SÉRIES EM BIOTECNOLOGIA

volume I

Tecnologia de Bioprocessos

P 436 t

Pereira Jr., Nei. (editor-autor)
Tecnologia de bioprocessos / Nei Pereira Jr., Elba Pinto da Silva Bon, Maria Antonieta Ferrara. – Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.
62 p.: il. – (Séries em Biotecnologia, v. 1)

ISBN 978-85-903967-2-7
Inclui bibliografia.

1. Bioprocessos. 2. Tecnologia. 3. Bioprodutos. I. Bon, Elba Pinto da Silva. II. Ferrara, Maria Antonieta.
III. Título. IV. Série.

CDD 600

Biblioteca Nacional

ISBN 978-85-903967-2-7

BREVE NOTA BIBLIOGRÁFICA SOBRE OS AUTORES

Nei Pereira Jr é Professor Titular do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Possui os títulos de Engenheiro Químico (EQ-UFRJ, 1977); *MSc* em Tecnologia de Processos Bioquímicos (EQ-UFRJ, 1982) e *PhD* em Biotecnologia (The University of Manchester, UK, 1991). Desde 1991, vem liderando projetos de Pesquisa & Desenvolvimento & Inovação nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos da UFRJ, onde já orientou 65 teses (43 *MSc* e 22 *DSc*). Coordena as seguintes linhas de pesquisa: Biotecnologia de Lignocelulósicos; Processos com Microrganismos Recombinantes; Biotecnologia Ambiental; Floculação/Imobilização de Células e Enzimas; Tecnologia da Produção de Antibióticos; Produção de Alimentos Funcionais; Gestão Tecnológica e Tratamento/Minimização de Resíduos e Efluentes Industriais. Atualmente, orienta 05 estudantes de mestrado e 08 de doutorado. Já publicou mais de 200 trabalhos (artigos em periódicos indexados e trabalhos em eventos científicos) e 07 patentes, uma delas relacionada à produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar via hidrólise enzimática de celulose, trabalho realizado para a PETROBRAS que resultou na patente de número 1000 da empresa. Também desenvolve trabalhos cooperativos com instituições de ensino e pesquisa nacionais e internacionais, bem como com empresas. É bolsista do CNPq (Produtividade em Pesquisa) e da FAPERJ (Cientista do nosso Estado) em reconhecimento as suas contribuições ao desenvolvimento da ciência e tecnologia nacionais, assim como na formação de recursos humanos altamente capacitados. Ele foi recentemente agraciado com os seguintes prêmios: PETROBRAS Inventor 2005, 2006 e 2007; Tese Ouro (2006), concedido pela Escola de Química por ter atingido a orientação de 50 teses em seu Programa de Pós-graduação e o prêmio nacional da Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM) - Pesquisador de Destaque 2006.

Elba Pinto da Silva Bon é Professora Associada do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). É graduada em Ciências Biológicas (UERJ, 1970), com Mestrado em Bioquímica (UFRJ, 1974) e em Engenharia Bioquímica (UMIST-UK, 1987), Doutorado em Engenharia Bioquímica (UMIST-UK, 1991) e Pós-Doutorado no Departamento de Biologia do *Massachusetts Institute of Technology* (MIT, Cambridge, USA, 1995). É a coordenadora do Laboratório de Tecnologia Enzimática do IQ/UFRJ, onde atua nas áreas de Microbiologia Aplicada, Biocatálise e Regulação do Metabolismo por Nitrogênio, com ênfase a produção e uso de enzimas industriais e especiais e regulação da expressão gênica. Já orientou 27 teses (15 *MSc* e 12 *DSc*) e atualmente, orienta 03 estudantes de mestrado e 02 de doutorado. Coordena projetos de pesquisa desenvolvidos em colaboração com o Instituto Nacional de Tecnologia - MCT e a Fundação Oswaldo Cruz - MS. Já coordenou ou coordena projetos de pesquisa com colaboração internacional com Portugal, Alemanha e Suécia. É coordenadora científica e coordenadora setorial da área de Produção de Celulases do Projeto Bioetanol. Atua também na área de políticas de Ciência e Tecnologia tendo estruturado e organização muitas edições do evento ENZITEC. Participa das atividades do Fórum de Biotecnologia do Governo Federal, como contratada pelo CGEE na área de Enzimas Industriais e Especiais.

Maria Antonieta Ferrara é Pesquisadora do Instituto de Tecnologia em Fármacos de Far-Manguinhos / Fundação Oswaldo Cruz. Possui graduação em Química (IQ/UFRJ, 1974), Mestrado (EQ/UFRJ, 1988) e Doutorado (EQ/UFRJ, 2004) em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Tem experiência nas áreas de Microbiologia, com ênfase em Bioprocessos e de Tecnologia Enzimática, atuando principalmente nos seguintes temas: produção de enzimas, produção de metabólitos microbianos bioativos, produção de proteínas heterólogas por *Pichia pastoris*, bioconversão, enzimas terapêuticas, fungos endofíticos e pré-tratamento e hidrólise enzimática de biomassa vegetal.

APRESENTAÇÃO

A Biotecnologia Moderna oferece inovadoras possibilidades para a produção de substâncias químicas e processos mais limpos. Em seu cerne está o princípio de se trabalhar em harmonia com o mundo natural. A Biotecnologia tem soluções para atender à humanidade em suas mais diferentes necessidades (alimentos, energia, medicamentos), bem como suplantar tecnologias que poluem a biosfera ou que contribuam para a depleção de fontes finitas. No entanto, a indústria, a comunidade científica e o governo necessitam trabalhar em conjunto para que o Brasil possa lançar mão plenamente do potencial da Biotecnologia, a fim de alcançar sua sustentabilidade industrial/econômica/ ambiental e permitir que o país siga a sua vocação natural para essa área.

