of a culture medium in vegetable cultivation

Solutions are widely used for carrying out nutrient cultures by the culture medium are a critical element of delivery and can be used for a variety of purposes. Currently, the validity period of 60 days is used for plant cell culture media, but without any criteria. This work aims to propose the extension of the validity period that today is 60 days to 90 days, through the application of specific methodology. This methodology included: i) Analysis over 0, 30, 60 and 90 days of the main components presented in the culture medium: Maltose; Mannitol and 2,4D; pH measurements; Nitrate; Promoting growth; Sterility; and Visual Analysis; ii) reserve of the 1493 medium under three different conditions. Experimental results were statistically analyzed to a 95% accuracy level. Statistical analysis by Minitab software 90 days of data for pH, nitrate and PC2 storage, for 2, for 2, for 3.5% of pH, nitrate and PC2 data were mostly approved. However, exposure of plant material to 1493 medium with 90 days of storage presented as expected for fresh media and multiplied at a germination rate of 79%. The need to include the definition as an applied parameter is concluded, as well as the methodology of the study methodology for the validation of the evaluation parameters. Therefore, it is recommended to extend the shelf life of culture medium 1493 from 60 to 90 days, as well as adopting the methodology for other culture mediums. This possibility of extending the validity of the culture medium will imply a reduction in costs and losses in the process.

Keywords: Quality control; stability; culture medium; expiration date

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma das atividades realizadas.	21
Figura 2 - Concentração de maltose ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro.	28
Figura 3 - Concentração de manitol ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro.	28
Figura 4 - Concentração de 2,4 - D ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro.	29
Figura 5 - Concentração de nitrato ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro.	29
Figura 6 - Medidas de pH ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro.	30
Figura 7 - Taxa de multiplicação da célula vegetal ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro.	30
Figura 8 - Taxa de multiplicação da célula vegetal ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro.	31
Figura 9 - Concentrações de maltose ao longo do tempo, armazenados na condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	33
Figura 10 - Concentrações de glicose ao longo do tempo, armazenados na condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	34

Figura 11 - Concentrações de manitol ao longo do tempo, armazenados na condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	35
Figura 12 - Concentrações de 2,4D ao longo do tempo, armazenados na condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	36
Figura 13 - Concentrações de nitrato ao longo do tempo, armazenados na condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	37
Figura 14 - Valores de pH ao longo do tempo, armazenados na condição de condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	38
Figura 15 - Concentrações de maltose ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	39
Figura 16 - Concentrações de glicose ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	40
Figura 17 - Concentrações de manitol ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	41
Figura 18 - Concentrações de 2,4D ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	42
Figura 19 - Concentrações de nitrato ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	43
Figura 20 - Valores de pH ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	44
Figura 21 - Concentrações de maltose ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	45
Figura 22 - Concentrações de glicose ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	46
Figura 23 - Concentrações de manitol ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	47
Figura 24 - Concentrações de 2,4D ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	48
Figura 25 - Concentrações de nitrato ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo <i>software</i> MINITAB.	49
Figura 26 - Valores de pH ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.	50

Figura 27 - No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC), utilizado gráfico de dispersão pelo <i>software</i> MINITAB, com 30 dias de armazenamento do meio de cultura.	51
Figura 28 - No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC_2), utilizado gráfico de dispersão pelo <i>software</i> MINITAB, com 30 dias de armazenamento.	52
Figura 29 - No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC), utilizado gráfico de dispersão pelo <i>software</i> MINITAB, com 60 dias de armazenamento.	53
Figura 30 - No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC_2), utilizado gráfico de dispersão pelo <i>software</i> MINITAB, com 60 dias de armazenamento.	54
Figura 31 - No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC), utilizado gráfico de dispersão pelo <i>software</i> MINITAB, com 90 dias de armazenamento do meio de cultura.	55
Figura 32 - No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC_2), utilizado gráfico de dispersão pelo <i>software</i> MINITAB, com 90 dias de armazenamento.	56
Figura 33 - Imagem referente às plantas multiplicadas no meio de cultura com 60 dias de armazenamento.	57
Figura 34 - Imagem referente às plantas multiplicadas no meio de cultura com 90 dias de armazenamento	58
Figura 35 - No eixo (y) tem-se a porcentagem de germinação e no eixo (x) os dias de armazenamento, mostrando que em ambas as condições armazenadas as taxas de germinação estão acima de 70%.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição geral de meios de cultivo de células vegetais dissolvidos em água.	16
Tabela 2 - Reguladores de crescimento e citocininas mais utilizados em meio de cultura para células vegetais.	18
Tabela 3 - Dados experimentais obtidos pela análise estatística (MINITAB).	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 O meio de cultura no cultivo vegetal	16
3.2 Sistema de validação de meio de cultura.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Elaboração do protocolo de estudo de estabilidade para meios de cultura	20
4.2 Planos de estudo de Estabilidade do meio de cultura.....	20
4.3 Análises quantitativas dos analitos	21
4.4 Teste de promoção de crescimento	22
4.7 Plano de estudo para armazenamento de temperatura ambiente com luz e temperatura ambiente no escuro (estabilidade acelerada)	22
4.8 Plano de estudo para armazenamento em sala de 18 a 20°C.....	23
4.9 Plano de estudo para confirmação do prazo de validade do meio de cultura	23
4.10 Critérios estatísticos de Avaliação e aceitação	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
6 CONCLUSÕES	59
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

A produção de cana-de-açúcar em 2020 foi estimada em 677,9 milhões de toneladas, de acordo com dado publicado no terceiro prognóstico para a safra pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (NOVACANA, 2020). Em relação ao ano de 2019, as estimativas de produção apresentam acréscimo de 1,6%, com queda de 0,3% na área destinada à colheita, e aumento de 1,9% no rendimento médio.

O Mato Grosso do Sul, quarto maior produtor de cana-de-açúcar no Brasil (7,1% do total), apresentou a principal alteração na produção em dezembro, com uma redução de 22,4%. A mudança foi explicada pela queda de produtividade dos canaviais atingidos pela falta de chuvas. Já São Paulo, o maior produtor (52,0% do total), teve um crescimento de 2,7% na produção em relação a 2019 (Idem).

Com a finalidade de suportar esses números, atualmente o Brasil possui inúmeras empresas focadas no melhoramento e desenvolvimento genético de cana de açúcar com o objetivo de selecionar variedades que proporcionem bons desempenhos de produção no setor sucroenergético, a exemplo da Embrapa, situada em diversos estados brasileiros, e do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). O setor do plantio de cana de açúcar tem utilizado, há anos, a técnica de propagação vegetativa (DILLEWIJN, 1952), a qual apresenta ineficiências tanto no nível da preparação do solo – uso de grandes máquinas, que causam compactação, levando ao endurecimento de solo, como em relação ao uso de novas tecnologias, a exemplo de baixas taxas de inclusão de novos materiais genéticos escolhidos por programas científicos de estudo e melhoramento.

Frente a esse quadro, uma outra opção seria a técnica de cultivo celular, a qual compreende o processo por que as células são cultivadas em condições de ambientes monitorados e controlados, comumente fora de seu ambiente natural (SNYMAN, 2011). Esses ambientes controlados podem variar para cada tipo de estrutura celular mas, geralmente, consistem em um recipiente apropriado ou em um reator com meio de cultura que provêm nutrientes essenciais, como: hormônio; carboidratos; vitaminas; minerais; fatores de crescimento; aminoácidos e gases a exemplo do oxigênio e gás carbônico, e regulam o ambiente físico-químico.

Segundo, ainda, o autor, a multiplicação celular *in vitro* é uma tecnologia validada, além de que, com a utilização da técnica de embriogênese somática para o

cultivo vegetal de cana de açúcar, tem-se a possibilidade de obter embriões diretamente de uma única célula (DENCHEV, 1992).

Contudo, o processo de multiplicação *in vitro* é extremamente dependente do meio de cultura, composto por soluções químicas usadas para a realização de análises laboratoriais que dispõem, na sua composição, de nutrientes e outras substâncias que provêm as condições necessárias para que as células inoculadas se multipliquem em um meio artificial (PERES; FIEGENBAUM; TASCA, 2007).

Nestes termos, para um resultado final efetivo com relação à propagação do explante em grande escala deve-se atentar a três complexidades: (1) Fixação de explantes primários em cultura; (2) Desenvolvimento de meios ótimos de cultura e, às vezes, aperfeiçoamento do meio de cultura e condições ambientais para se atingir grandes taxa de multiplicação; (3) Indução de iniciação de raiz e aclimatação dos propágulos.

As receitas de meios de cultura variam e são utilizadas para diversas finalidades – atualmente, utiliza-se o prazo de validade de 60 dias para os mesmos, no entanto, nota-se que não há critério ou estudo de definição em relação ao seu prazo de validade. Ressalta-se, como fator de extrema relevância, o custo do meio de cultura, uma vez que se descarta o que excede o período de 60 dias.

Quanto à composição química do meio de cultura – objeto de estudo da pesquisa em pauta – importa verificar a estabilidade da mistura ao longo do tempo de avaliação, destacando-se: a caseína hidrolisada; o manitol; os sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); a prolina; a solução de vitamina Gamborg (GAMBORG, et al., 1968); a maltose; o ácido cítrico; a solução de sulfato de cobre; e o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D).

A escolha apropriada do meio de cultura para uso laboratorial é decisiva para os bons desempenho e desenvolvimento da célula vegetal, por isso deve-se compreender o efeito nutricional que ocorrerá na planta e acompanhar as etapas de produção, a fim de sustentar a obtenção de um produto com a qualidade, verificada a partir dos seguintes critérios: pesagem; formulação; hidratação; verificação do pH no preparo; aquecimento e homogeneização; filtro esterilização; e identificação com o nome, data de fabricação, data de validade bem como a condição de armazenamento e entrega do produto final.

Em grande parte dos meios de cultura a etapa de esterilização é efetuada utilizando-se a autoclave, um equipamento com a pressão controlada. A esterilização

por filtração (0,22 μm) é aconselhada para remoção de microrganismos em meios que sofrem alteração, com elevadas temperaturas e pressão. Uma vez preparadas, as amostras de meio de cultura devem ser submetidas e avaliadas junto ao controle de qualidade previamente ao seu uso. Entende-se como 'lote' uma quantidade definida de um produto terminado obtido em um único processo ou série de processos, cujas características essenciais são a homogeneidade e as quantidades dentro dos intervalos especificados.

São vários os parâmetros que podem ser analisados durante o controle de qualidade como, por exemplo: I) Análises de pH, pois regulam o ambiente onde a celular irá se desenvolver; II) Promoção de crescimento, que visa verificar se a taxa de multiplicação vegetal é satisfatória; III) Teste de esterilidade, que consiste no teste realizado para constatar microrganismos contaminantes em lotes que já sofreram tratamento esterilizante – ensaios microbiológicos realizados em amostras de um determinado lote checam a esterilidade de um produto; IV) Concentração de 2,4D, que indica se a quantidade de hormônio presente no meio de cultura será suficiente para evitar a germinação precoce e favorecer a multiplicação celular; V) Concentrações de maltose, manitol e nitrato, fontes de carbono e nitrogênio que irão nutrir a célula; VI) Teste visual, que tem como critério de aceitabilidade verificar a presença de qualquer precipitado ou algo estranho ao meio de cultura.

Esses parâmetros de controle de qualidade foram baseados no Guia para o Desenvolvimento de Estudo de Estabilidade de Produtos Farmacêuticos (2003), seguindo a normativa da Anvisa RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003. O protocolo mostrou-se adequado para o alcance dos objetivos propostos, possibilitando a análise do desempenho do meio de cultura através de vários parâmetros e a confirmação da data de validade para os meios utilizados no estudo como, por exemplo, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 210 (2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Em termos gerais objetivou-se estabelecer o prazo de validade do meio de cultura 1493 para a etapa de multiplicação celular e, assim, reduzir os custos atrelados ao descarte.

2.2 Objetivos específicos

Para tanto, foi realizado o estudo da estabilidade dos lotes de meio de cultura através da condução de três lotes distintos, analisados em triplicata e avaliados em quatro tempos diferentes: 0, 30, 60 e 90 dias, e em três diferentes condições de armazenamento: I) Armazenamento a 20°C; II) Armazenamento a 28°C com luz; (III) Armazenamento a 28°C, no escuro. As variáveis escolhidas foram: analitos maltose; manitol; ácido diclorofenoxiacético (2,4D); nitrato, pH; análise visual e promoção do crescimento (PC).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O meio de cultura no cultivo vegetal

Os meios de culturas são soluções químicas usadas, comumente, para a realização de análises laboratoriais, sendo que o fornecimento de nutrientes pelo meio de cultura é um elemento crítico e essencial na cultura de células vegetais, podendo ser utilizados para diversas finalidades. O meio de cultura serve como fonte de sais minerais (macro e micronutrientes) e fonte de carbono, vitaminas, reguladores de crescimento e outros aditivos (GUERRA; NODARI, 2006).

Os elementos que compõem o meio de cultura de células vegetais de forma geral estão resumidos na **Tabela 1**, separados em quatro grupos:

Tabela 1 – Composição geral de meios de cultivo de células vegetais dissolvidos em água

(I) Fonte de carbono	(II) Suplementos orgânicos	(III) Suplementos inorgânicos	(IV) Reguladores de crescimento	(V) Matriz de suporte
Sacarose	Aminoácidos	Macronutrientes	Auxinas	Agar
Glicose	Vitaminas	Micronutrientes	Citocininas	Agarose
Frutose				Goma Gellan
Sorbitol				

Fonte: Adaptado de Eibl (et al.,2009).

Legenda: **(I)** Água destilada ou desmineralizada (95%); **(II)** Meio basal, que consiste na fonte de carbono e suplementos orgânicos e em especial os aminoácidos Ala, Arg, Asn, Cys, His, Lle, Leu, Met etc. e as vitaminas mio-inositol, tiamina, piridoxina, ácido fólico, ácido ascórbico; **(III)** Suplementos Inorgânicos são divididos em duas classes, macro e micronutriente. Os micronutrientes mais comuns são Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, I, B, Co e os macronutrientes N, S, P, K, Mg, Ca; **(IV)** Fito-hormônios ou reguladores de crescimento, divididos em auxinas IAA, 2,4D, NAA, IBA 2,4, 5T, e citocininas, cinetina, BAP, zeatina, purina; adenina; **(V)** Matriz de suporte, como: ágar; agarose; Phytigel; e Gelrite.

O desenvolvimento de células vegetais e a correspondente geração de produtos e subprodutos são extremamente conduzidos por interações com o nível de fosfato; a fonte de carbono; a proporção nitrato-amônio; a proporção carbono-nitrogênio; e fito-hormônios. Hoje em dia, é muito comum empresas e universidades otimizarem o meio de cultura alterando as concentrações ou substituindo alguns dos

compostos basais (ENDRESS, 1994), ou modificando e variando as concentrações de fito-hormônios, a fim de alcançarem um produto final com maior qualidade (KREIS et al., 2001; SAITO; MIZUKAMI, 2002).

O carboidrato mais empregado para células vegetais nas empresas e universidades é, sem dúvida, a sacarose, por ter preço mais acessível em relação a outras fontes de carbono. Nesse caso, a enzima invertase hidrolisa a sacarose em monossacarídeos, glicose e frutose e, com a liberação da invertase no meio de cultivo no decorrer do crescimento das células vegetais, as concentrações dos carboidratos mudam de acordo com o tempo de cultivo.

Alternativamente, outros carboidratos podem ser usados como fontes de carbono, a exemplo dos resultados demonstrados por Kauyn e Koc (2006) ao testarem os efeitos de vários carboidratos, como o glicerol; o sorbitol; o manitol; a lactose; a glicose; e a galactose, em diferentes concentrações, na embriogênese de óvulos derivados de calos de três espécies de quatro variedades de citros como, por exemplo, a mexerica.

Este trabalho utilizou o meio 1493 que, por sua vez, se utiliza da maltose e manitol como fontes de carbono. Na agricultura, o fósforo se refere a um dos três nutrientes primários das plantas e é um componente dos fertilizantes. O fósforo (ânions fosfato, ou di-hidrogenofosfato de potássio), e o nitrogênio (ânions nitratos, cátion de amônio, aminoácidos, ou hidrolisados de proteínas) sustentam o crescimento celular (EIBL et al., 2009).

Alguns pesquisadores descobriram que altas concentrações de carboidratos podem suceder em plasmólise das células vegetais e conduzir à redução da biossíntese de metabólitos secundários (HILTON; WILSON, 1995). Por outro lado, quantidades de sacarose em excesso podem ser fator prejudicial, uma vez que a mesma reduz a síntese de clorofila e, portanto, diminui a capacidade fotossintética das culturas, ainda que seja essencial ao seu crescimento (DERIEK et al., 1997).

No que se refere ao amônio e ao nitrato – que compõe os sais MS –, alguns estudos fisiológicos apontam que o amônio é normalmente consumido antes do nitrato em células vegetais (WILHELMSON et al., 2006).

Os reguladores de crescimento da proporção de auxinas, como o ácido indol-3-acético (IAA) (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Reguladores de crescimento e citocininas mais utilizados em meio de cultura para células vegetais

Reguladores de crescimento	Citocininas
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	Cinetina
Ácidonaftaleno acético (NAA)	Benzilaminopurina (BAP)
Indol ácido 3-butírico (AIB)	Zeatina
Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T)	Purina e adenina

Fonte: Adaptado de Eibl (et al., 2009).

Foram avaliadas diferentes concentrações de 2,4D com cinética em experimentos de embriogênese, aplicados na espécie *Swietenia macrophylla Kin*, mais conhecida com os nomes de Aguano, ou Mogno-brasileiro. No entanto, é sabido que concentrações mais baixas de auxina e altas de citocininas ativam o crescimento celular, sendo as concentrações de citocinina promovem a partilha celular.

Com toda certeza, é importante escolher os fitormônios mais compatíveis e estabelecer a sua melhor concentração, levando em consideração o tecido ou o tipo de cultura celular que se almeja utilizar. O 2,4-D utilizado como um hormônio desdiferenciado em concentrações maiores é muito vantajoso, mas sua utilização pode acarretar preocupantes irregularidades de crescimento, ou até ocasionar em alterações de cultura durante cultivos de células vegetais em prazos mais longos.