É neste contexto, que lançamos a primeira versão das ***Séries em Biotecnologia*** *com a intenção de disponibilizar material instrucional a estudantes que tencionem atuar profissionalmente nesta importante área.*

Esta primeira edição apresenta conceitos e fundamentos necessários para uma melhor compreensão das diferentes etapas que compõem a ***Tecnologia de Bioprocessos****, com o objetivo de fornecer aos estudantes uma visão global e integrada desta temática, imprescindível quando se pretende transformar conhecimento em realidade produtiva. No entanto, de caráter introdutório e cunho aplicado, não tem a pretensão de ser uma apresentação exaustiva sobre o assunto. Na realidade, são notas de aulas que temos a intenção de transformar em séries didáticas, de forma a colocar o estudante em contato com os problemas e desafios da Biotecnologia, quer seja na área acadêmica ou no setor industrial. Esperamos que o conteúdo desta edição proporcione aos leitores uma visão abrangente da área para conhecimento e reflexões.*

Estamos convictos da importância da Biotecnologia para o Brasil, pois ela concilia o desenvolvimento tecnológico com a preservação ambiental. Somos conscientes de que o meio ambiente brasileiro representa um ativo de valor incalculável e contribui decisivamente para a representatividade brasileira no cenário internacional. Para isto registramos nosso firme propósito e compromisso de contribuir efetivamente na formação de massa crítica capacitada para atuar nesta importante área, permitindo a inserção desses profissionais em um mercado cada vez mais competitivo e regulador em termos de produtos e processos.

Os Autores

ÍNDICE

Tópico	**Página**
1. A Biotecnologia Microbiana: Conceitos e Aplicações	7
Biotecnologia de Bactérias	10
Biotecnologia de Leveduras e Fungos Filamentosos	12
Tecnologia do DNA Recombinante	14
2. Bioprocessos	18
3. Agente Biológico: Características	21
4. Nutrição dos Microrganismos	23
Fontes de Energia	23
Fontes de Carbono	23
Fontes de Nitrogênio	24
Fontes de Minerais	24
Fatores de crescimento	25
5. Matérias-Primas Glicídicas	25
6. Meio de Cultivo	27
Otimização do meio de cultivo	29
Formulação de meio de cultivo com base na composição centesimal de microrganismos	31
7. Esterilização de Meios e Equipamentos	33
8. Biorreator	35
9. Modos de Operação de Bioprocessos	41
Quanto à condução	41
Quanto ao desenvolvimento do agente microbiano	45
Quanto ao suprimento de oxigênio	47
10. Processos de Separação e Purificação de Produto	50
11. Extrapolação de Escala	50
12. Tratamento Biológico de Resíduos e Efluentes	53
13. Considerações Gerais	57
14. Referências Bibliográficas Recomendadas	58

TECNOLOGIA DE BIOPROCESSOS

Nei Pereira Jr.[1]; Elba Pinto da Silva Bon[2]& Maria Antonieta Ferrara[3]

[1] Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos
Escola de Química - CT/UFRJ – ***nei@eq.ufrj.br***
[2] Laboratório de Tecnologia Enzimática
Instituto de Química – CCMN/UFRJ
[3] Instituto de Tecnologia em Fármacos
Farmanguinhos/FIOCRUZ

1. A Biotecnologia Microbiana: Conceitos e Aplicações

Os vários conceitos da **Biotecnologia** se referem ao uso de células ou sistemas bioquímicos em processos de produção de bens ou de prestação de serviços (Tabela 1). Neste contexto, a Biotecnologia tem papel destacado, sob o ponto de vista histórico e tecnológico, visto que os primeiros processos industriais basearam-se na ação de microrganismos e a grande maioria daqueles consagrados utiliza microrganismos nativos ou modificados geneticamente.

A Biotecnologia apresenta caráter inter e multidisciplinar, necessitando aqueles que militam nesta área de conhecimentos fundamentais em Bioquímica, Genética, Microbiologia Aplicada e Engenharia Bioquímica, a fim de se ter uma maior compreensão sobre a atividade do biocatalisador e buscar suas melhores condições de desempenho em biorreator (otimização). Outras ferramentas como a Modelagem e a Simulação, bem como o Controle e a Instrumentação são "peças-chaves" na otimização de Bioprocessos.

Trata-se de uma área muito extensa, conforme exemplificado a seguir, para processos, produtos e serviços: diferentes microrganismos são utilizados para a produção de substâncias de interesse comercial, como: antibióticos, ácidos orgânicos, solventes, enzimas e biocombustíveis por processos fermentativos. O produto pode ser ainda o próprio microrganismo, como a produção de levedura de panificação e inoculantes agrícolas, ou as células microbianas podem ser utilizadas em processos de biotransformação, como por exemplo, para a produção de esteróides, aromas e fragrâncias. Além da produção de bens de consumo, os microrganismos são também utilizados em processos de tratamento de resíduos e efluentes urbanos e industriais, na recuperação de metais, tais como cobre, chumbo e urânio, ou em processos de biorremediação de solos contaminados. Os principais produtos da Biotecnologia podem ser agrupados de acordo com o seu uso, em produtos da indústria farmacêutica (antibióticos, hormônios, vacinas, vitaminas e proteínas terapêuticas humanas), da indústria de alimentos (aminoácidos, flavorizantes, polissacarídeos e gomas xantana) e da indústria química (etanol, acetona, butanol, glicerol, ácido láctico, ácido cítrico, poliésteres, inseticidas microbianos). Como as enzimas microbianas são utilizadas em diferentes segmentos industriais, não é conveniente classificá-las de acordo com a sua aplicação. Em decorrência das várias aplicações de seus produtos, a Biotecnologia insere-se em uma gama de segmentos industriais (Figura 1).

Tabela1: Definições de Biotecnologia.

DEFINIÇÃO	REFERÊNCIA
"Conjunto de processos microbianos e outros processos bioquímicos desenvolvidos em escala industrial"	Stenesh (1989)
"Uso de organismos vivos para produzir produtos benéficos para a espécie humana"	Glazer & Nikaido (1995)
"Integração de ciências naturais e de ciências da engenharia visando à aplicação de organismos, células, derivados celulares e análogos moleculares para produtos e serviços"	Smith-Doerr *et al.* (1997)
"É toda tecnologia de processo ou produto que lance mão, em pelo menos uma de suas etapas, da ação de microrganismos, células animais ou vegetais, ou de substâncias produzidas por estes agentes biológicos, sendo caracterizada por sua multidisciplinaridade"	Rehn & Reed (1993)
"Conjunto de tecnologias habilitadoras (enabling technologies), que possuem em comum o uso de células ou moléculas biológicas para aplicações na produção de bens e serviços, em áreas como saúde humana & animal, agricultura, energia e meio ambiente"	Marx (1989)

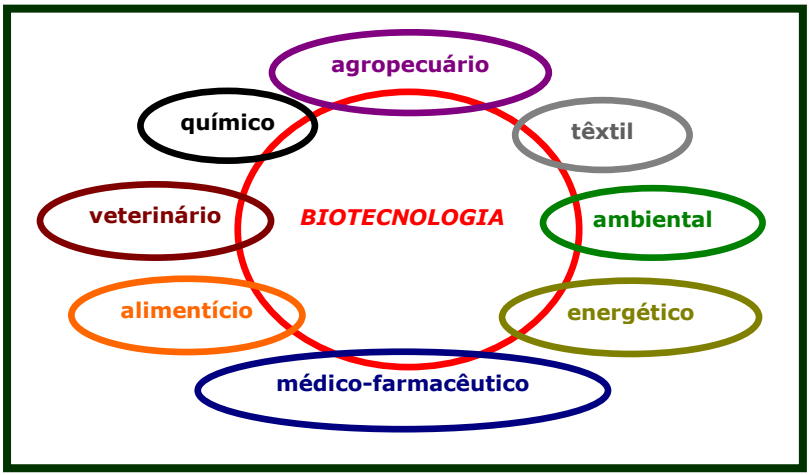


Figura 1: Inserção da Biotecnologia em diferentes setores produtivos.

Todos os microrganismos produzem uma variedade muito grande de enzimas intracelulares em pequenas quantidades, para a catálise das suas reações metabólicas. As enzimas, também denominadas de biocatalisadores, são catalisadores protéicos com características particulares pela sua alta eficiência em condições fisiológicas e alta especificidade, sendo inclusive capazes de catalisar reações estereoespecíficas. Este potencial catalítico é utilizado industrialmente não só nos clássicos processos fermentativos, mas também em processos de biotransformações microbianas para a catálise de reações químicas de difícil ocorrência e de grande importância na indústria farmacêutica. Um exemplo típico refere-se à produção de esteróides utilizando-se *Rhizopus nigricans.* O fungo é, inicialmente, cultivado em biorreatores em condições otimizadas para se atingir altas concentrações celulares. Finda a fase de crescimento celular, o substrato a ser transformado, a progesterona, é adicionado ao biorreator e, após um período de incubação determinado, o produto da biotransformação, a 11α-hidroprogesterona, é extraído com solvente orgânico. Este composto pode ser subseqüentemente transformado, por via química, para a produção industrial de um outro esteróide, a cortisona (Madigan *et al.*, 2000 e Atlas, 1997).

Enquanto nas biotransformações os sistemas enzimáticos de interesse não são extraídos das células, a catálise enzimática industrial usa enzimas microbianas excretadas ou extraídas de microrganismos e com diferentes graus de purificação. As enzimas microbianas excretadas são produzidas em maiores quantidades do que as intracelulares e têm a função principal de degradar macromoléculas presentes no meio ambiente, como a celulose, o amido, a lignina e proteínas, para que seus componentes possam ser absorvidos como nutrientes pelos microrganismos.

As enzimas são utilizadas em muitos segmentos industriais, como o de alimentos e bebidas, de detergentes, têxtil, couro, celulose e papel, química fina, medicamentos e cosméticos e, ainda, em metodologia analítica e em biologia molecular. Amilases, glicose oxidase, pectinases, invertase, renina, naraginase, lipases, proteases, celulases e peroxidases são os biocatalisadores mais utilizados (Atlas, 1997 e Bon & Pereira Jr., 1999). Enzimas são também empregadas como medicamento, como por exemplo, a asparaginase utilizada no tratamento de leucemia. O mercado mundial de biocatalisadores, atualmente avaliado, em US$ 1,5 bilhões tem previsões de crescimento continuado em resposta às demandas por processos industriais com menor impacto ambiental e menor consumo energético e também por produtos de melhor qualidade (Godfrey, 2003).

O desenvolvimento da Biotecnologia tem importância ímpar para o Brasil, devido ao seu baixo impacto ambiental, sendo possível conciliar o desenvolvimento industrial com a preservação de ecossistemas. Sabemos que o Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta e que seu território possui recursos hídricos correspondentes a 12% da água doce do planeta, incluindo o Aqüífero Guarani, que é o maior do mundo. São esses os recursos naturais mais importantes para a humanidade a partir deste século, representando um ativo de valor incalculável. Essas riquezas, patrimônio da sociedade brasileira, devem ser preservadas da poluição ambiental provocada por práticas inadequadas de diferentes setores industriais e agro-industriais.

O equilíbrio natural dos ecossistemas, tão antigo quanto a vida na Terra, pode ser considerado como uma importante área da Biotecnologia Microbiana. Os microrganismos habitam praticamente todos os ambientes terrestres, sendo

transportados por correntes de ar para a atmosfera e de continente para continente. Esses seres microscópios também habitam todos os ambientes marinhos, das superfícies aquáticas ao fundo dos oceanos. Por causa desta característica de crescimento nos mais variados ambientes, os microrganismos, através de suas vias metabólicas intracelulares e de moléculas bioativas excretadas para o meio externo, atuam na manutenção do ciclo biológico de elementos químicos, no controle populacional, na descontaminação de ambientes aquáticos e terrestres e na disponibilização de nutrientes para diferentes formas de vida. Estas tarefas gigantescas, inestimáveis e insubstituíveis não são facilmente perceptíveis, correndo o risco de não serem adequadamente protegidas. Embora a ação antropogênica venha interferindo de forma negativa no *modus operandi* dos ecossistemas e, portanto, no seu equilíbrio, as populações microbianas que habitam o nosso planeta continuam alicerçando a manutenção da vida na Terra.

O fantástico potencial metabólico envolvido na síntese e degradação das mais variadas estruturas químicas por bactérias, fungos, algas e protozoários está distribuído em microrganismos com características fisiológicas muitas vezes peculiares. As bactérias, por exemplo, são encontradas nos mais diferentes climas e microambientes do planeta, alguns considerados inóspitos. Bactérias halofílicas vivem em ambientes aquáticos com alto teor salino, como o Mar Morto, as termofílicas, em fontes termais, em temperaturas entre 80^0C e 100^0C e as barofílicas se adaptaram às enormes pressões das profundezas do mar. Adicionalmente, algumas bactérias são parasitas de tecidos animais e vegetais e algumas vivem em consórcio com outros microrganismos, plantas e animais.