Com relação à cultura de *citrus*, e reforçando a importância de se utilizar o meio de cultura adequado, a embriogênese da mexerica pode ser induzida na falta de reguladores de crescimento, contrariando os outros cultivos. (KAYIM; KOC, 2006). Com relação à produção do meio de cultura, é necessário dar atenção à esterilidade do meio de cultura tanto pela condição tradicional de esterilização padrão por autoclaves (121°C por 15-20 min) como por filtração estéril com filtro de 0,2 µm para os compostos vulneráveis ao calor, para que não ocorra degradação ou alteração dos compostos por temperatura.

3.2 Sistema de validação de meio de cultura

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto em determinado intervalo de tempo frente às condições ambientais e de armazenamento a que possam ser submetidos, desde a fabricação até o término da

validade. Apesar de o estudo de estabilidade ser um requisito de boas práticas de fabricação para produtos para diagnóstico de uso *in vitro*, ainda não existe legislação que instrua a metodologia para o desenvolvimento do estudo de estabelecimento da validade para produtos de diagnóstico *in vitro* como os meios de cultura.

Dessa forma, foram determinados parâmetros analíticos a partir de adaptações do Guia para Estudo de Estabilidade de Produtos Farmacêuticos (RDC) nº 210 (2003), a fim de se realizar estudos de estabilidade nos meios de cultura para o cultivo vegetal. Os compostos quantificados por cromatografia se baseiam na normativa da Anvisa (RDC 166), onde a validação de um método analítico é fundamental para implementar um sistema de controle de qualidade e para gerar dados confiáveis e algumas premissas devem ser atendidas, são elas:

Linearidade $>0,99$, normalidade valor-p $>0,05$ (Anderson-Darlin) e homoscedasticidade valor-p $>0,05$ (Breusch – Pagan).

Resultados e avaliações analíticas não confiáveis podem prejudicar decisões importantes e causar prejuízos financeiros. A validação do método é executada para assegurar que a metodologia analítica seja precisa, reprodutível e flexível sobre um arranjo específico no qual uma substância será quantificada. No Brasil, assim como em outros países, faz-se necessária a validação da metodologia analítica para o registro de novos produtos destinados, entre outros fatores, a análises qualitativa e quantitativa de métodos oficiais e para a rastreabilidade dos resultados. Assim, esses órgãos fornecem normas oficiais que devem ser seguidas no processo de validação.

Nesse sentido, um processo de validação estruturado e definido garante a conformidade com as exigências legais e assegura que o método seja condizente para o uso desejado (SKOOG et al., 2008;). A definição de validação depende do órgão e do autor, entretanto, a maioria segue a mesma linha de raciocínio garantindo, através de estudos experimentais, que o método respeite aos requisitos das aplicações analíticas assegurando-se, assim, a confiabilidade dos resultados. Portanto, a validação garante sua confiabilidade durante o uso rotineiro e, algumas vezes, é considerada como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Elaboração do protocolo de estudo de estabilidade para meios de cultura

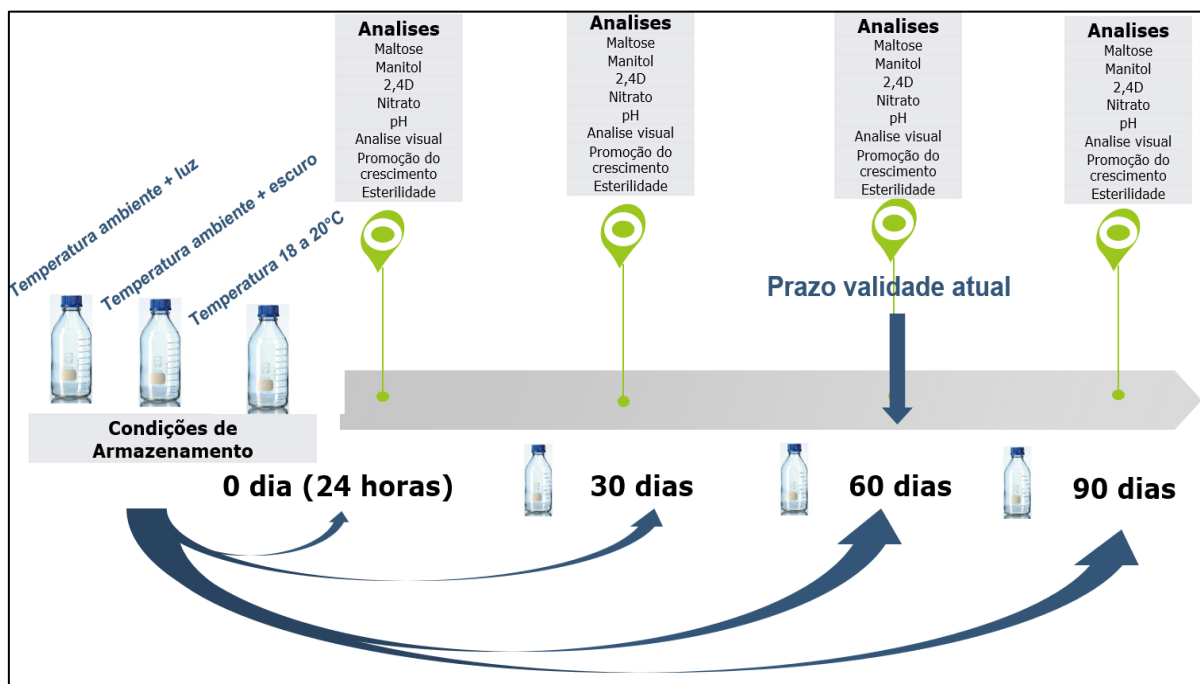
Para a proposição de uma metodologia para a pesquisa em pauta não foram encontradas legislações vigentes ou normas definidas para a validação de meio de cultura para cultivo vegetal. Portanto, foram preconizados testes de maltose; manitol; pH; nitrato; promoção do crescimento; esterilidade; e análise visual, visto que os mesmos são extensivamente utilizados para meios de culturas por constituírem interesse estratégico da empresa.

A premissa utilizada no desenho do estudo baseou-se no preparo de três lotes distintos analisados em triplicata, a serem avaliados em quatro tempos diferentes: 0; 30; 60; e 90 dias).

4.2 Planos de estudo de Estabilidade do meio de cultura

A fim de garantir a segurança e o tratamento estatístico efetivo do experimento foram produzidos três diferentes lotes do mesmo meio de cultura. O meio de cultura foi armazenado em temperatura ambiente com luz; temperatura ambiente, no escuro; e à temperatura controlada entre 18 a 20°C. O prazo de validade do meio de cultura 1493 atualmente é de 60 dias e essa condição foi definida sem nenhum estudo. Neste trabalho, o prazo da avaliação foi estendido para 90 dias. As três unidades de lotes separados para o estudo foram testadas por etapas em tempos de: zero dia; 30 dias; 60 dias; e 90 dias, todos em triplicata. A linha do tempo da **Figura 1** representa o fluxo das atividades que foram executadas.

Figura 1 – Fluxograma das atividades realizadas



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Análises quantitativas dos analitos

As análises realizadas no transcorrer do presente trabalho foram: teor de maltose; manitol; 2,4D; e nitrato. Assim como: pH; análise de esterilidade; promoção do crescimento; e teste visual. A quantificação dos componentes maltose, manitol e 2,4D foi realizada através de cromatografia líquida, pela utilização de cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo e2695.

Para análise de maltose e do manitol foi utilizada uma coluna HPX 87P e detector índice de refração com água como fase móvel. O fluxo foi 0,6mL/min e a temperatura do forno utilizada foi de 65°C. Por outro lado, para a análise do componente 2,4D foi utilizada uma coluna *sun fire* C18 da marca Waters, com detecção UV em 230nm e fase móvel com acetonitrila e ácido fórmico 50%/50%, e fluxo de 0,5mL/min a uma temperatura de 30°C.

O nitrato e o pH foram medidos no analisador de íons da Metrohm modelo 781. Para a análise de nitrato foi utilizado um eletrodo específico para determinação do íon nitrato.

4.4 Teste de promoção de crescimento

Para o teste de Promoção de Crescimento (PC) foi utilizando 1 (um) grama de material vegetal, inseridas em 30 mL do meio de cultura 1493 em frascos do tipo Erlenmeyer sob a agitação constante durante 14 dias. Após 14 dias, a massa celular total foi filtrada, pesada e o sobrenadante descartado. Para o cálculo da taxa de promoção de crescimento (PC) tomou-se a razão entre a massa celular final e a massa celular inicial (1 g). Como essa massa total é composta de células pré-embriogênicas e células não embriogênicas, faz-se essa separação numa etapa denominada limpeza. Dessa maneira, a taxa de crescimento de células pré-embriogênicas (PC_2) foi calculada tomando-se a razão entre a massa celular pré-embriogênica (após a limpeza) e a massa celular inicial (1 g).

$$\frac{\text{Massa celular final}}{\text{Massa celular inicial}} = \text{Taxa de multiplicação}$$

4.5 Análise visual

A análise visual é uma análise qualitativa e consiste em identificar qualquer presença de cor no meio de cultura, sendo utilizados dois parâmetros: cor e incolor.

4.6 Teste de esterilidade do meio de cultura

A esterilidade dos meios de cultura foi realizada visualmente, através da incubação por, no mínimo, 72 horas, na temperatura $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, para comprovar a ausência de microrganismos no meio preparado ao longo do processo de fabricação, impedindo resultados falsos positivos.

4.7 Plano de estudo para armazenamento de temperatura ambiente com luz e temperatura ambiente no escuro (estabilidade acelerada)

Nesse estudo, os frascos foram inicialmente expostos à temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$, temperatura sugerida como extremamente capaz de acelerar o envelhecimento do produto. Durante o prazo de zero dia, metade do prazo de validade estabelecido, ou

seja, 30 dias, 60 dias e 90 dias, foram feitas as análises de maltose, manitol, 2,4D, nitrato, pH, esterilidade, promoção do crescimento e teste visual das amostras coletadas.

4.8 Plano de estudo para armazenamento em sala de 18 a 20°C

Nesse estudo, os frascos foram inicialmente expostos à temperatura de 18 a 20°C \pm 2, sugerida como a temperatura ideal para preservar o produto.

Durante o prazo de zero dia, metade do prazo de validade estabelecido, ou seja, 30 dias, 60 dias e 90 dias, foram feitas as análises de maltose, manitol, 2,4D, nitrato, pH, esterilidade, promoção do crescimento e teste visual das amostras coletadas.

4.9 Plano de estudo para confirmação do prazo de validade do meio de cultura

Os resultados obtidos a partir desse estudo foram comparados com os dados no tempo zero, estudo acelerado e armazenados à temperatura entre 18 e 20°C.

4.10 Critérios estatísticos de avaliação e aceitação

Com o auxílio do *software* MINITAB foi realizado o tratamento estatístico para os dados experimentais obtidos para os diferentes tratamentos.

O MINITAB é um software de computador utilizado para fins estatísticos. É muito utilizado nas universidades e empresas, tendo funções mais específicas voltadas para gerenciamento. Sua plataforma é parecida com a de uma planilha eletrônica, como *Microsoft Excel*, ou *Calc (OpenOffice)*, mas com a capacidade de executar análises estatísticas complexas. O programa foi desenvolvido em 1972.

Para verificar se os valores dos parâmetros avaliados em 0, 30, 60 e 90 dias, foi necessária a utilização do teste de Hipóteses (usando o valor-p).

Seguem as etapas cumpridas no teste de hipóteses utilizando o *valor-p*.

I. Formular as hipóteses

Hipótese Nula (H_0): afirmação ou conjectura sobre o parâmetro de interesse (θ) contra a qual se busca evidência nos dados amostrais.

Hipótese Alternativa (H_1): afirmação ou conjectura sobre o parâmetro de interesse (θ) que se suspeita ser verdadeiro.

$$H_0 : \theta = \theta_0$$

$$H_1 : \theta \neq \theta_0$$

II. Nível de significância (n.s) do teste

Deve-se fixar a probabilidade α de se cometer o erro tipo I (o parâmetro de interesse é considerado diferente, mesmo sendo igual).

III. Observação da evidência na amostra

Os resultados obtidos na amostra são analisados, a exemplo da média amostral.

IV. Determinar o nível descritivo ou *valor-p*

Essa característica condiz com a probabilidade de se observar valores tão ou mais extremos que o valor obtido na amostra, caso a hipótese nula H_0 seja verdadeira, ou seja, $\text{valor-p} = P(\text{valores tão ou mais extremos contra } H_0, \text{ sendo } H_0 \text{ verdadeira})$. Esta probabilidade avalia a força da evidência contida nos dados contra a hipótese nula H_0 .

Se $\text{valor-p} \leq \alpha$, afirma-se que a amostra proporcionou evidência satisfatória para rejeitar a hipótese nula H_0 .

Caso contrário, se $\text{valor-p} > \alpha$, diz-se que a evidência amostral não é forte o suficiente para rejeitar a hipótese nula H_0 .

Assim, para o teste de hipótese para uma média de dados μ de distribuição normal, com variância populacional (σ^2) conhecida e número de amostras igual a n , tem-se:

$$Z = \frac{\bar{X} - \mu_0}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} \sim N(\mu, \sigma^2)$$

Valor-p = $P(Z \geq \frac{\bar{X} - \mu_0}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}})$, obtido pela Tabela Normal Padrão.

Esse nível relatado corresponde à probabilidade de se relatar valores tão ou mais extremos que o valor obtido na amostra, caso a hipótese nula H_0 seja verdadeira, ou seja, valor-p = P (valores tão ou mais extremos contra H_0 , sendo H_0 verdadeira).

Esta probabilidade mensura a força da evidência contida nos valores contra a hipótese nula H_0 .

Se valor-p $\leq \alpha$, diz-se que a amostra forneceu evidência suficiente para recusar a hipótese nula H_0 . Caso contrário, se valor-p $> \alpha$, diz-se que a evidência amostral não é forte o suficiente para rejeitar a hipótese nula H_0 .

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os parâmetros químicos e biológicos foram avaliados no Tempo Zero (tempo inicial) e, sucessivamente, nos intervalos de tempo 30 dias, 60 dias e 90 dias, divididos em diferentes condições de armazenamento a seguir:

I. Maltose e Manitol

Ambos os carboidratos se mantiveram dentro do esperado para as três condições testadas no intervalo de 90 dias de armazenamento.

II. 2,4D

O Ácido diclorofenoxiacético (2,4D) tem uma importância muito grande no processo, atuando na multiplicação celular. Dos compostos avaliados, foi a molécula mais estável ao longo dos 90 dias de armazenamento.

III. Nitrato

Por se tratar de uma análise que se utiliza de sensor para a quantificação, os valores obtidos de nitrato se mostraram satisfatórios, pois análises que utilizam sensores para quantificação trabalham com um valor de inexatidão de aproximadamente 10%.

IV. pH

A verificação do pH tem importância no estudo de estabilidade, visto que mudanças no valor de pH podem ocorrer devido à presença de impurezas, hidrólise e decomposição do produto e alterações físicas no material de acondicionamento do produto, como corrosão ou deformação. No entanto, essas alterações também podem acontecer devido ao tempo de armazenamento e/ou condições inadequadas de transporte.

V. Promoção do crescimento

As multiplicações celulares nos tempos de 30, 60 e 90 dias, nas três diferentes condições de armazenamento, mostraram-se satisfatórias. A composição do

meio de cultura mostrou-se íntegra durante todo o intervalo de tempo observado.

VI. Esterilidade

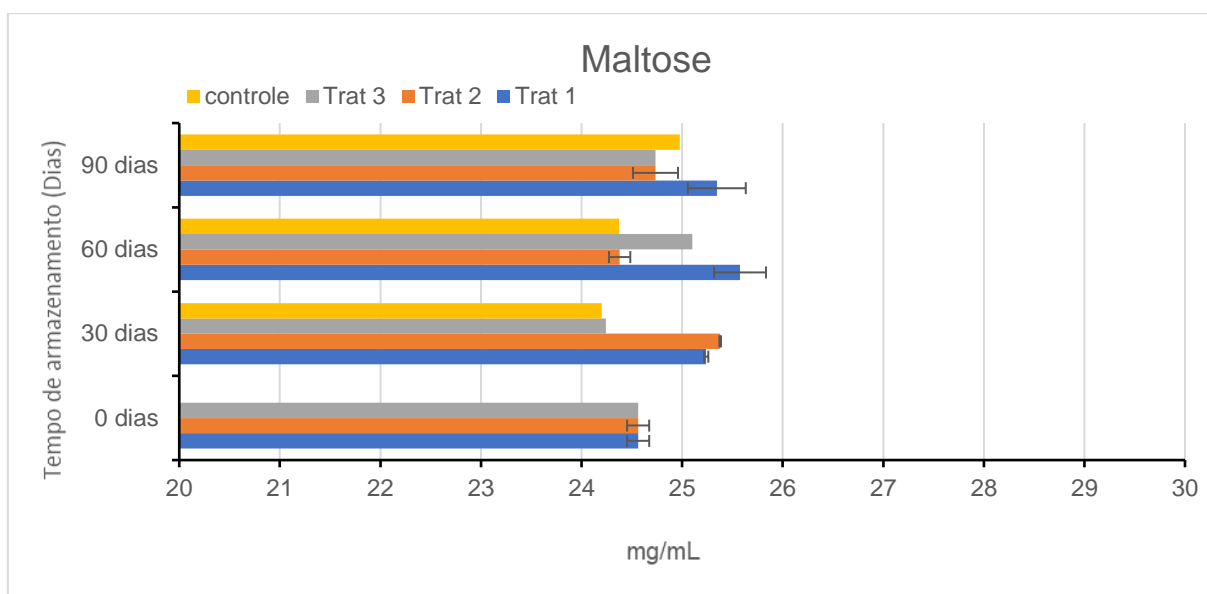
Nenhuma das amostras analisadas do meio 1493 apresentou contaminação durante os períodos de armazenamento. Sendo assim, foi possível comprovar a esterilidade do meio de 3 culturas acondicionadas nas três diferentes condições de armazenamento.

VII. Análise visual

Essa análise foi realizada visualmente e não foram observadas alterações físicas no meio de cultura, ou seja, nenhum recipiente sofreu perturbação, o que possivelmente impediu que ocorressem alterações nesse parâmetro durante os 90 dias. Portanto, foi possível atestar de que o aspecto da coloração permaneceu dentro do limite de aceitação das três condições armazenadas.