Biotecnologia de Bactérias

Embora as bactérias sejam mais conhecidas como microrganismos patogênicos, a grande maioria é inofensiva e inclusive benéfica a outros seres vivos. Como exemplo, a tarefa fundamental da fixação do nitrogênio atmosférico molecular é levada a efeito por bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Frankia*, que vivem em associações simbióticas com plantas leguminosas, como o feijão e a soja. Estas bactérias, que são encontradas no solo, infectam naturalmente plantas hospedeiras formando nódulos nas raízes onde proliferam. Este mecanismo natural de infecção tem sido utilizado, há quase cem anos, para aumentar a fertilidade do solo através da sua inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio produzidas industrialmente por processos fermentativos (Glazer & Nikaido, 1995).

São também de grande importância biotecnológica cepas selvagens ou modificadas geneticamente de bactérias dos gêneros *Corynebacterium*, *Bacillus* e *Microbacterium* pela capacidade de excretar produtos do seu metabolismo primário, como aminoácidos. A constatação de que *Corynebacterium glutamicum* era capaz de produzir grandes quantidades de ácido glutâmico, quando crescida em glicose, reportada em 1957, resultou na seleção e desenvolvimento de bactérias para a produção de acido L-glutâmico, L-arginina, L-isoleucina, L-histidina, L-leucina, L-lisina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, L-treonina, L-triptofano e L-tirosina, além de vitaminas e nucleotídeos. Fermentações com concentrações de L-tirosina e L-fenilalanina em torno de 25g/L estão descritas na literatura (Piepersberg, 1993). A produção anual de aminoácidos utilizados na indústria de alimentos é estimada em 530 toneladas (Madigan *et al.*, 2000).

Ainda entre as bactérias, encontramos os estreptomicetos, que também apresentam o genoma organizado em um único cromossomo circular. Os estreptomicetos, que são aeróbios, vivem no solo e multiplicam-se formando filamentos ramificados, têm grande importância biotecnológica por produzirem compostos com diferentes atividades biológicas. Assim, esses microrganismos sintetizam moléculas que atuam como antibióticos, antitumorais, imunomoduladores, antiinflamatórios, vasoconstritores e vasodilatadores, além de terem aplicação no tratamento da diabete e como herbicidas. Algumas foram ainda identificadas como inibidores enzimáticos. Estes compostos, que apresentam baixa massa molecular, são excretados em condições de metabolismo secundário, isto é, após a fase de crescimento celular, já tendo sido identificados mais de 10.000 substâncias diferentes (Piepersberg, 1993). Os antibióticos, substâncias que mesmo em baixas concentrações inibem o crescimento de microrganismos patogênicos, são os representantes mais conhecidos deste grupo. Considerando o seu mercado, avaliado em 8 bilhões de dólares (Glazer & Nikaido, 1995), os antibióticos são os produtos mais importantes da biotecnologia microbiana, excetuando-se bebidas alcoólicas e queijos.

O primeiro depoimento oficial sobre a ação do antibiótico penicilina foi feito por Alexander Fleming em 1928, quando relatou a eficiência do filtrado de uma cultura do fungo *Penicillium notatum* como um terapêutico local em uma infecção provocada por *Staphylococcus*. O grande sucesso dos antibióticos no tratamento de infecções bacterianas em comparação aos quimioterápicos, que começaram a ser disponibilizados na mesma época, deveu-se à sua eficiência em comparação à apresentada por drogas como as sulfas. Assim, enquanto concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de sulfonamidas nos pacientes estão na faixa de 10 a 100 μg/mL, o antibiótico penicilina mata bactérias sensíveis como *Streptococcus pneumoniae* com CMIs em torno de 0,01 μg/mL (Glazer & Nikaido, 1995).

Os antibióticos podem ser classificados quanto ao espectro de atividade, antifúngicos, antibacterianos, antivirais, antiprotozoários e antitumorais; quanto a seu mecanismo de ação, interferindo na síntese da parede celular, na síntese de ácidos nucléicos, na síntese de proteínas e nas funções da membrana citoplasmática; e quanto à sua estrutura química, lactonas macrocíclicos, quinonas e relacionados, derivados de aminoácidos e peptídicos, entre outras estruturas.

A grande maioria dos antibióticos com importância comercial é produzida por fungos ou bactérias. Dentre os bacterianos, a maior variedade em estruturas e o maior número de antibióticos são encontrados na classe Actinomycetales, especialmente no gênero *Streptomyces*. Uma relação de alguns antibióticos produzidos por *Streptomyces* está apresentada na tabela 2.

Segundo o Index ABIQUIF 2002, publicado pela Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica, são produzidos no Brasil apenas nove antibióticos, a saber: Ampicilina, Anfotericina B, Cefalexina, Cefalotina, Ceftadizina, Eritromicina, Nistatina, Oxacilina e Penicilina G, de um elenco de trinta e nove considerados essenciais segundo a edição de 2002 da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais publicada pelo Ministério da Saúde. Entre os antibióticos produzidos no Brasil, três (Cefalexina, Cefalotina e Ceftazidna) são produzidos pela empresa multinacional Eli Lilly do Brasil Ltda e seis (Ampicilina, Anfotericina B, Eritromicina, Nistatina, Oxaciclina e Penicilina G), por outra multinacional, o

Grupo Prodotti. Esta relação não inclui a paromomicina, fundamental para o tratamento de doenças negligenciadas de grande ocorrência no Brasil, como a leishmaniose e a tuberculose. O Brasil não produz e nem importa paromomicina, não estando esta droga disponível no mercado nacional. Considerando o acima exposto, o abastecimento de antibióticos para uso humano no Brasil depende integralmente de companhias farmacêuticas internacionais. Em relação à produção de antibióticos para uso animal, o país encontra-se em posição mais confortável, pois existem empresas brasileiras, como a Vallée, ativas no setor.