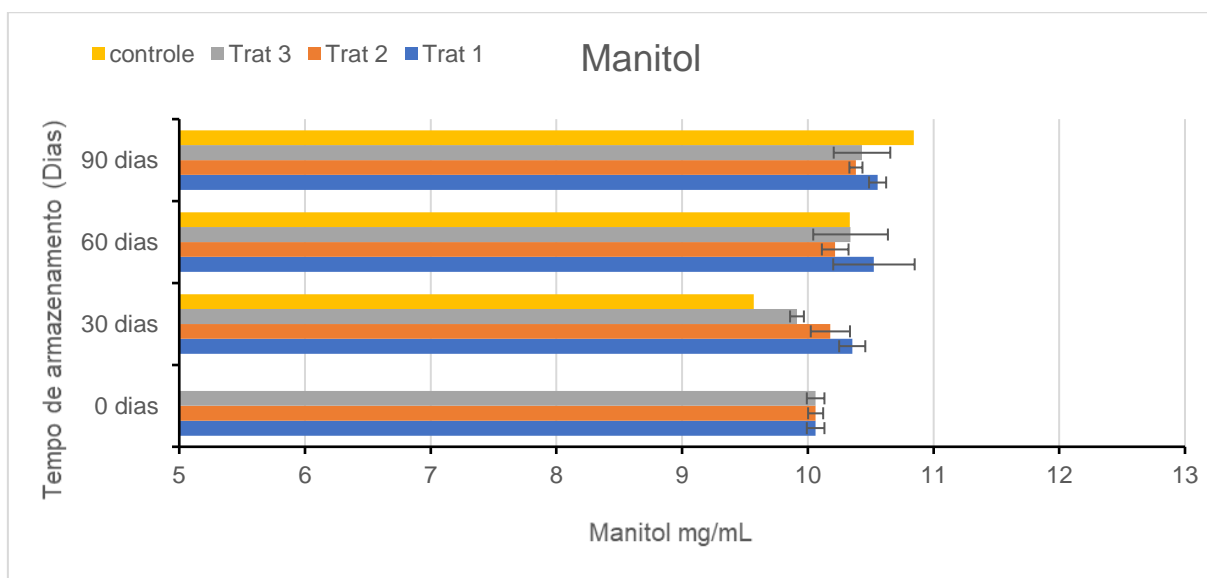
Para uma avaliação inicial, as **Figura 2 a 8** mostram os resultados experimentais dos compostos químicos e biológicos nos tempos de 0; 30; 60 e 90 dias, bem como nas três diferentes condições de armazenamento. As semelhanças entre os resultados parecem bastante satisfatórias.

Figura 2 – Concentração de maltose ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro



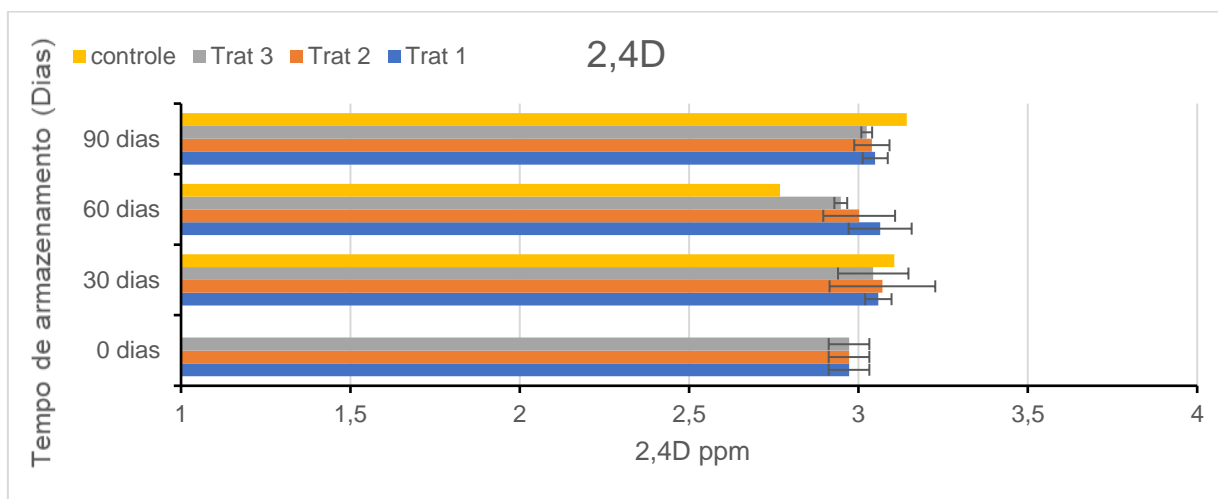
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Concentração de manitol ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro



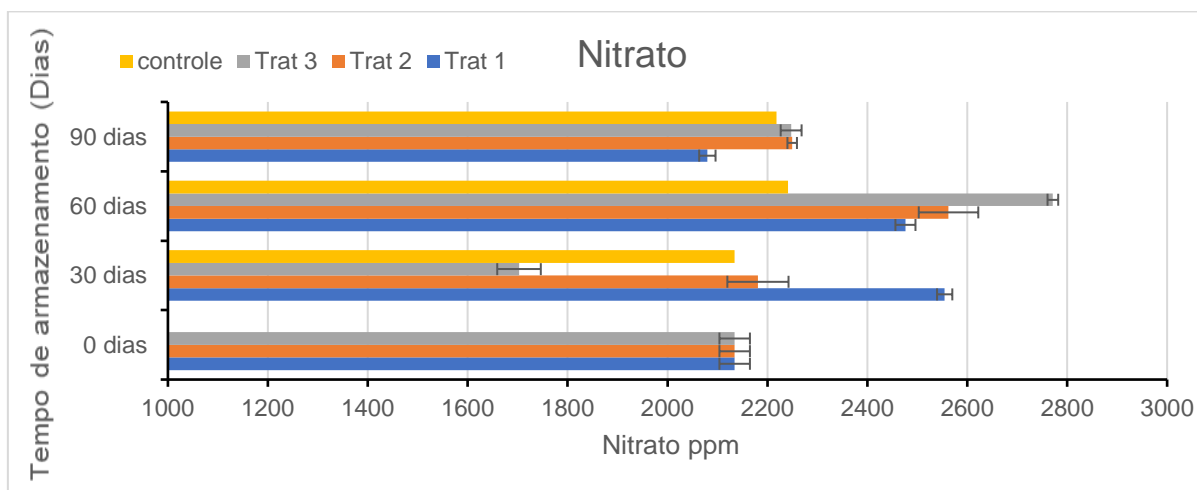
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 – Concentração de 2,4 - D ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro



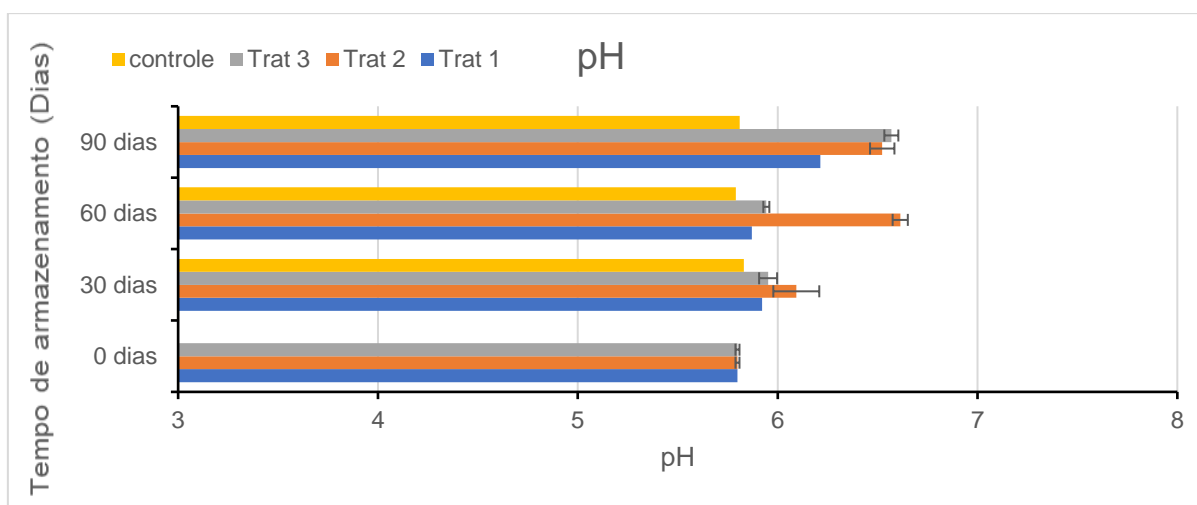
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 – Concentração de nitrato ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro



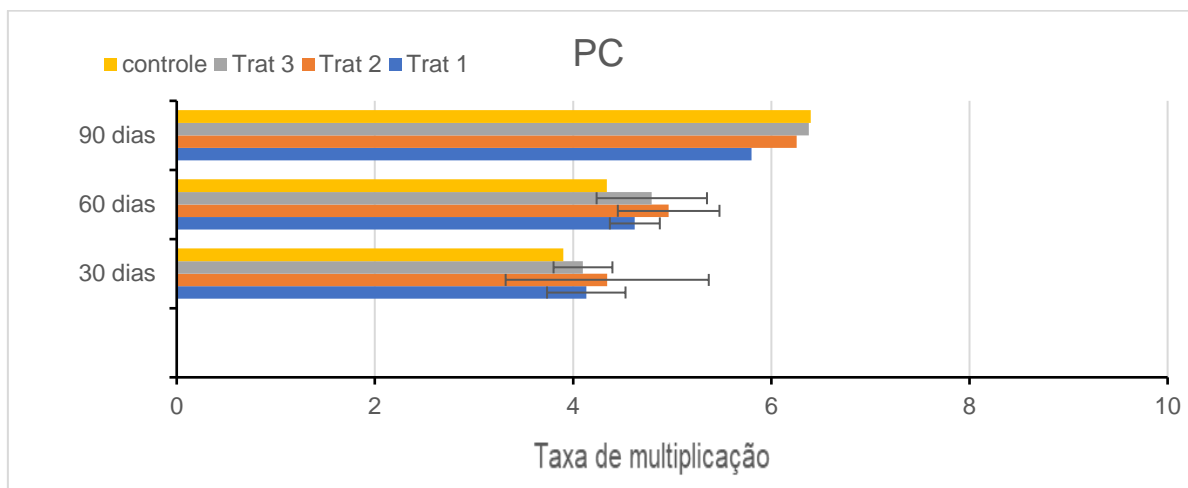
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Medidas de pH ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro



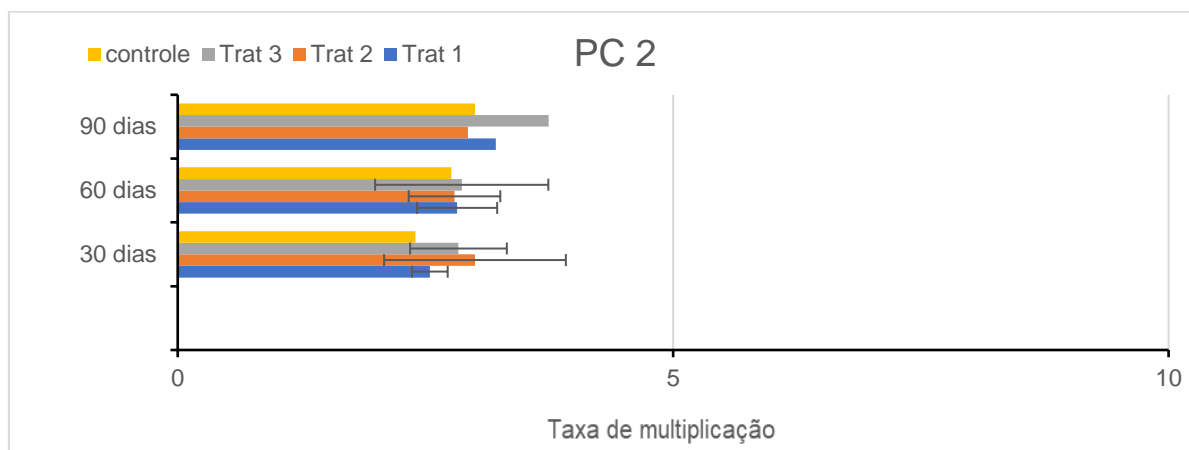
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Taxa de multiplicação da célula vegetal ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Taxa de multiplicação da célula vegetal ao longo dos diferentes intervalos de tempo e seus respectivos controles para diferentes condições de armazenamento: (Tratamento 1) 20°C, (Tratamento 2) 28°C com luz e (Tratamento 3) 28°C no escuro



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados avaliados nos gráficos em *Excel* foram empregados no teste de hipóteses para nível de significância (α) igual a 0,05 e valores de “valor-p” calculados pelo *software* MINITAB. Todos os valores obtidos ao longo do tempo foram armazenados nas três diferentes condições de armazenamento.

A análise visual das placas não apresentou alterações ou contaminação após o período de incubação. A análise estatística realizada no *software* MINITAB, partindo de três diferentes lotes armazenados em três diferentes condições de lotes de meios de cultura 1493, avaliando os dados de zero; 30; 60; e 90 dias mostrou-se parcialmente satisfatória para a hipótese estudada e esperada.

Os dados representados na **Tabela 3** mostram que as células descritas com a nomenclatura ‘NÃO’ referem a condição de que não houve diferença estatística, ou seja, foi aceita a hipótese nula H_0 , o que se considera positivo, uma vez que a nomenclatura ‘SIM’ indica que houve diferença estatística, rejeitando-se a hipótese nula H_0 , o que se considera um efeito negativo.

Tabela 3 – Dados experimentais obtidos pela análise estatística (MINITAB)

Armazenamento	Maltose	Glicose	Manitol	2,4D	Nitrato	pH
20°C	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM
28° com luz	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	SIM
28° escuro	NÃO	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM
Armazenamento	PC 30	PC2 30	PC 60	PC2 60	PC 90	PC2 90
20°c_escuro_claro	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	SIM	SIM

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na condição de armazenamento a 20°C, 75% dos compostos analisados por cromatografia atenderam os critérios estatísticos (exceto o manitol), que apresentou diferença estatística em relação ao zero, segundo a análise estatística. Já as análises de nitrato e pH, feitas por sensores, não sendo métodos validados seguindo a normativa da Anvisa, foram classificadas com diferença estatística nas três diferentes condições de armazenamento (20°C; 28°C com luz; e 28°C, escuro). É provável que a sensibilidade do equipamento tenha interferido na precisão dos resultados.

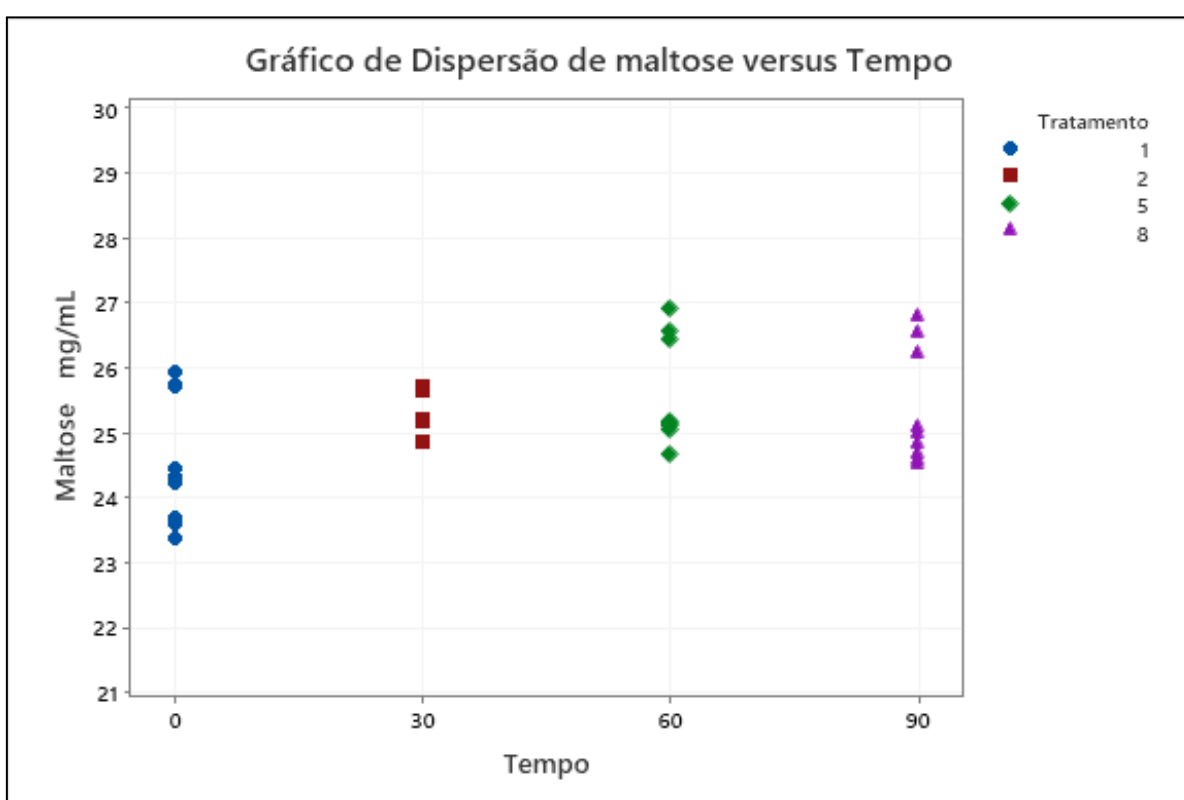
Para a condição de armazenamento a 28°C em ambiente com luz, os compostos manitol e 2,4D atenderam aos critérios estatísticos, portanto não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao tempo zero. De maneira similar, para a condição de armazenamento a 28°C, no escuro, maltose e 2,4D também foram consideradas estatisticamente iguais ao tempo zero.

A validação estatística realizada para o teste de promoção de crescimento (PC) para 30 dias de armazenamento, avaliando-se os dados de multiplicação da célula vegetal e contemplando células embriogênicas e não embriogênicas, foi classificada como não tendo diferença estatística, mostrando que os dados são estatisticamente iguais ao tempo zero. Já para a validação estatística utilizando os dados de 30 dias de armazenamento para o teste de promoção de crescimento (PC2) contemplando apenas a célula embriogênica houve diferença estatística, o que significa que os dados não são iguais, rejeitando-se a hipótese nula H_0 .

A validação estatística realizada para o teste de promoção de crescimento (PC) para 60 dias de armazenamento, avaliando-se os dados de multiplicação da célula vegetal e contemplando células embriogênicas e não embriogênicas, foi classificada como não tendo diferença estatística em ambos os materiais (PC) e (PC2), mostrando que os dados são estatisticamente iguais ao tempo zero.

A validação estatística feita para o teste de promoção de crescimento (PC) para 90 dias de armazenamento, avaliando-se os dados de multiplicação da célula vegetal e contemplando as células embriogênicas e não embriogênicas, foi classificada como havendo diferença estatística em ambos os materiais (PC) e (PC2). De maneira geral, tais comportamentos são representados nos gráficos de dispersão dos analitos, corroborando com esta colocação a seguir, a partir da **Figura 9** até a 35

Figura 9 – Concentrações de maltose ao longo do tempo, armazenados na condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

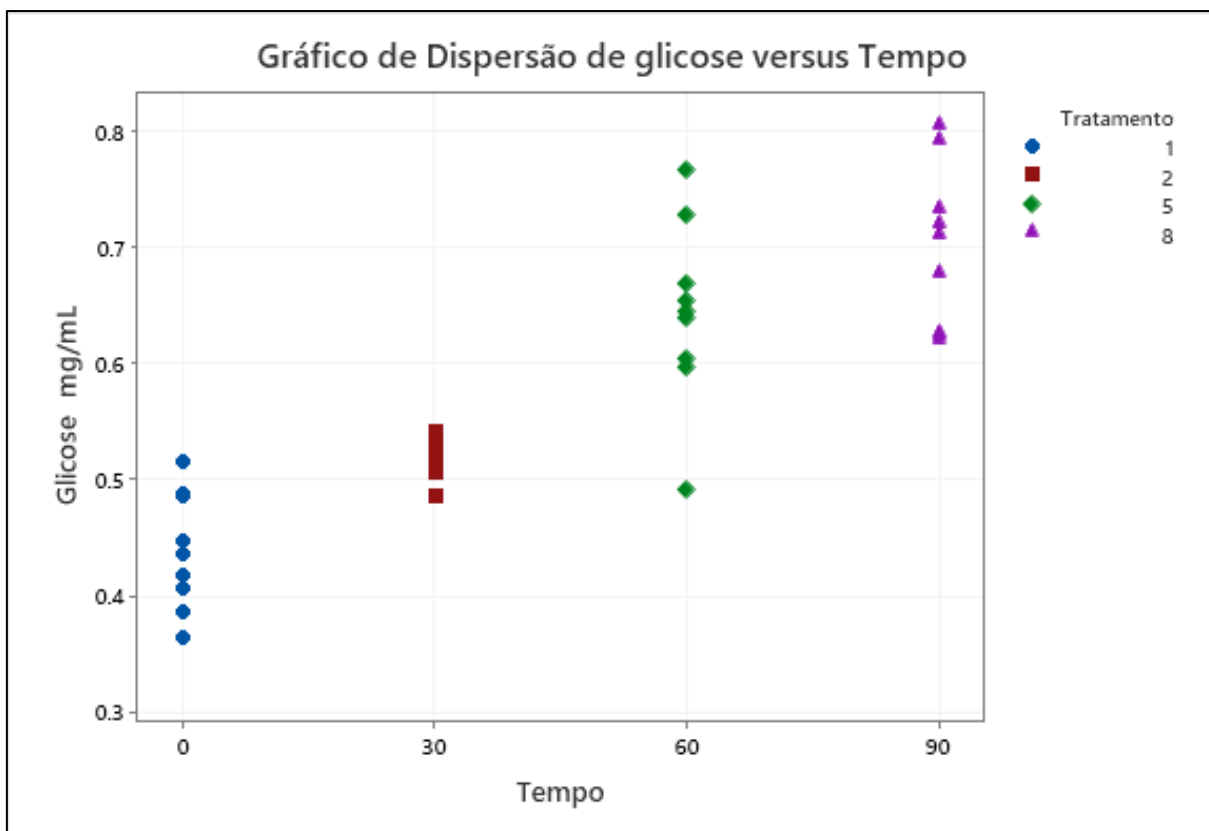


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias.

A **Figura 9** mostra os dados estatisticamente iguais ao tempo zero, portanto, não havendo diferença estatística para os valores de maltose ao longo do tempo.

Figura 10 – Concentrações de glicose ao longo do tempo, armazenados na condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

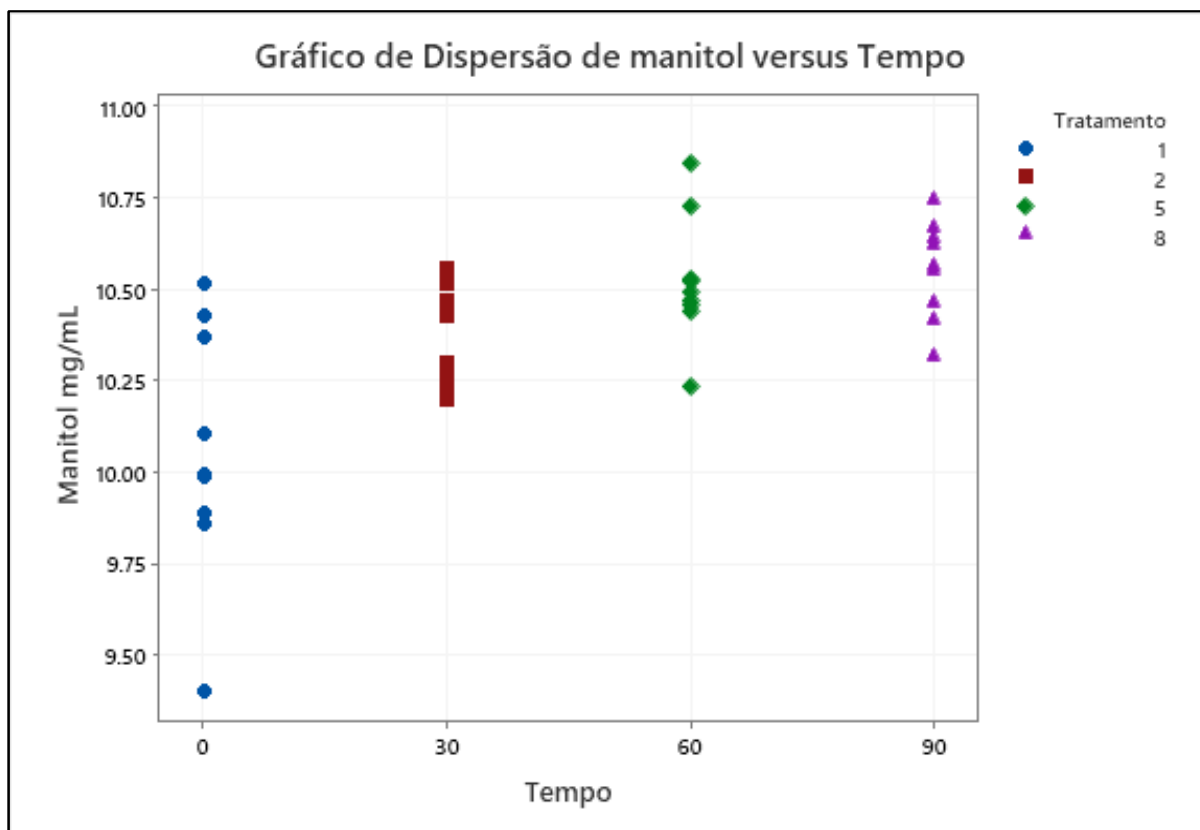


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias

A **Figura 10** mostra os dados estatisticamente iguais ao tempo zero, portanto, não havendo diferença estatística para os valores de glicose ao longo do tempo.

Figura 11 – Concentrações de manitol ao longo do tempo, armazenados na condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.

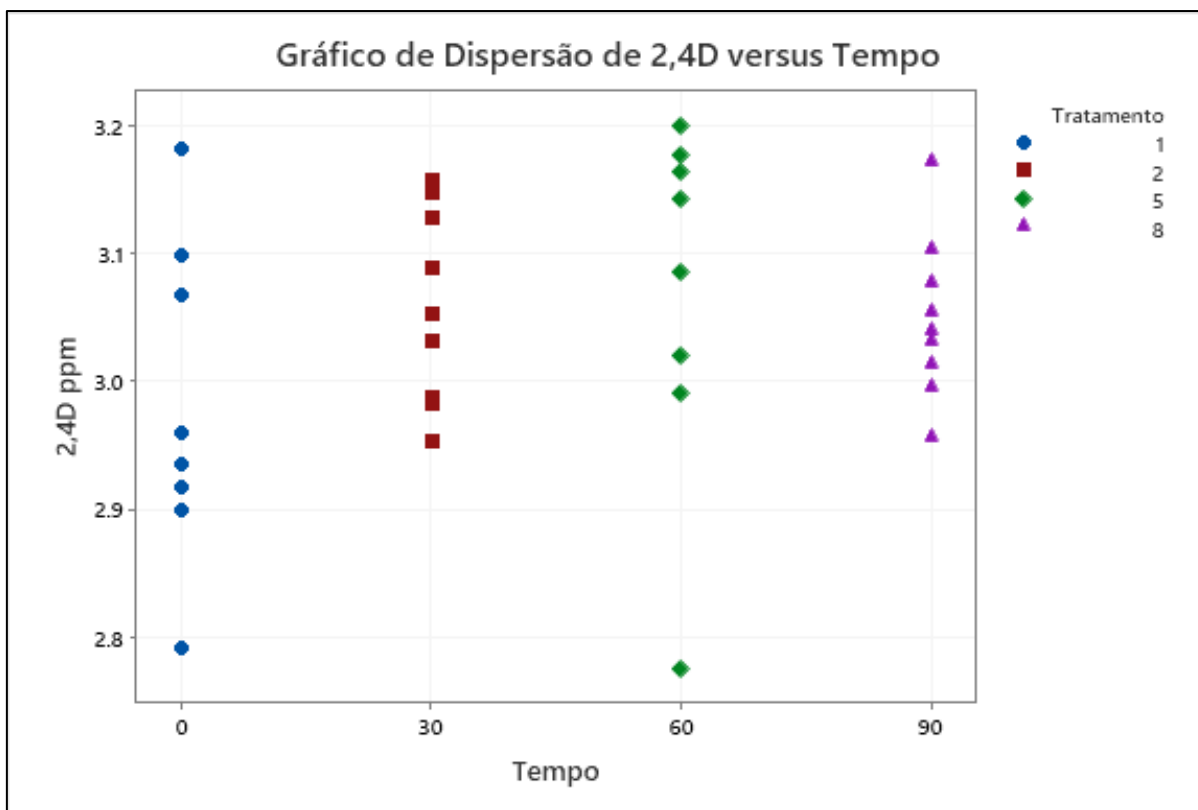


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias.

A **Figura 11** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de manitol ao longo do tempo.

Figura 12 – Concentrações de 2,4D ao longo do tempo, armazenados na condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

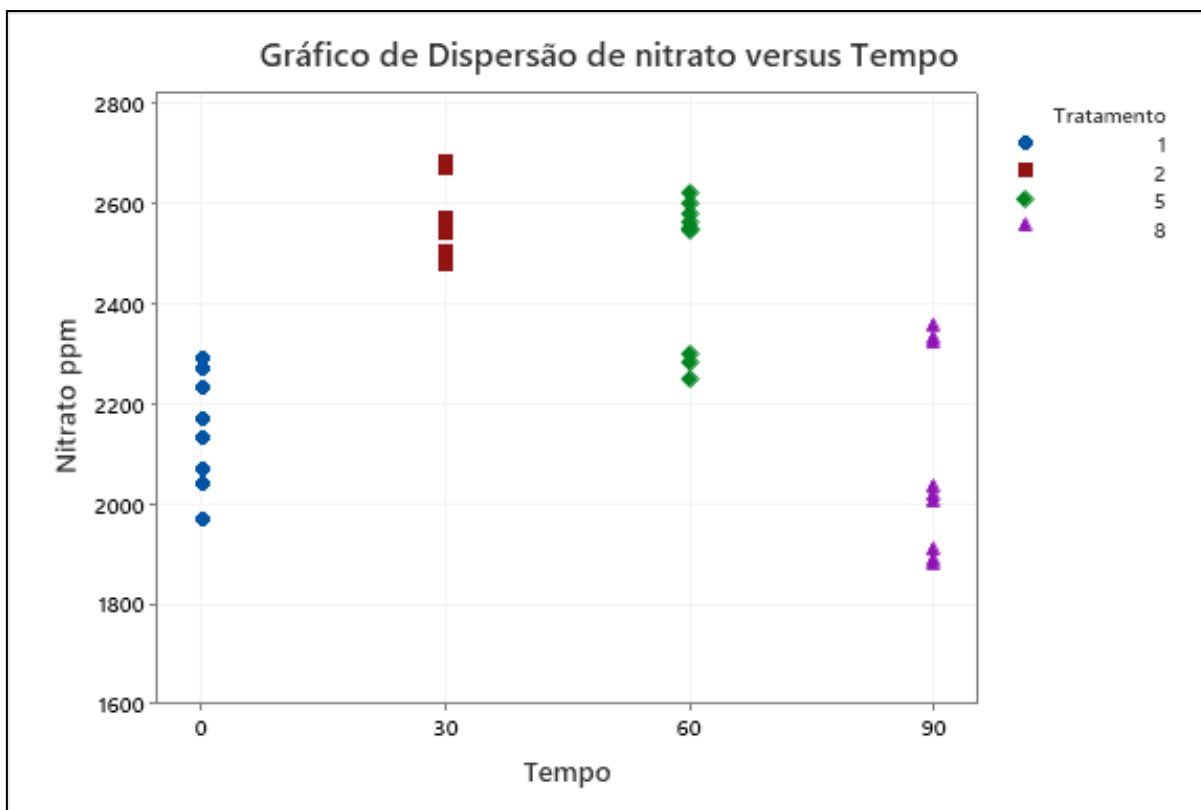


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias.

A **Figura 12** mostra que os dados são estatisticamente iguais ao tempo zero, não havendo diferença estatística para os valores de 2,4D ao longo do tempo.

Figura 13 – Concentrações de nitrato ao longo do tempo, armazenados na condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

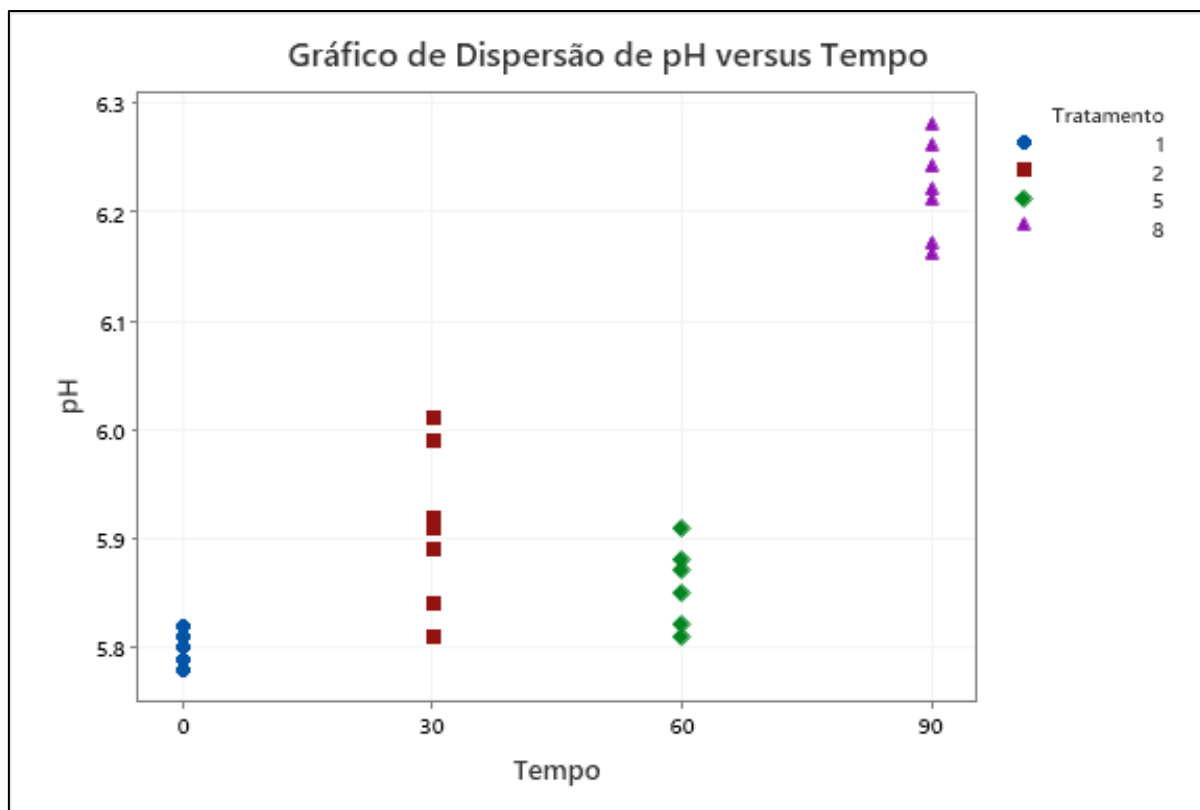


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias.

A **Figura 13** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de nitrato ao longo do tempo.

Figura 14 – Valores de pH ao longo do tempo, armazenados na condição de condição de 20°C, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB.