Tabela 2: Antibióticos produzidos por microrganismos do gênero *Streptomyces*

Antibiótico	**Microrganismo**
Aminosidina	*Streptomyces rimosus*
Cicloheximida	*Streptomyces griseus*
Cicloserina	*Streptomyces orchidaceus*
Cloranfenicol	*Streptomyces venezuelae*
Eritromicina	*Streptomyces erithreus*
Espectinomicina	*Streptomyces spectabilis*
Estreptomicina	Streptomyces *griseus*
Kanamicina	*Streptomyces kanamyceticus*
Lincomicina	*Streptomyces lincolnnensis*
Neomicina	*Streptomyces fradiae*
Nistatina	*Streptomyces noursei*
Ribostamicina	*Streptomyces ribosidificus*
Tetraciclina	*Streptomyces rimosus*

Fonte: Madigan *et al.* (2000) e Vandamme (1984)

Biotecnologia de Leveduras e Fungos Filamentosos

Historicamente, o potencial metabólico dos microrganismos inseriu-se naturalmente em aspectos fundamentais da vida humana. Assim, fungos unicelulares, as leveduras, apresentam peculiaridades metabólicas que permitiram o seu uso de forma empírica na produção do pão e do vinho, alimentos simbólicos na história da humanidade. Os antigos egípcios, no preparo do seu pão, mantinham a massa, uma simples mistura de farinha e água, aquecida até a formação de bolhas, indicativo, hoje sabemos, da liberação de CO_2 em conseqüência da sua fermentação (Panek, 1993). Assim, a contaminação natural, não apenas da massa do pão, mas também de uvas e grãos de cevada, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a sua subseqüente fermentação originaram o vinho e a cerveja que até os dias de hoje fazem parte dos nossos hábitos alimentares. As fermentações industriais com leveduras contribuem atualmente de forma significativa para a economia de vários países. São produzidas por ano centenas de toneladas de leveduras utilizadas para a produção de pão, vinho, cerveja, bebidas destiladas, cidra, saquê e licores. Um outro importante produto industrial derivado de *S. cerevisiae,* cujas células são ricas em proteínas, ácidos nucléicos, vitaminas e sais minerais e apresentam níveis negligenciáveis de triglicerídeos, é o extrato de levedura que tem

importantes aplicações na indústria alimentícia e na de fermentações industriais, servindo como componente do meio de fermentação.

Outras leveduras dos gêneros *Torulopsis* e *Candida,* sendo capazes de crescer em melaço ou em licor sulfítico, subprodutos da fabricação de açúcar e da indústria de papel, respectivamente, são utilizadas para o tratamento destes resíduos industriais. A biomassa microbiana formada pode ser, subseqüentemente, utilizada como fonte de proteína para alimentação animal.

Considerando ainda o potencial biotecnológico das leveduras, microrganismos dos gêneros *Saccharomyces, Kluyveromyces* e *Candida* são capazes de fermentar diferentes açúcares a etanol. É de particular importância para o Brasil a produção de álcool combustível por fermentação da sacarose do caldo da cana-de-açúcar por *S. cerevisiae*, tendo em vista ser o país, juntamente com os Estados Unidos, os maiores produtores mundiais de etanol combustível. Adicionalmente, o etanol está sendo cada vez mais valorizado internacionalmente como combustível líquido, em comparação à gasolina, derivada do petróleo. Sendo produzido a partir de recursos renováveis, não contribui para o efeito estufa e suas conseqüências, como as grandes modificações climáticas que estão afetando negativamente a Terra. Para a produção deste biocombustível, podem ser utilizadas matérias primas sacaríneas (açucaradas), amiláceas e lignocelulósicas, cujas características estão descritas a seguir. Vale ressaltar, entretanto, que bactérias como *Zymomonas mobilis* podem ser também utilizadas em processos fermentativos de produção de etanol.

A diversidade microbiana dos fungos é muito grande, estimando-se um número de espécies entre 100.000 e 250.000. Os fungos destacam-se pela sua capacidade de atacar tecidos vegetais através da secreção de enzimas que degradam biopolímeros tais como polissacarídeos, lignina e proteínas. É familiar a todos nós a colonização de troncos de árvores em decomposição por diferentes espécies de fungos. Este grupo de microrganismos, à semelhança dos estreptomicetos, também produz, em condições de metabolismo secundário, uma variedade de moléculas orgânicas de pequena massa molecular com diferentes atividades biológicas, como a antibiótica.

A comercialização de produtos terapêuticos microbianos iniciou-se há mais de 50 anos com a penicilina. O uso de manipulações genéticas, basicamente técnicas de mutação associadas à otimização do processo fermentativo, incluindo o desenvolvimento de meios, permitiram a melhoria do processo de produção do antibiótico, cuja concentração passou de 0,06 para 26 g/L (Buckland & Lilly, 1993).

Inicialmente empregados apenas como agentes antibacterianos, os produtos do metabolismo secundário de fungos apresentam hoje em dia uma gama bastante diversificada de aplicações, incluindo inclusive o uso como imunossupressores em terapias sofisticadas para pacientes transplantados (Pearce, 1997), conforme mostrado na Tabela 3. Este avanço relaciona-se, em parte, ao atual entendimento da etiologia bioquímica e genética de muitas doenças, o que tornou possível buscar substâncias com ação direcionada para alvos específicos no metabolismo celular. Dentre os antibióticos fúngicos, apenas dez são produzidos comercialmente e somente penicilinas, cefalosporinas, griseofulvinas e os ácidos clavulânico e fusídico são clinicamente importantes.

Tabela 3: Medicamentos produzidos com metabólitos fúngicos e microrganismos produtores.

PRODUTOS FÚNGICOS BIOATIVOS		
APLICAÇÃO	**PRODUTO**	**FUNGO**
Analgésico	Paxisterol	*Penicillium sp.*
Antibacteriano	Crisospermina	*Apiocrea chrysosperma*
	Cefalosporina	*Cephalosporium*
	Penicilina	*Penicillium, Aspergillus*
	Sorrentanona	*Penicillium chrysogenun*
	Equinocandina	*Aspergillus nidulans*
Antifúngico	Ácido zaragózico	*Mycelia sterilia, Leptodontidium elatius, Sporomiella intermedia*
	Esqualestatinas	*Phoma sp.*
	Griseofulvina	*Penicillium griseofurvum*
Controlador da síntese de Colesterol	Compactina	*Penicilium brevicompactum*
	Mevilonina	*Penicillium citrinum*
	Dihidromevilonina	*Aspergillus terreus*
Antitumoral	Taxol	*Pestalotiopsis microspora*
	Calfostina C	*Cladosporium cladosporioides*
	KS 501, KS 502	*Sporothrix sp*
Antiviral	Isocromofilonas	*Penicillium multicolor*
Estimulador da contração uterina	Alcalóides Ergo	*Claviceps purpúrea*
Imunomodulador	FR-901235	*Paecilomyces carneus*
Imunossupressor	Ciclosporina A	*Tolypocladium inflatum* *Trichoderma polysporum*
Tratamento de problemas cardiovasculares	Estachibocinas	*Stachybotrys sp.*
	RES 1214-1/2	*Pestalotiopsis sp.*
Profilático em odontologia	Mutasteína	*Aspergillus terreus*
Tratamento de diabetes	Salfredinas	*Crucibilum sp.*

Fonte: Pearce (1997)

Tecnologia do DNA Recombinante

A *Biotecnologia* pode ser dividida em dois períodos principais: o primeiro anterior ao uso de da tecnologia do DNA recombinante e o segundo após a sua implantação em 1982, a partir dos experimentos realizados em 1973 por Herbert Boyer, Stanley Cohen e seus colaboradores. Enquanto até esta data as bactérias podiam produzir apenas substâncias codificadas no seu próprio genoma, a partir daí células de bactéria modificadas geneticamente por técnicas de Biologia Molecular passaram a produzir substâncias codificadas por genes animais e vegetais. Assim, a aprovação para uso clínico de insulina humana produzida pela bactéria *Escherichia coli*, há mais de vinte e cinco anos, definiu a engenharia genética como um instrumento poderoso para a modificação de microrganismos, de forma a transformá-los em unidades de produção de compostos de interesse. O efeito da tecnologia do DNA recombinante pode ser mais facilmente visualizado

comparando-se o perfil dos principais produtos comercializados antes e após 1982. Até essa data, o mercado mundial de produtos dependentes de Biotecnologia concentrava-se em bebidas alcoólicas, queijos, antibióticos, etanol combustível, xaropes com alto conteúdo de frutose, aminoácidos, levedura de panificação, esteróides, vitaminas, ácido cítrico, enzimas, vacinas e gomas polissacarídicas. Assim, de um mercado total de cerca de 78 bilhões de dólares, 80% relacionavam-se à indústria de alimentos (Glazer & Nikaido, 1995). Embora esta predominância seja uma realidade até os dias de hoje, muitos processos de produção passaram a usar microrganismos modificados por técnicas da Biologia Molecular com ganhos em rendimento e/ou produtividade.

O perfil dos produtos da *Biotecnologia Microbiana* também sofreu uma modificação marcante após 1982 devido ao aparecimento no mercado de uma sucessão de proteínas e peptídeos terapêuticos, como o hormônio do crescimento humano, interferons, fatores de coagulação, eritropoietina e soro albumina, entre outros, produzidos por processos fermentativos. Como a obtenção e purificação destas proteínas e peptídeos, em quantidades relevantes, a partir de tecidos humanos ou animais era muito difícil, os genes humanos que codificam para estes compostos foram clonados em *E. coli* e estes agentes terapêuticos passaram a ser produzidos em grandes quantidades. A produção destas proteínas terapêuticas, por processo fermentativo, depende inteiramente da tecnologia do DNA recombinante.

Embora os processos pioneiros de produção de proteínas heterólogas tenham utilizado *E. coli*, o posterior desenvolvimento de técnicas de Biologia Molecular para leveduras, baseadas em parte nos protocolos utilizados para bactérias, permitiu a sua inserção nestes processos de produção. São considerados marcos da Biologia Molecular de leveduras os trabalhos de Hinnen, Hicks e Fink, "Transformation of yeast" e de Beggs "Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid", ambos publicados em 1978. A partir daí, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, consideradas como GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pelo "Food and Drug Administration" dos EUA, têm sido empregadas na produção de proteínas heterólogas, competindo atualmente com as bactérias pela liderança nesta área.

As vantagens apresentadas pelas leveduras relacionam-se com a sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilações, que não apenas contribuem para que as proteínas heterólogas adquiram a conformação correta, como também para a sua estabilidade, prolongando a meia vida enquanto agente terapêutico. Além disso, diferentemente das bactérias, que precisam ser rompidas para a obtenção da proteína de interesse, as células de levedura são capazes de secretar as proteínas recombinantes, facilitando as etapas subseqüentes de purificação. Assim, a partir da comercialização em 1986 pela companhia Merck, da vacina para uso humano "Recombivax" contra hepatite B, várias outras proteínas terapêuticas heterólogas produzidas por *S. cerevisiae*, como a insulina, produzida pela Novo-Nordisk, passaram a ser comercializadas.

O uso da tecnologia do DNA recombinante em leveduras para a produção de proteínas terapêuticas é uma área em franca expansão, sendo atualmente estudado também em *Kluveromyces lactis, Schizosaccharomyces pombe, Schwanniomyces occidentalis* e *Yarrowia lipolytica.* Neste contexto, têm se destacado as leveduras metilotróficas facultativas *Candida boidinii, Hansenula polymorpha, Pichia methanolica e* principalmente *Pichia pastoris* (Walker, 1998).

Como a *P. pastoris* pode ser facilmente manipulada para produzir proteínas intracelulares ou excretadas em altos níveis, mais de 400 proteínas, da endostatina humana à proteína da seda de aranhas, foram expressas nesta levedura, que é também capaz de processar a proteína heteróloga de forma semelhante à de eucariotos superiores, realizando reações de glicosilação, proteólise e formação de pontes de enxofre.

Os altos níveis de produção de proteínas heterólogas devem-se à utilização do promotor do gene da álcool oxidase I (*AOX1*), eficiente e especificamente regulado, para ativar a expressão do gene de interesse. O promotor do gene *AOX1* é fortemente reprimido em células crescendo em glicose ou na maioria das outras fontes de carbono, mas aumenta a expressão do gene de interesse em torno de 1.000 vezes quando as células são transferidas para metanol. Adicionalmente, como *P. pastoris* é uma levedura que preferencialmente respira em lugar de fermentar, não produz etanol e ácido acético, cuja toxicidade no meio de cultivo impede fermentações com altas densidades celulares, desejáveis para aumentar a concentração da proteína de interesse. Fermentações com *Pichia* podem resultar em concentrações de proteína heteróloga que variam de 15 mg/L, no caso da antitrombina III humana, até 5 g/L para o caso da gelatina sintética, passando, por exemplo, por valores de 1,5 g/L para a insulina humana (Cereghino *et al*., 2002).