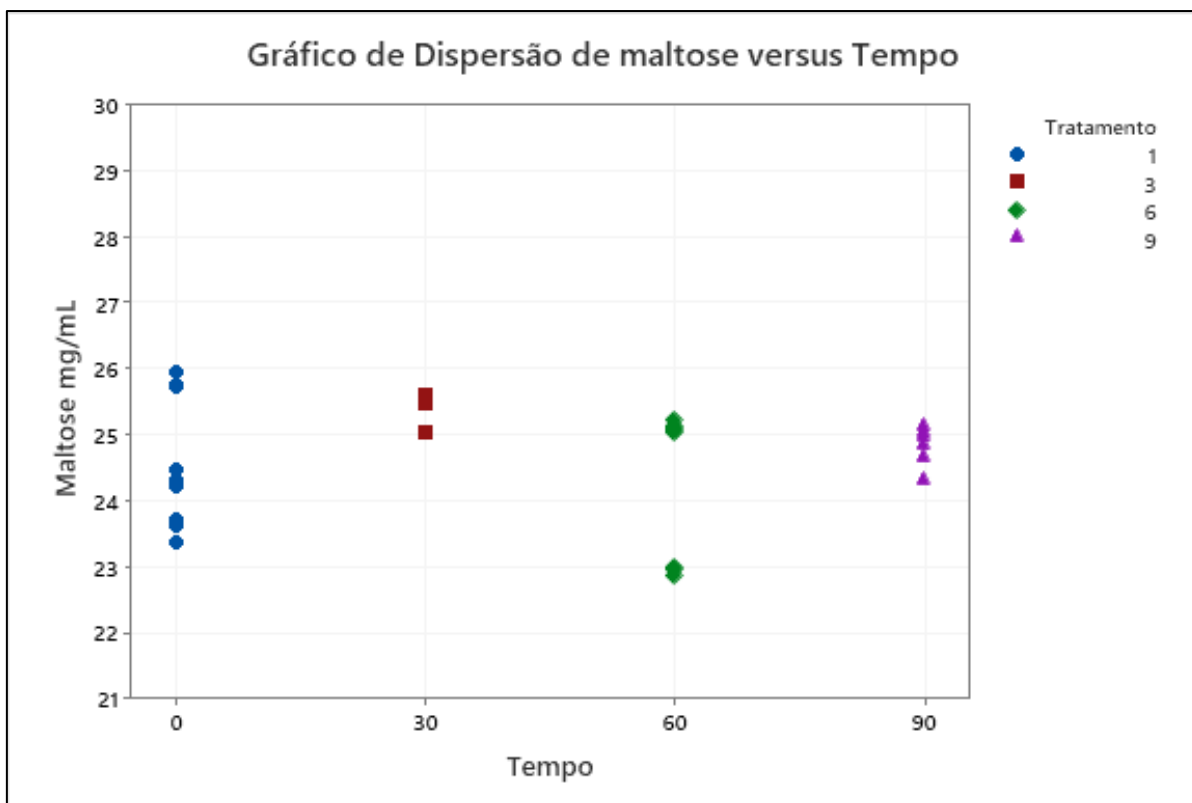


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias.

A **Figura 14** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de pH ao longo do tempo.

Figura 15 – Concentrações de maltose ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

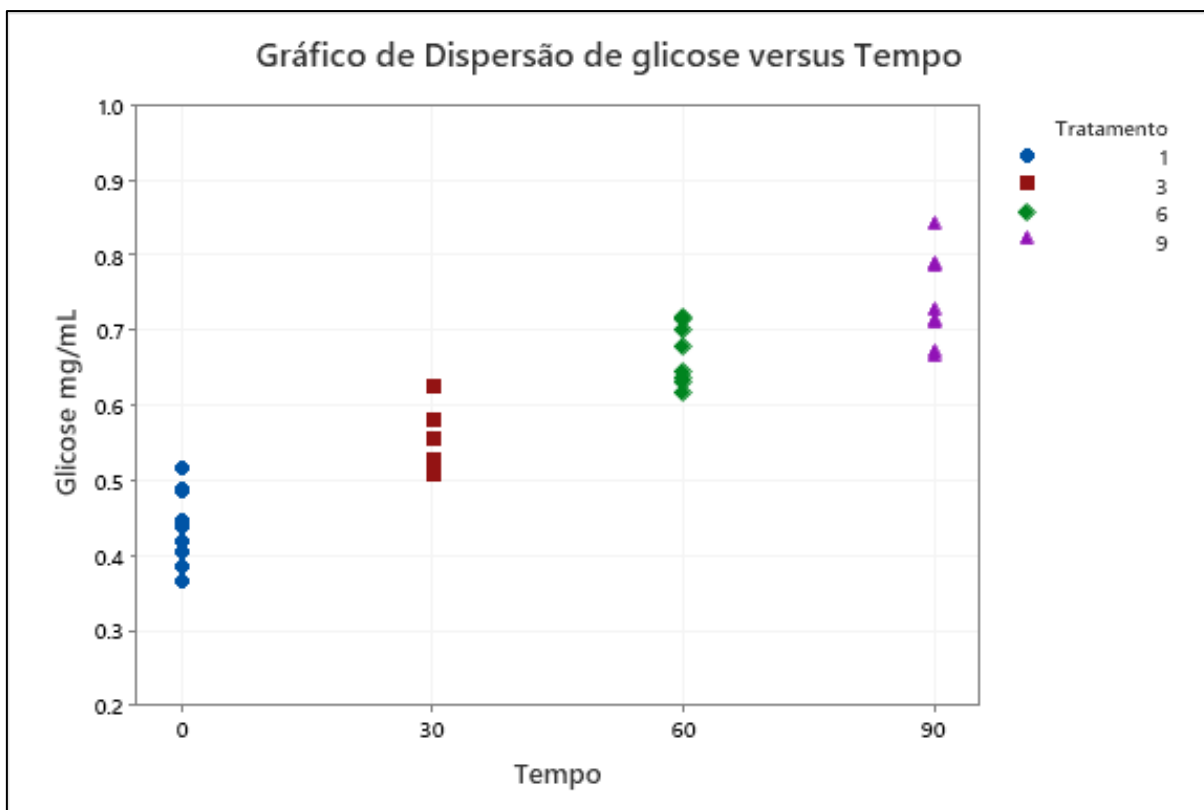


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, Tempo zero; Tratamento 3, 30 dias; Tratamento 6, 60 dias; Tratamento 9, 90 dias.

A **Figura 15** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de maltose ao longo do tempo.

Figura 16 – Concentrações de glicose ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

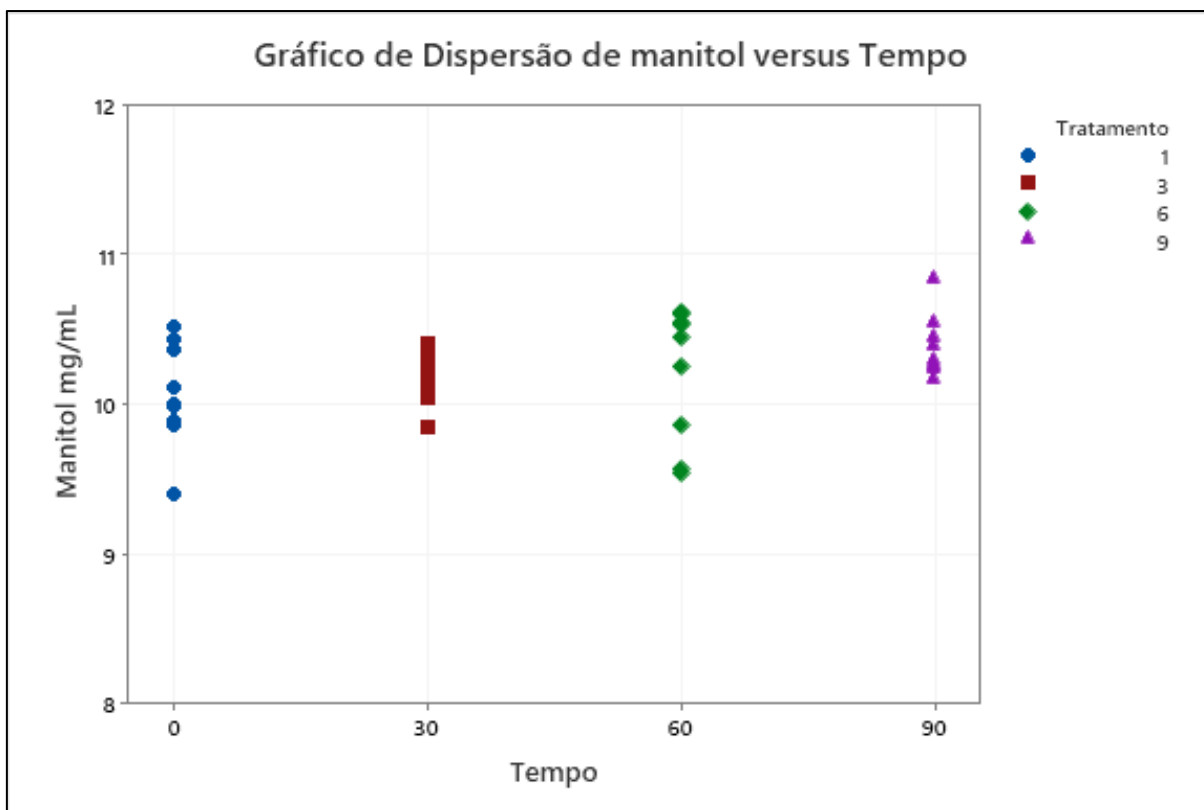


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias.

A **Figura 16** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de glicose ao longo do tempo.

Figura 17 – Concentrações de manitol ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

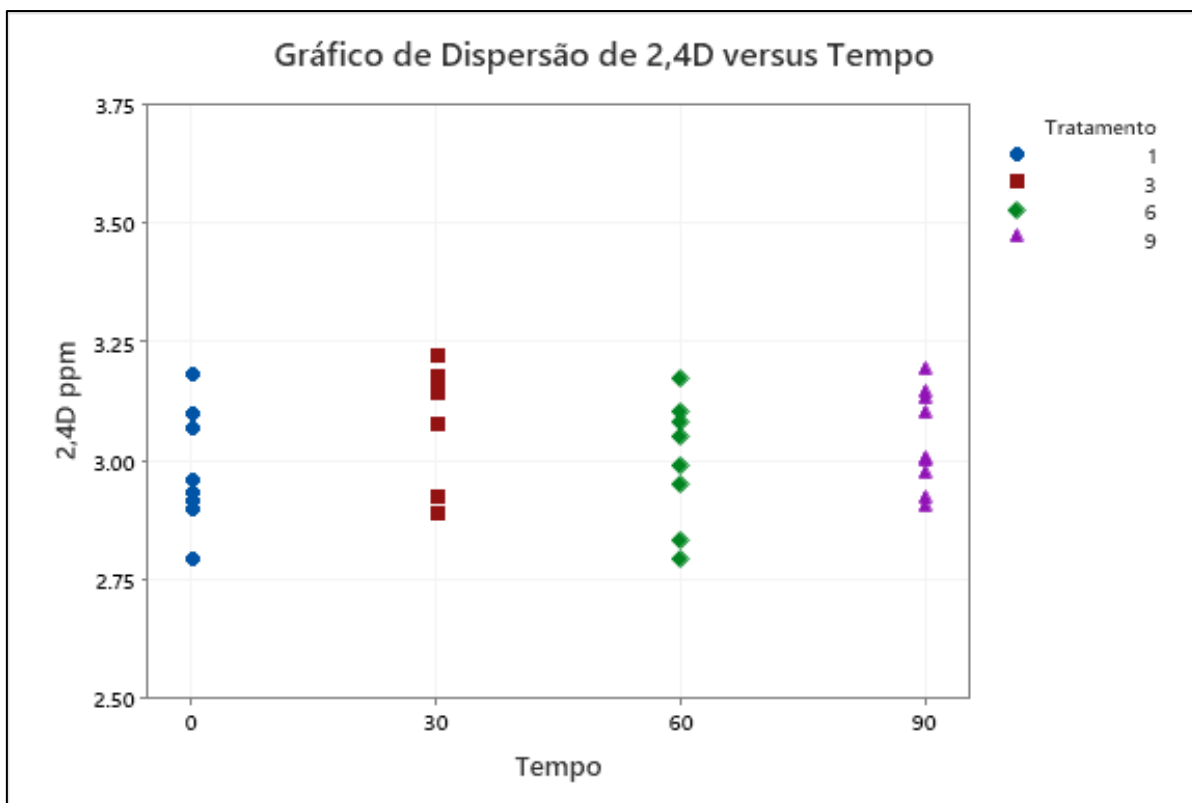


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias.

A **Figura 17** mostra que os dados não apresentaram diferença estatística com relação ao tempo zero para os valores de manitol ao longo do tempo.

Figura 18 – Concentrações de 2,4D ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

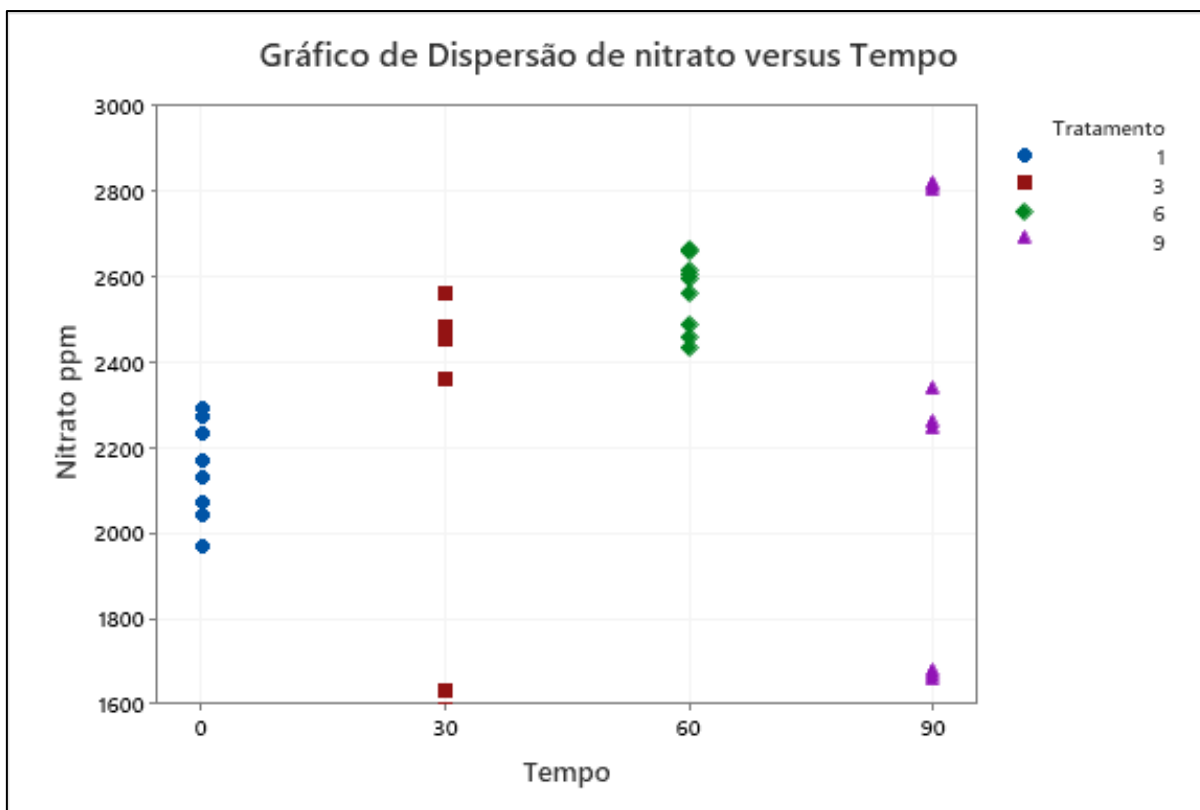


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias.

A **Figura 18** mostra que os dados são estatisticamente iguais ao tempo zero.

Figura 19 – Concentrações de nitrato ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

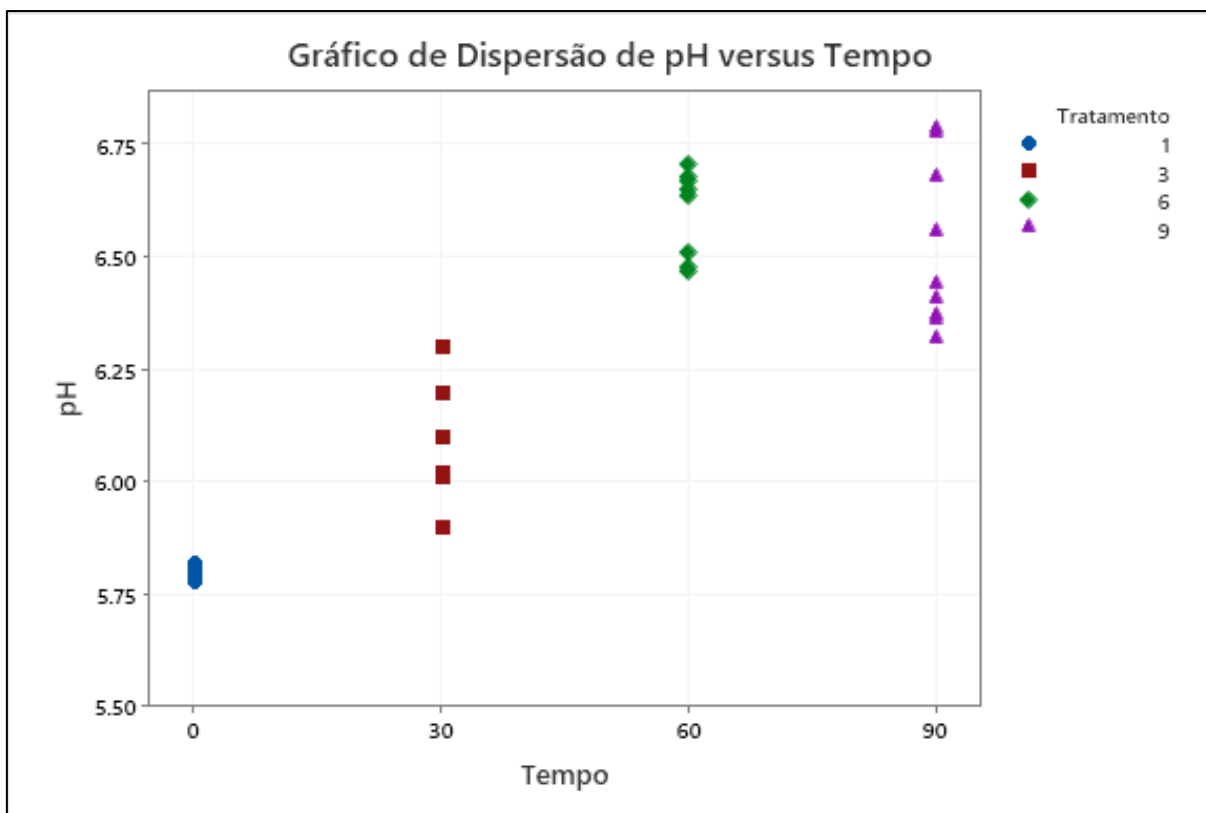


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias.

A **Figura 19** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de manitol ao longo do tempo.

Figura 20 – Valores de pH ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C com luz, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

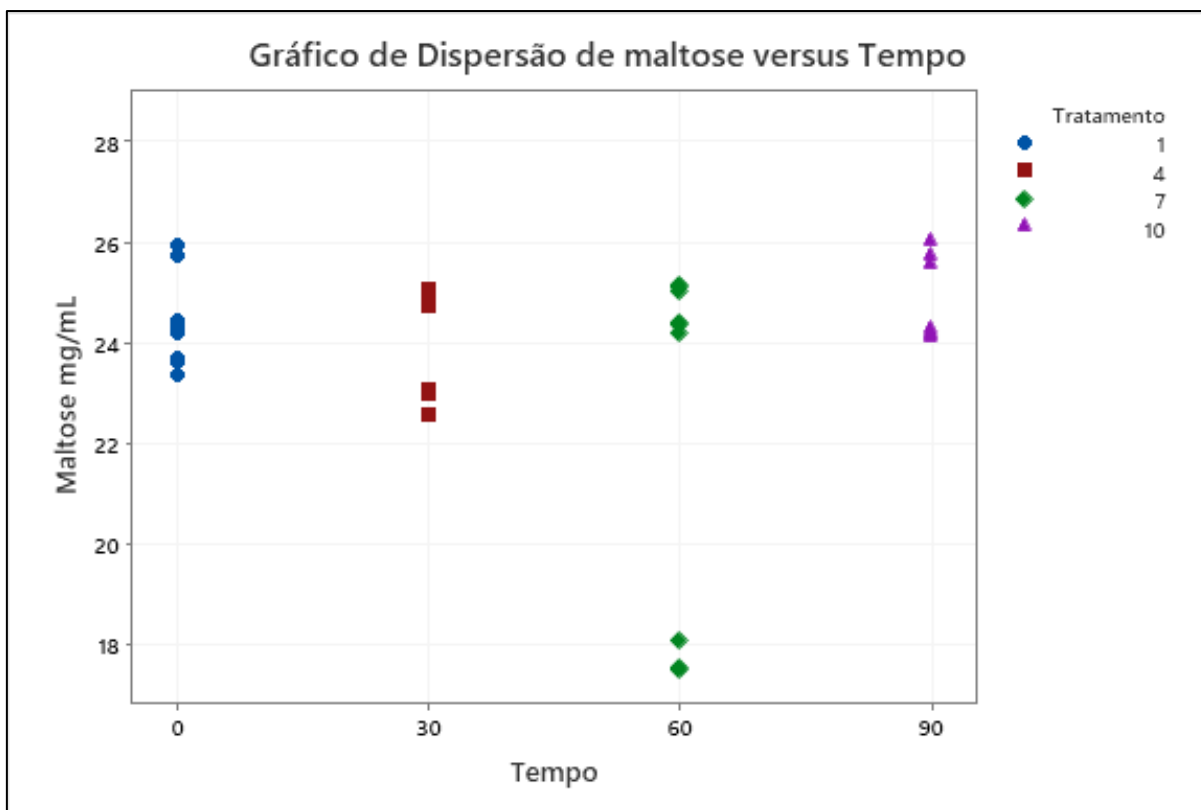


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, tempo zero; Tratamento 2, 30 dias; Tratamento 5, 60 dias; Tratamento 8, 90 dias.

A **Figura 20** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de pH ao longo do tempo. No gráfico nota-se valores crescentes de pH ao longo do tempo.

Figura 21-- Concentrações de maltose ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

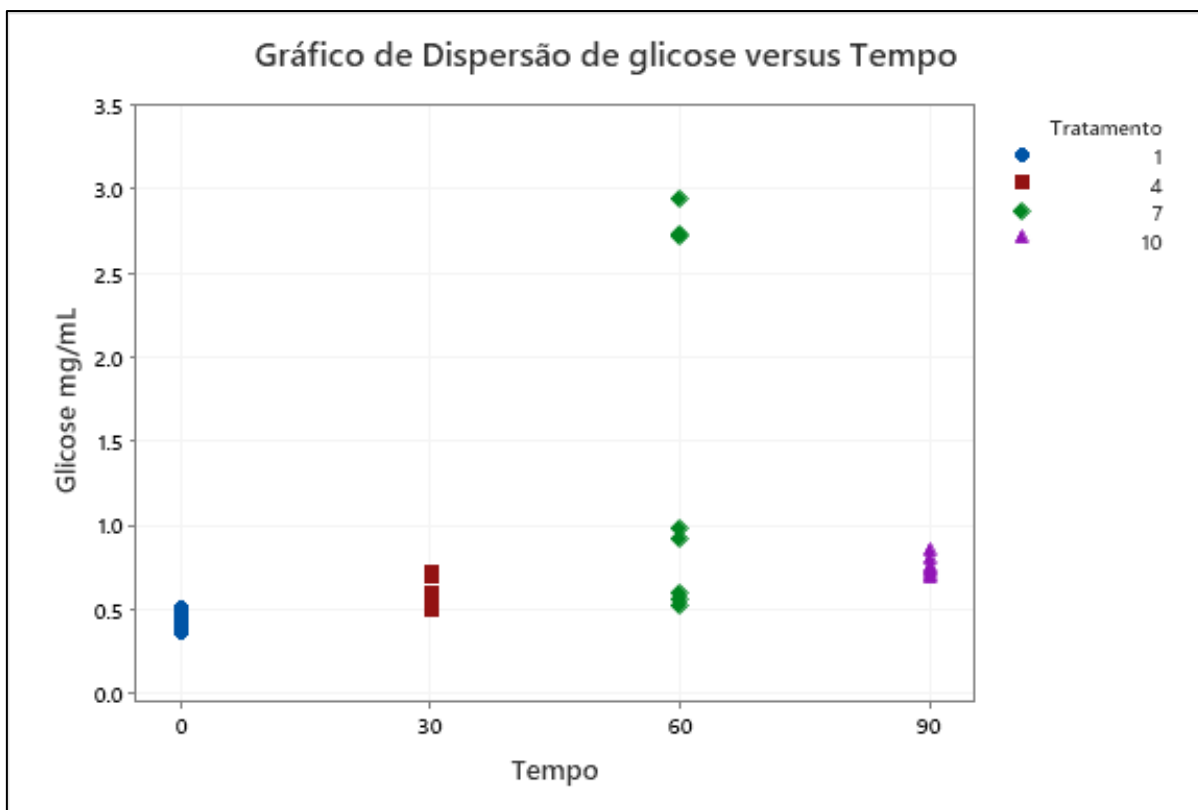


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, Tempo zero; Tratamento 4, 30 dias; Tratamento 7, 60 dias; Tratamento 10, 90 dias.

A **Figura 21** mostra que os dados são estatisticamente iguais ao tempo zero.

Figura 22 – Concentrações de glicose ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

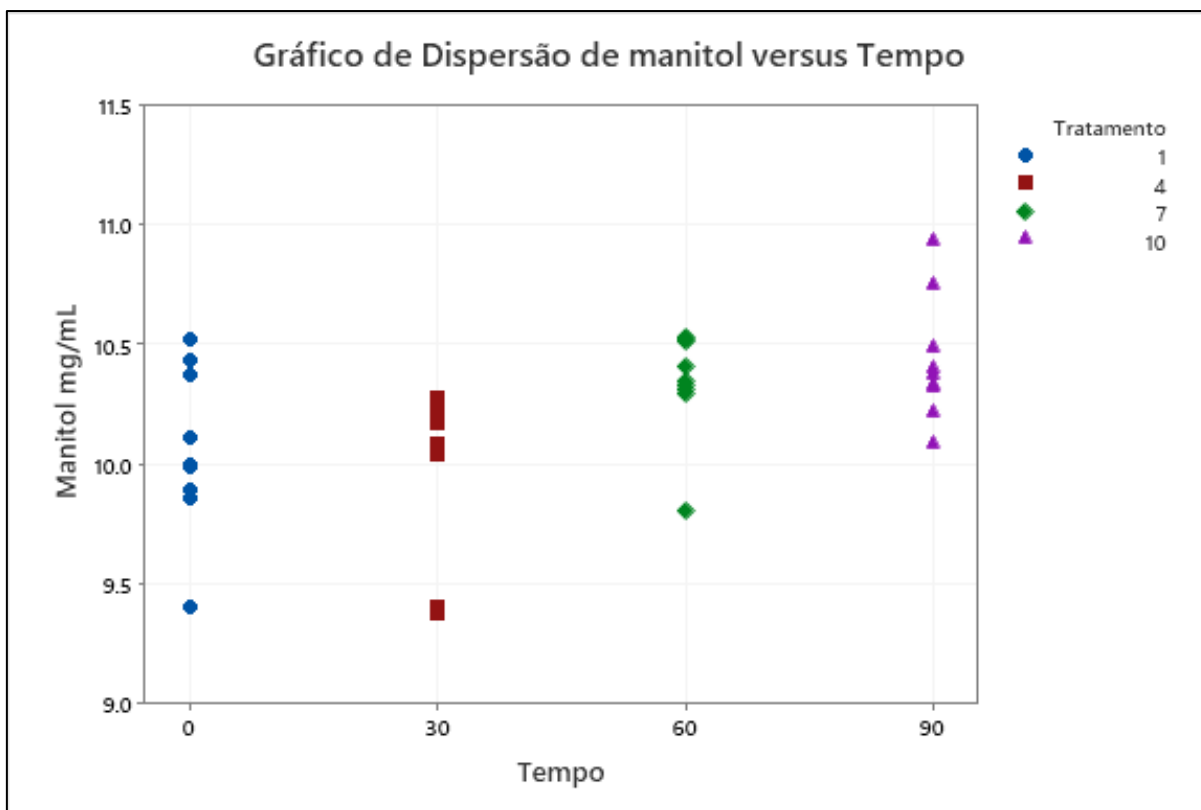


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, Tempo zero; Tratamento 4, 30 dias; Tratamento 7, 60 dias; Tratamento 10, 90 dias.

A **Figura 22** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de glicose ao longo do tempo.

Figura 23 – Concentrações de manitol ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

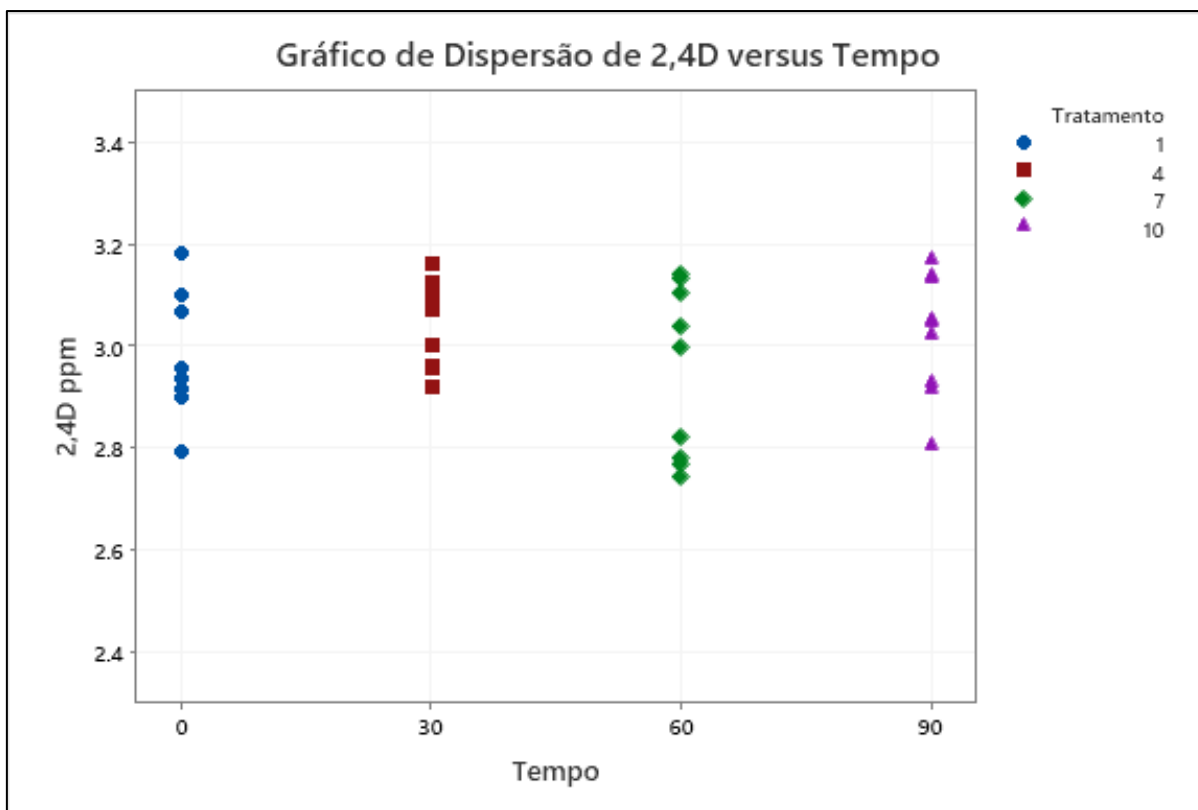


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, Tempo zero; Tratamento 4, 30 dias; Tratamento 7, 60 dias; Tratamento 10, 90 dias.

A **Figura 23** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de manitol ao longo do tempo.

Figura 24 – Concentrações de 2,4D ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

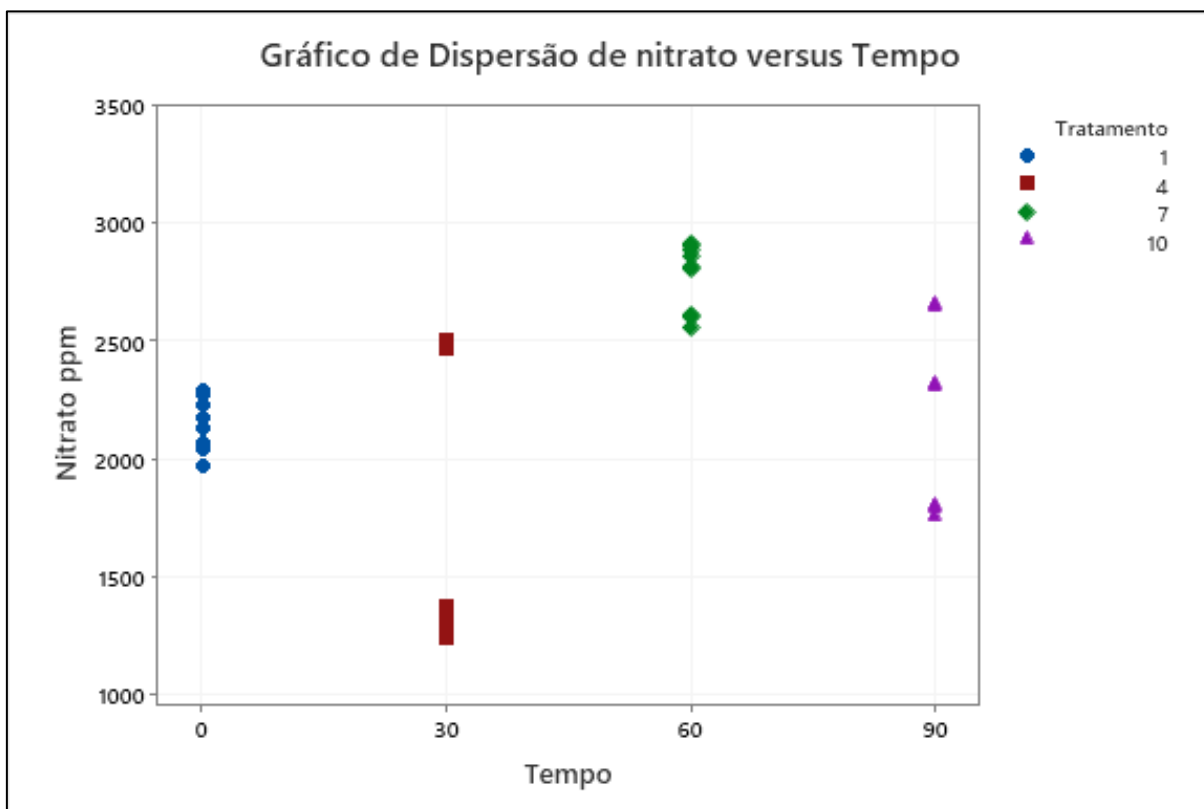


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, Tempo zero; Tratamento 4, 30 dias; Tratamento 7, 60 dias; Tratamento 10, 90 dias.

A **Figura 24** mostra que os dados são estatisticamente iguais ao tempo zero.

Figura 25 – Concentrações de nitrato ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo *software* MINITAB

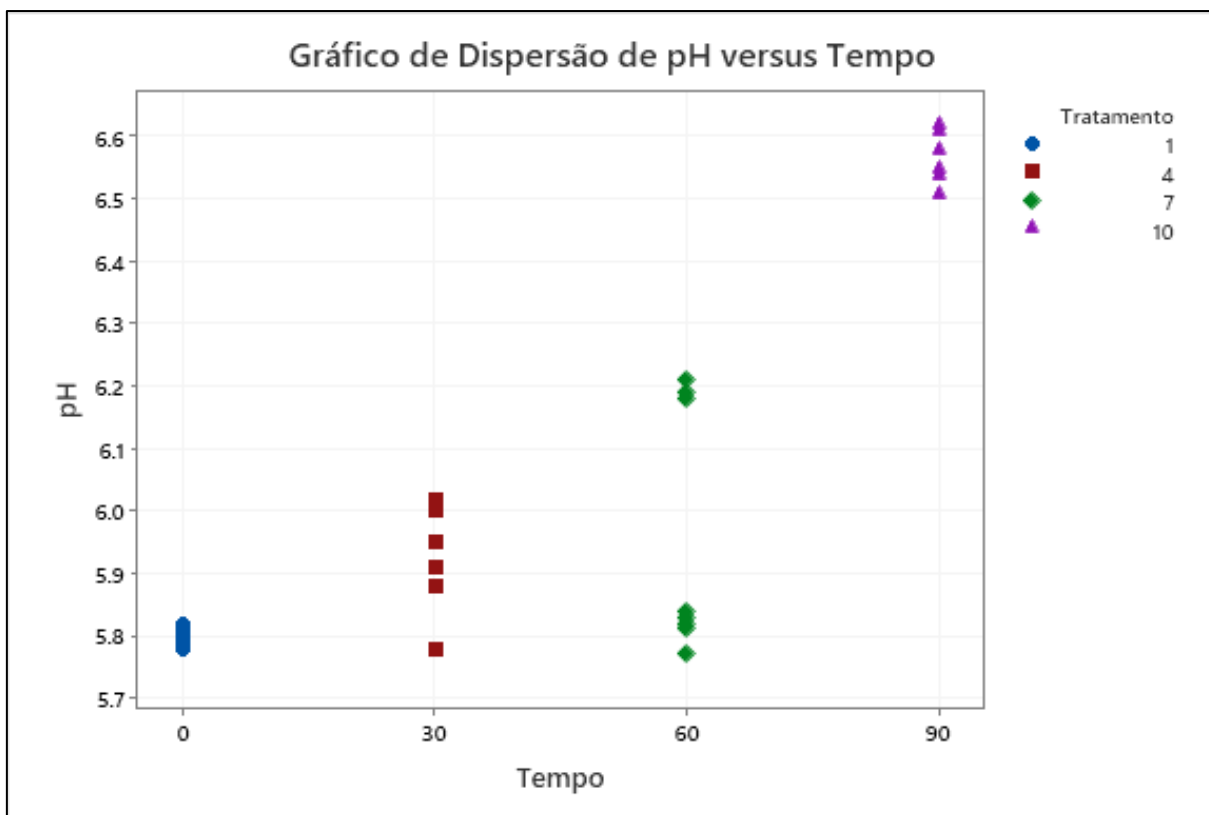


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, Tempo zero; Tratamento 4, 30 dias; Tratamento 7, 60 dias; Tratamento 10, 90 dias.