Embora a maioria das enzimas industriais seja extracelular e produzida por fungos e bactérias, a tecnologia do DNA recombinante vem recebendo uma atenção crescente para a produção de biocatalisadores, tendo especial importância a expressão heteróloga em leveduras metilotróficas dos gêneros *Pichia, Candida* e *Hansenula.*

Muitos genes que codificam para a síntese de enzimas humanas (glutamato descarboxilase e h-lipase), vegetais (glicolato oxidase de espinafre e malato desidrogenase de melão) e microbianas (dipeptil-peptidase, glicose-oxidase e fitase de *Aspergillus*, glicoamilase de *Rhizopus*, α1,2-manosiltransferase, adenilato quinase, invertase e catalase de *Saccharomyces*), já foram expressas nestas leveduras, indicando a possibilidade de uma acentuada diversificação do uso industrial de biocatalisadores.

Abrindo ainda mais o leque de possibilidades do uso de enzimas, existem biocatalisadores produzidas por microrganismos extremofílicos do grupo *Archea*, que são naturalmente estáveis em condições extremas de temperatura, pH e salinidade. Devido á sua atividade nestas condições, o potencial industrial das extremozimas é muito grande. A *Taq* polimerase de *Thermus aquaticus* e *Puf* polimerase de *Pyrococcus furiosus* apresentam atividade à 95^0C e 100^0C, respectivamente, sendo utilizadas nos procedimentos de PCR (*polymerase chain reaction*) (Atlas, 1997; Gellissen, 2000 e Stetter, 1999).

A Tabela 4 fornece outros exemplos de substâncias produzidas por espécies microbianas naturalmente ocorrentes e recombinantes, agentes dos processos de biotransformação.

Tabela 4: Espécies microbianas usadas na manufatura de produtos comerciais.

Produtos químicos industriais	
Saccharomyces cerevisiae	etanol (de sacarose e glicose)
Kluyveromyces fragilis	etanol (de lactose)
Clostridium acetobulylicum	acetona e butanol
Aspergillus niger	ácido cítrico
Amino ácidos e nucleotídeos flavorizantes	
Corynebacterium glutamicum	L-lisina
Corynebacterium glutamicum	ácido 5' inosínico e ácido 5' guanilínico
Vitaminas	
Ashbya gossypii	riboflavina
Eremothecium ashbyii	riboflavina
Pseudomonas denitrificans	vitamina B_{12}
Propionibacterium shermanii	vitamina B_{12}
Enzimas	
Aspergillus oryzae	amilases
Aspergillus niger	glucoamilase
Trichoderma reesii	celulases
Saccharomyces cerevisiae	invertase
Kluyveromyces fragilis	lactase
Candida lipolytica	lipase
Asperillus niger	pectinases e proteases
Bacillus sp.	proteases
Polissacarídeos	
Leuconostoc mesenteroides	dextrana
Xantomonas campestris	goma xantana
Vacinas	
Corynebacterium diphtheriae	difiteria
Saccharomyces cerevisiae recombinante	hepatite B
Produtos farmacêuticos	
Penicillium chrysogenum	penicilinas
Cephalosporium acremonium	cefalosporinas
Streptomyces sp.	anfotericina B; kanamicinas; neomicinas, estreptomicinas, tetraciclinas; ácido clavulânico etc.
Bacillus brevis	gramicidina S
Bacillus licheniformis	bacitracina
Bacillus polymyxa	polimixina B
Rhizopus nigricans	transformação de esteróides
Arthrobacter simplex	transformação de esteróides
Escherichia coli recombinante	insulina; hormônios de crescimento, interferons
Saccharomyces cerevisiae recombinante	insulina

2. Bioprocessos

Os processos levados a cabo por agentes biológicos são denominados de **Bioprocessos** e definidos como um conjunto de operações que efetuam o tratamento da matéria-prima/resíduo, o preparo dos meios, a esterilização (quando o processo demandar) e a transformação do substrato em produto(s) por rota bioquímica, seguida de processos de separação e purificação de produto(s).

São consideradas expressões sinonímias: processos fermentativos com microrganismos naturalmente ocorrentes ou recombinantes, processos biotecnológicos, processos com células animais ou vegetais, processos enzimáticos ou os tratamentos biológicos de resíduos e efluentes.

A distinção entre Bioprocessos e Processos Químicos está calcada na natureza dos catalisadores utilizados em suas reações. Os Bioprocessos são conduzidos mediante ação de agentes biológicos, sendo, portanto, as transformações catalisadas enzimaticamente. A Tabela 5 mostra as principais características de Bioprocessos e as compara com as dos Processos Químicos.

Bioprocessos conduzidos por microrganismos, tradicionalmente conhecidos como processos fermentativos, são importantes fontes de produtos biológicos usados nas indústrias farmacêutica, química e alimentícia. Na última década observou-se um aumento expressivo na quantidade de bioprodutos comerciais, especialmente metabólitos secundários e proteínas terapêuticas produzidas com tecnologia de DNA recombinante. Verificaram-se, ainda, significativas mudanças na configuração de biorreatores, visando à melhoria de seu desempenho e assegurar operações com maior segurança.

Tabela 5: Bioprocessos *versus* Processos Químicos.

Bioprocessos	**Processos Químicos**
Decorrentes de atividade biológica	Decorrentes de reações químicas
Catalisadores de alta especificidade	Catalisadores não específicos
Condições brandas de T, P e pH	Condições drásticas de T, P e pH
Maiores volumes	Menores volumes
Podem requerer esterilidade	Não requerem esterilidade

Em que pesem as complexidades e particularidades dos Bioprocessos, podemos dividi-los em três estágios (Figura 2). A etapa que antecede a transformação é denominada de à montante (*upstream*), seguida da etapa de transformação propriamente dita e, finalmente, a etapa de à jusante (*downstream*). Há autores que incluem a transformação na etapa de à montante. No entanto, por envolverem diferentes procedimentos, somos pela divisão de um Bioprocesso em três etapas e não em duas.