A **Figura 25** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de nitrato ao longo do tempo.

Figura 26 – Valores de pH ao longo do tempo, armazenados na condição de 28°C no escuro, utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB

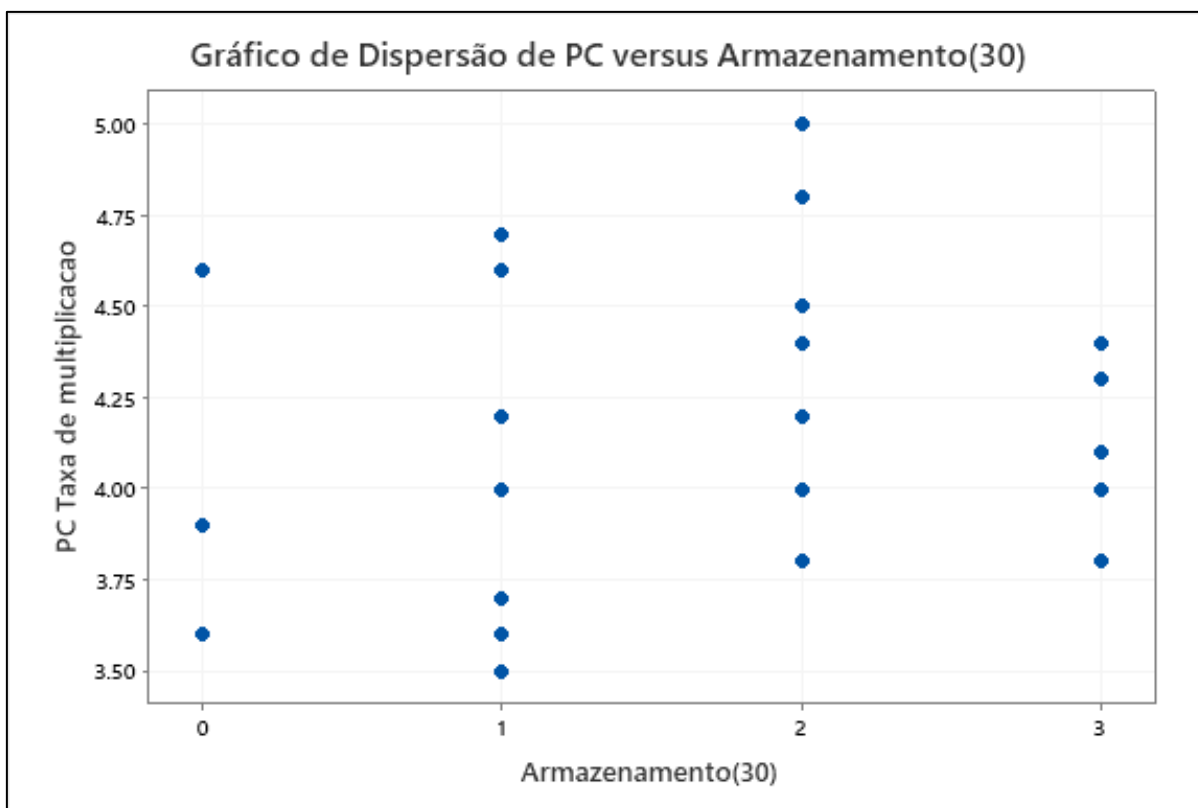


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Tratamento 1, Tempo zero; Tratamento 4, 30 dias; Tratamento 7, 60 dias; Tratamento 10, 90 dias.

A **Figura 26** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de pH ao longo do tempo.

Figura 27 – No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC), utilizado gráfico de dispersão pelo *software* MINITAB, com 30 dias de armazenamento do meio de cultura

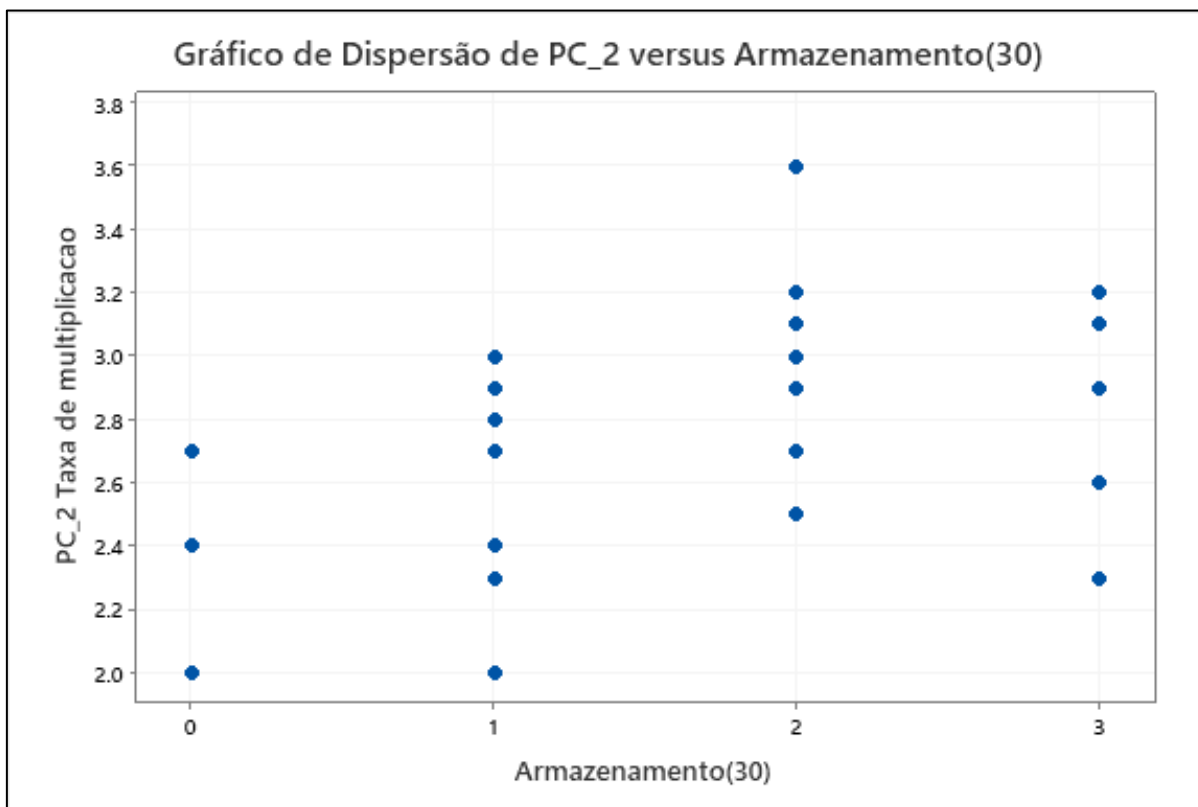


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Armazenamento zero, Taxa de multiplicação do controle; Armazenamento 1, Taxa de multiplicação referente à condição de 20°C; Armazenamento 2, Taxa de multiplicação referente à condição de 28°C com luz; Armazenamento 3, Taxa de multiplicação referente à condição de 28°C sem luz

A **Figura 27** mostra que os dados são estatisticamente iguais, não havendo diferença estatística para os valores de PC nas três condições testadas.

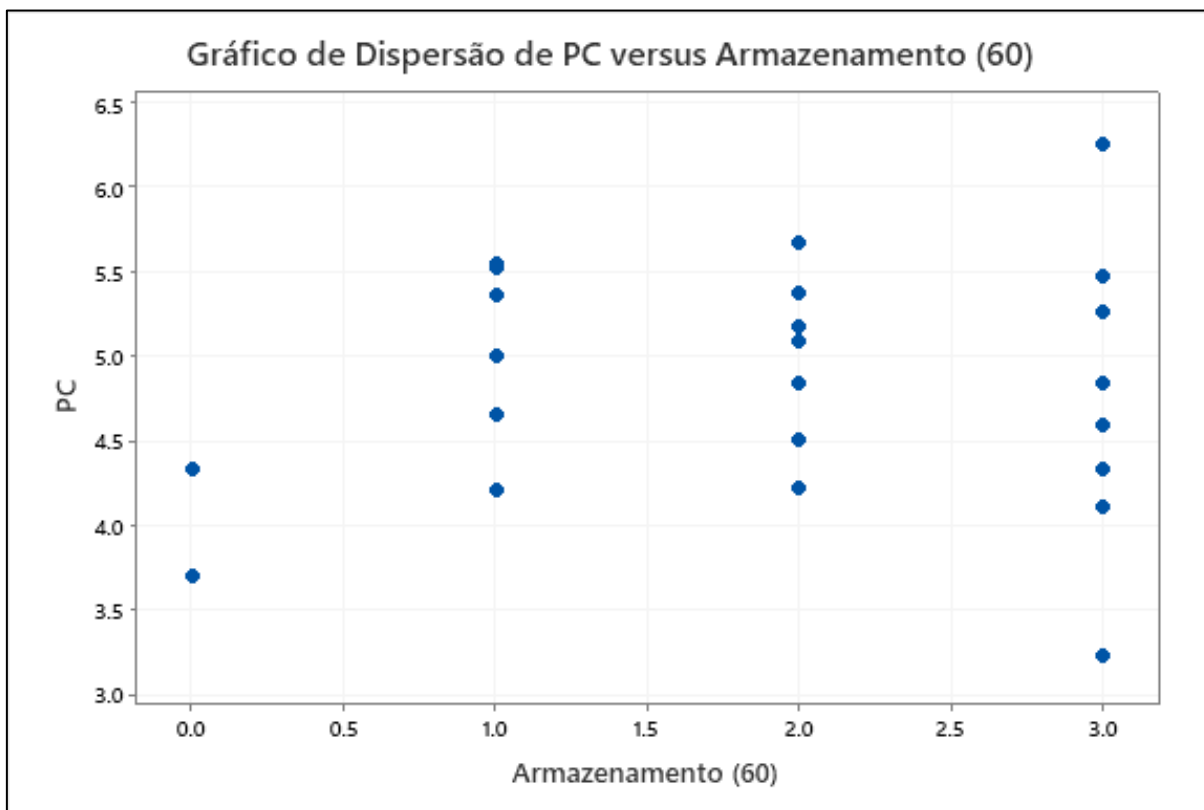
Figura 28 – No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC_2), utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB, com 30 dias de armazenamento



Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 28** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de PC_2 nas três condições testadas.

Figura 29 – No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC), utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB, com 60 dias de armazenamento

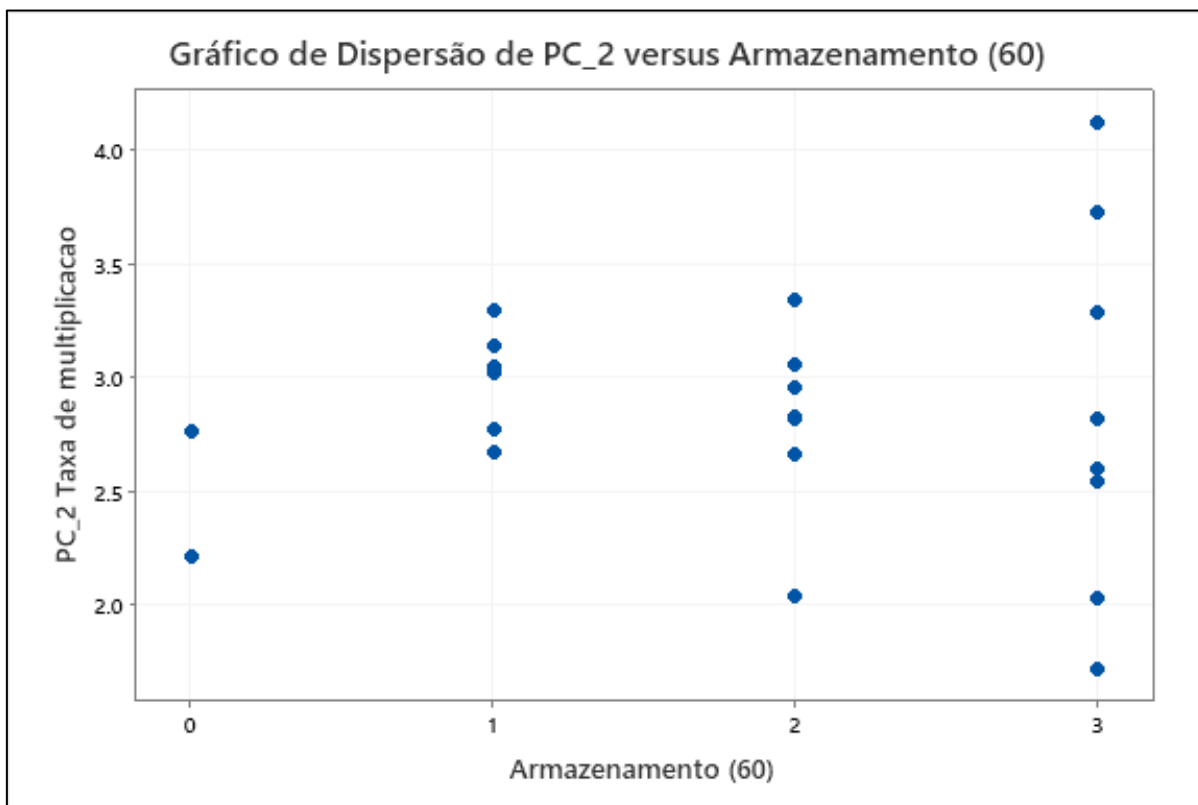


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Armazenamento zero, Taxa de multiplicação do controle; Armazenamento 1, Taxa de multiplicação referente à condição de 20°C; Armazenamento 2, Taxa de multiplicação referente à condição de 28°C com luz; Armazenamento 3, Taxa de multiplicação referente à condição de 28°C sem luz.

A **Figura 29** mostra que os dados são estatisticamente iguais, não havendo diferença estatística para os valores de PC nas três condições testadas.

Figura 30 – No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC_2), utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB, com 60 dias de armazenamento

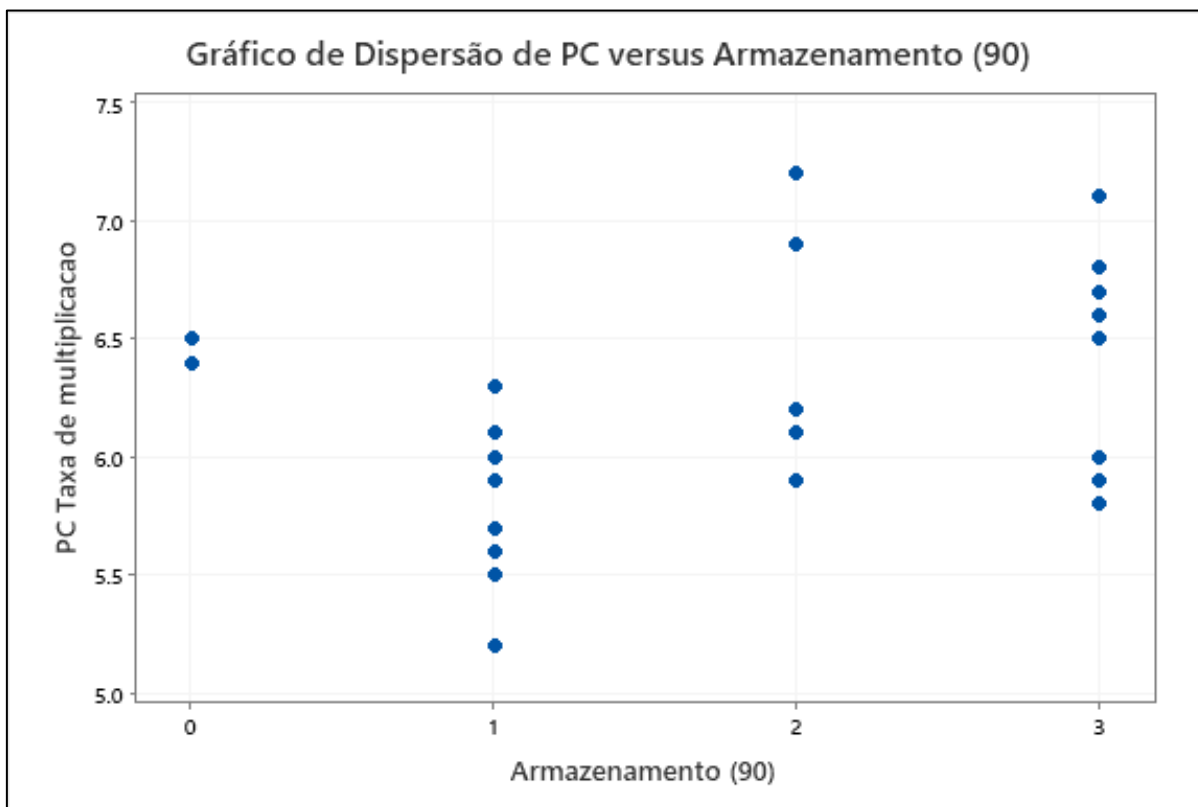


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Armazenamento zero, Taxa de multiplicação do controle; Armazenamento 1, Taxa de multiplicação referente à condição de 20°C; Armazenamento 2, Taxa de multiplicação referente à condição de 28°C com luz; Armazenamento 3, Taxa de multiplicação referente à condição de 28°C sem luz.

A **Figura 30** mostra que os dados são estatisticamente iguais, não havendo diferença estatística para os valores de PC_2 nas três condições testadas.

Figura 31 – No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC), utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB, com 90 dias de armazenamento do meio de cultura

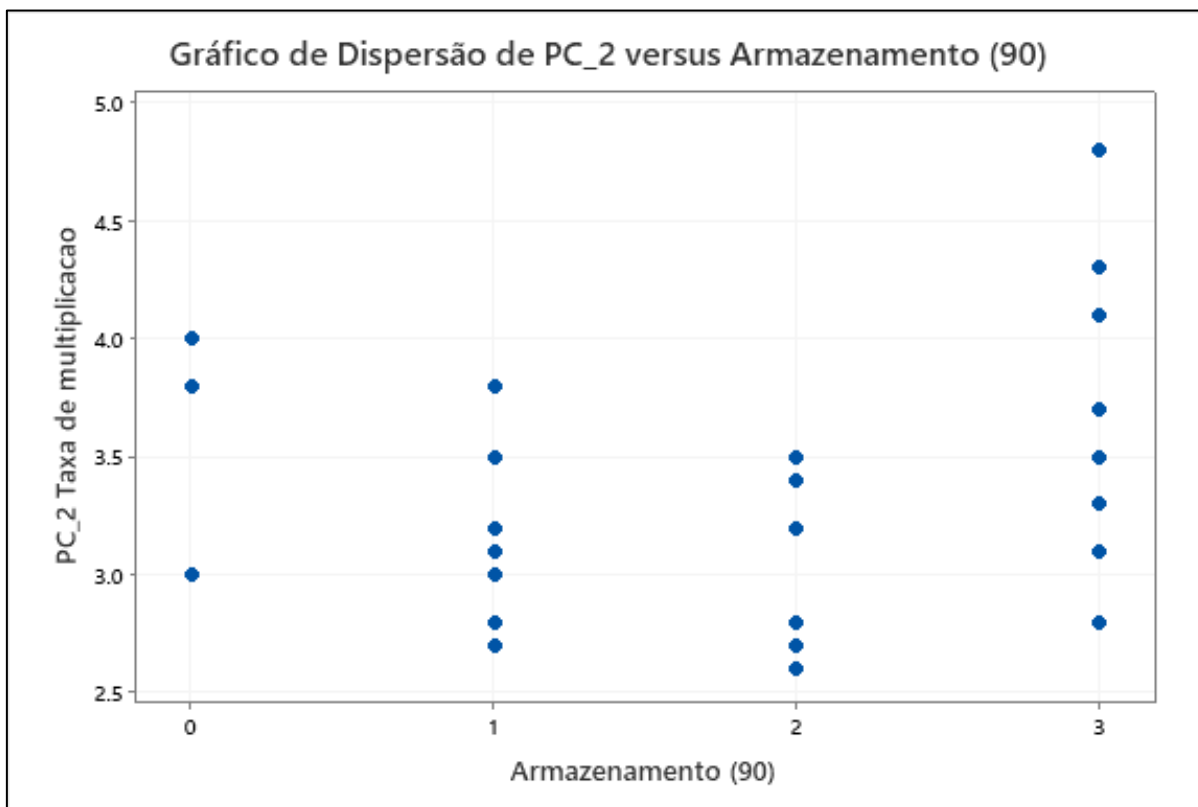


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Armazenamento zero, Taxa de multiplicação do controle; Armazenamento 1, Taxa de multiplicação referente à condição de 20°C; Armazenamento 2, Taxa de multiplicação referente à condição de 28°C com luz; Armazenamento 3, Taxa de multiplicação referente à condição de 28°C sem luz.

A **Figura 31** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de PC nas três condições testadas.

Figura 32 – No eixo (y) tem-se a Taxa de multiplicação e no eixo (x) as três diferentes condições de armazenamento, representados pelo gráfico de dispersão, para o teste de (PC_2), utilizado gráfico de dispersão pelo software MINITAB, com 90 dias de armazenamento



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Armazenamento zero, Taxa de multiplicação do controle; Armazenamento 1, Taxa de multiplicação referente à condição de 20°C; Armazenamento 2, Taxa de multiplicação referente à condição de 28°C com luz; Armazenamento 3, Taxa de multiplicação referente à condição de 28°C sem luz.

A **Figura 32** mostra os dados com diferença estatística (rejeição da hipótese nula) para os valores de PC_2 nas três condições testadas.

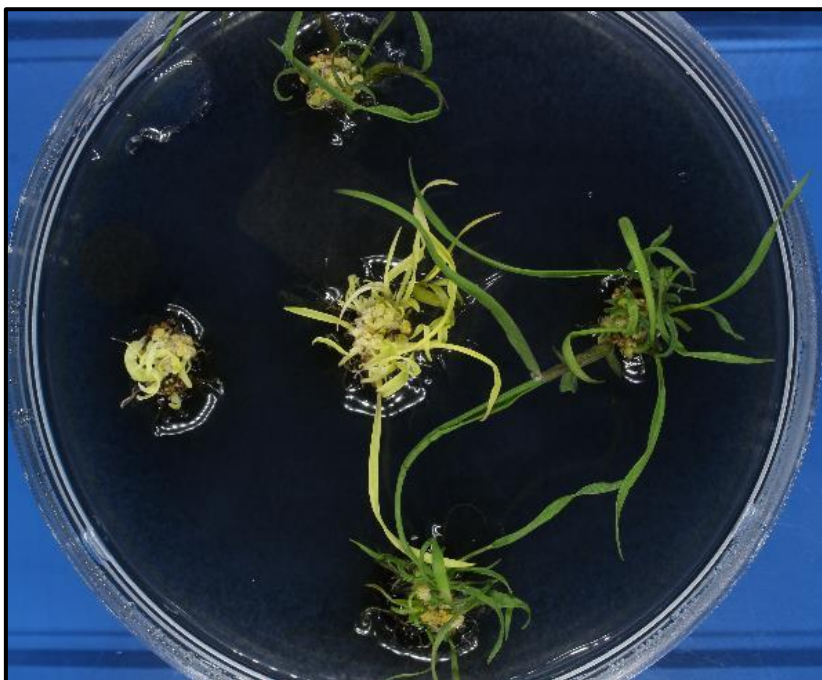
No entanto, com o objetivo de validar a etapa de embriogênese e avaliar o resultado das etapas de multiplicação e maturação, esses testes foram conduzidos até a etapa de germinação, em triplicata. Foram consideradas aceitáveis taxas de germinação acima de 70%.

As **Figura 33** e **Figura 34** mostram que as plantas apresentaram um ótimo resultado de germinação, resultando numa taxa de 79%.

A

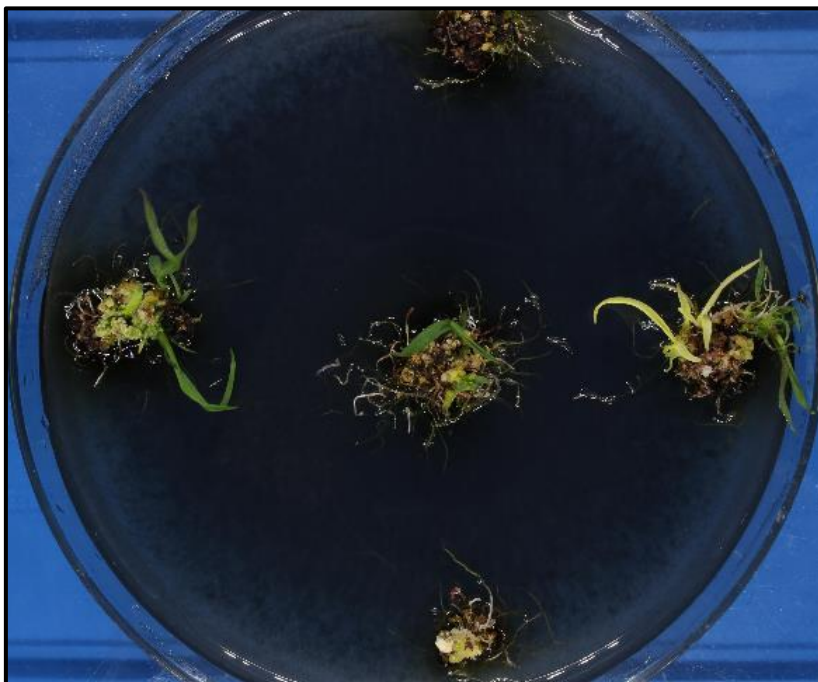
Figura 35 mostra a semelhança entre as taxas de germinação no meio de cultura de 30 dias (86%) e o de 90 dias (79%).

Figura 33 – Imagem referente às plantas multiplicadas no meio de cultura com 60 dias de armazenamento.



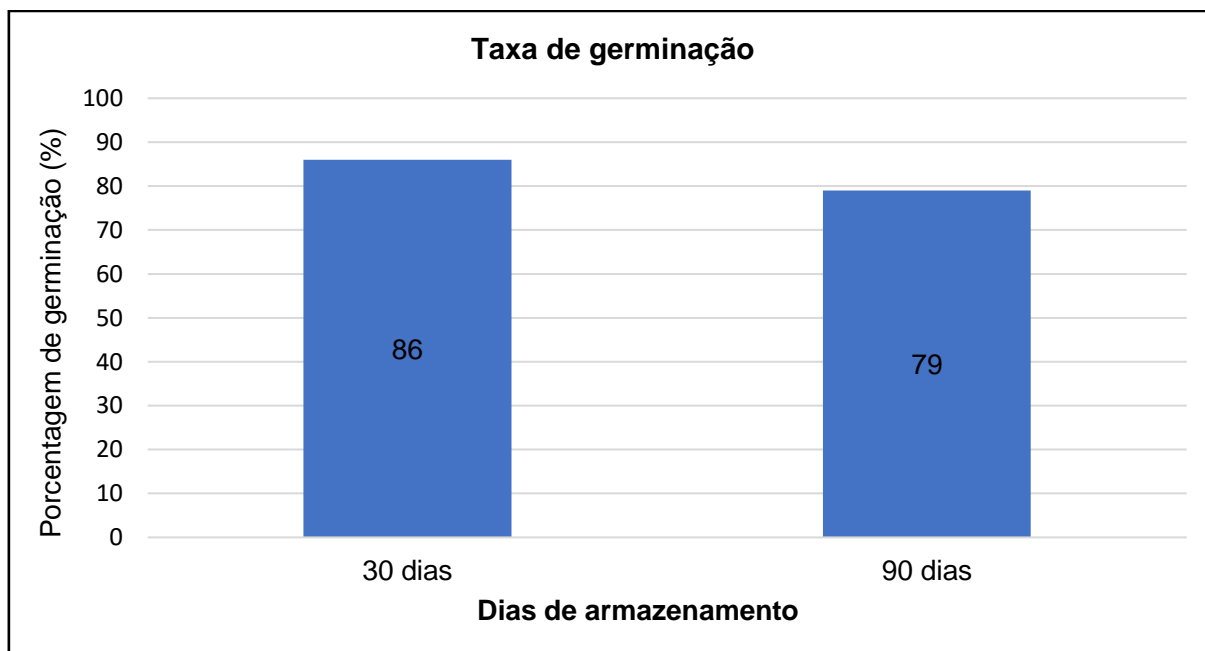
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 34 – Imagem referente às plantas multiplicadas no meio de cultura com 90 dias de armazenamento



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 – No eixo (y) tem-se a porcentagem de germinação e no eixo (x) os dias de armazenamento, mostrando que em ambas as condições armazenadas as taxas de germinação estão acima de 70%



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa maneira, considerando essa elevada taxa de germinação na etapa final do processo de embriogênese com o meio de cultura 1493 com 90 dias, avaliou-se a

possibilidade de aprovar a extensão do prazo de validade de 60 para 90 dias. Para que seja validada essa conclusão, decidiu-se pela continuidade desses testes junto à linha de produção do CTC, comparando meios de cultura com 90 dias com outros meios frescos controles conduzidos em paralelo.

6 CONCLUSÕES

Como mostrado no item “Resultados e discussões”, os resultados das variáveis estudadas inicialmente pareceram bastante semelhantes entre si.

O protocolo elaborado mostrou-se parcialmente eficaz para o atingimento do objetivo proposto, possibilitando analisar o desempenho do meio de cultura líquido sobre os parâmetros químicos e biológicos propostos e mostrados.

O estudo de estabilidade do meio de cultura líquido acondicionado nas três diferentes condições, e no prazo de 90 dias de armazenamento foi concluído com resultados insatisfatórios quanto aos critérios de aceitação estabelecidos nos parâmetros químicos e microbiológicos em todos os intervalos de tempo e condições de incubação.

De acordo com os resultados obtidos com a avaliação estatística feita pelo teste de hipóteses notou-se que, majoritariamente, os dados são estatisticamente iguais ao tempo zero. Contudo, parâmetros como o pH; nitrato; maltose armazenada a 28°C com luz; manitol armazenado a 28°C no escuro e 20°C, PC e PC2 apresentaram diferenças entre os diferentes períodos de armazenamento. No entanto, a exposição do material vegetal ao meio 1493 com 90 dias de armazenamento obteve uma taxa de germinação de 79%, a qual é considerada muito boa no processo de embriogênese somática. Destarte, faz-se necessária a inclusão da taxa de germinação como parâmetro da metodologia aplicada.

Infere-se que durante o tempo de estudo de 90 dias em diferentes condições de temperatura e armazenamento, as características que influenciam no desenvolvimento do meio de cultura permaneceram aceitáveis dentro das especificações estabelecidas internamente na empresa (CTC), sem interferir nas propriedades de funcionamento, gerando plantas com elevado potencial de germinação.

Para fins de estudos de estabilidade e proposição de um maior prazo de validade concluiu-se inaceitável a extensão do prazo de validade de 60 para 90 dias,

pois as avaliações não realizadas por cromatografia foram reprovadas estatisticamente, utilizando um intervalo de confiança de 95% no *software* estatístico.

Essa possibilidade de extensão da validade do meio de cultura 1493 implicaria em uma considerável redução de custos onde, se considerarmos uma produção na safra de 5.000,00 litros e o custo estimado a R\$ 40,00 litro, com descartes 30% sobre a produção, seria possível economizar R\$ 60.000,00 ano/safra. Além disso, possibilitar-se-ia o atendimento a eventuais demandas (estoque estratégico) e flexibilização das atividades de rotina.

Em conclusão, aconselha-se o emprego da presente metodologia utilizada para o meio de cultura 1493 e para outros meios de cultura líquidos envolvidos no processo de embriogênese bem como a validação dessa metodologia através da continuidade desses testes nas linhas de produção do CTC.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O desenvolvimento do presente estudo foi uma iniciativa de pesquisa sobre as etapas que envolvem o controle de qualidade dos lotes meios de cultura 1493. Ainda existem muitas melhorias a serem realizadas, o que amplia a possibilidade de estabelecer a validade para outros meios de cultura tanto líquidos como sólidos, devido às diferenças na sua composição. Nesse sentido, há a perspectiva de esse tipo de avaliação se tornar um processo constante no laboratório, ampliado para todos os meios de cultura preparados.

REFERÊNCIAS

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. Organ. Cult.* v. 37, p. 115-123, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.

COLLADO, R.; BARBÓN, R. Embriogénesis somática directa en *Swietenia macrophylla* King. *Biotecnología Vegetal*, v. 6, n. 2, p. 67-71, 2006.

CURTIS, W. R.; EMERY, A. H. Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnol Bioengineering*, v. 42, p 520-526, 1993.

DENCHEV, P.; KUKLIN, A. I.; SCRAGG, AH. Somatic embryo production in bioreactors. *Journal of Biotechnology*, [s.l.], v. 26, n. 1, p.99-109, out. 1992. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90071-g](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656(92)90071-g)>. Acesso em: 28 mai. 2021.

DERIK, J; PIQUERAS, A; DEBERGH, P.C. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, v. 47, p. 269-278, 1997.

DILLEWIJN, C. Van. **Botany of Sugar cane**. Wageningen: Veenman & Zonem, 1952.

EIBL, R.; EIBL, D.; PORTNER, R.; CATAPANO, G.; CZERMAK, P. **Cell and Tissue Reaction Engineering**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.

ENDRESS, R. **Plant Cell Biotechnology**. Springer, Heidelberg, 1994.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cellular Research*, v. 50, p. 151-158, 1968.

GUERRA, M.; NODARI, R. **Apostila de Biotecnologia 1 – Cultura de tecidos vegetais**. Florianópolis: Steinmacher, 2006.

HILTON, M.; WILSON, P. Growth and uptake of sucrose and mineral ions by transformed root cultures of *Datura stramonium*, *Datura candida* x *aurea*, *Datura wrightii*, *Hyoscyamus muticus* and *Atropa belladonna*. *Planta Med.*, aug, v. 61, p. 345-50, 1995. doi: 10.1055/s-2006-958097. PMID: 17238087. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17238087/>>. Acesso em: 28 mai. 2021.

- JHONATAS, S. **Notícias Agrícolas** Disponível em:
<<https://www.novacana.com/tag/339-IBGE>>. Acesso em: 28 mai. 2021.
- KAYIN, M.; KOC, N. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. **Scientia Horticulturae**, v. 109, Amsterdam, p. 29-34, 2006. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/248477104_The_effects_of_some_carbohydrates_on_growth_and_somatic_embryogenesis_in_citrus_callus_culture/link/5a700c78458515015e61ef23/download>. Acesso em: 28 mai. 2021.
- KREIS, W; BARON, D; STOLL, G. **Biotechnologie der Arzneistoffe**. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2001.
- MURASHIGE, T, SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAGAO, E. **Efeitos da sacarose, nitrogênio inorgânico e ácido indolbutírico na propagação in vitro do porta-enxerto Poncirus trifoliata (L.) Raf.** 1993. 56f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1993.
- PERES, A; FIEGENBAUM, M; TASCA, T. **Manual de consulta rápida microbiologia**. Porto Alegre: Metodista, 2007.
- SAITO, K.; MIZUKAMI, H. Plant cell cultures as producers of secondary metabolites. OKSMAN-CALDENTY K.; BARZ, W. (Ed.). **Plant Biotechnology and Transgenic Plants**. New York: Marcel Dekker, p. 77–109, 2002
- SKOOG, D.; WEST, D.; CROUCH, S. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008
- SNYMAN, S. et al. Applications of in vitro culture systems for commercial sugarcane production and improvement. **Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 2, p.234-249, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/225112210_Applications_of_in_vitro_culture_systems_for_commercial_sugarcane_production_and_improvement>. Acesso em: 28 mai. 2021.
- SUTTON, S. Quality Control of Microbiological Cultura Media. **Pharmaceutical Microbiology PMC Newsletter**, v12, n. 1, 2006.
- WILHELMSON, A.; HAKKINEN, S. et al. Heterologousexpression of Vitreoscilla haemoglobin (VHb) and cultivation conditions affect the alkaloid profile of Hyoscyamus muticus hairy roots. **Biotech Program**, v. 22, p.350-58, 2006.
- ZIMMERMAN, R. Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops. Plant Cell Tiss. **Organ. Cult.** v. 43, p. 207-213, 1995.