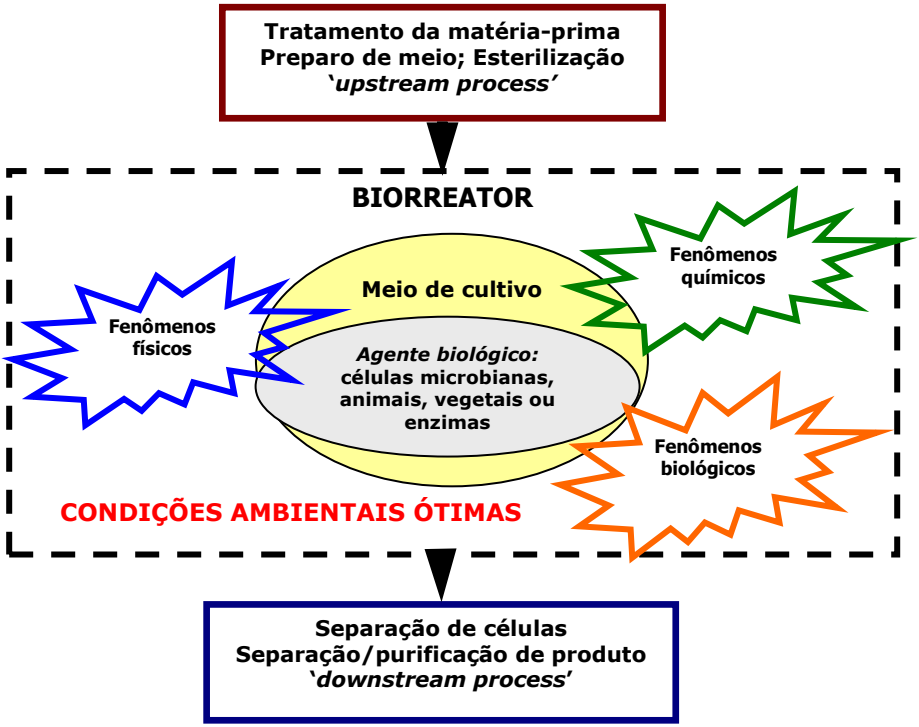


Figura 2: Etapas fundamentais de um típico Bioprocesso.

A Figura 3 apresenta um esquema geral de um Bioprocesso típico, ressaltando que a forma de condução do bioprocesso, a configuração do biorreator, assim como a definição das etapas de recuperação do produto também se constituem em aspectos importantes para se garantir sucesso na operação destes processos. Estas etapas serão descritas posteriormente com maiores detalhes.

Atualmente, ênfase é dada ao desenvolvimento de Bioprocessos que não sejam apenas "cost/effective", mas que também atendam às exigências crescentes de confiabilidade e reprodutibilidade, o que vem aumentando a necessidade de melhoria no monitoramento e controle de tais processos.

Algumas transformações microbianas, analogamente às reações químicas, atingem rendimentos próximos ao máximo estequiométrico (produtos do metabolismo primário), embora apresentando taxas globais de produção baixas. Outras, como as do metabolismo secundário, resultam em baixos valores de rendimento e produtividade, havendo um enorme campo para avanços em ambos os casos. Os progressos serão alcançados através de uma maior compreensão sobre a fisiologia celular e da interação da célula com o ambiente químico e físico no biorreator. É esta combinação, este binômio: célula (ou enzima)/meio ambiente (ou condições reacionais), que define o êxito de um Bioprocesso.

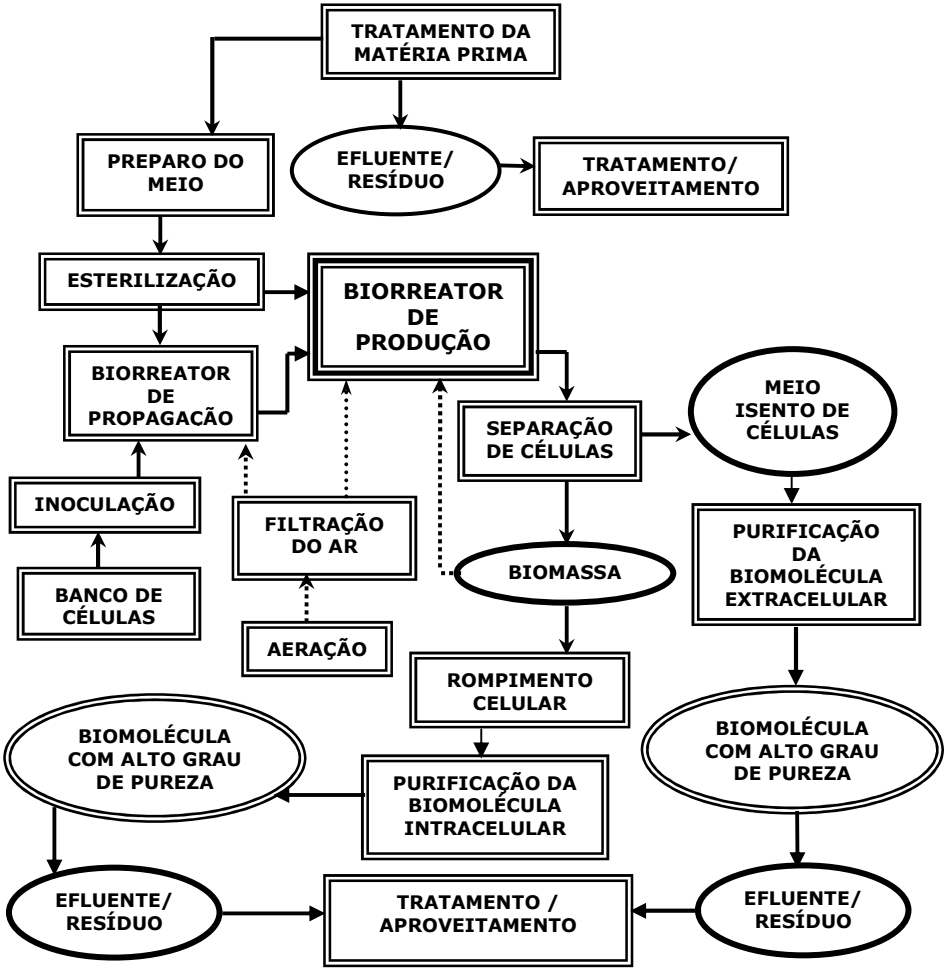


Figura 3: Esquema simplificado de um típico Bioprocesso.

Mais recentemente, o escopo da tecnologia de processos fermentativos ampliou-se para incluir o cultivo de células animais. O cultivo destes agentes biológicos pode ser adaptado a uma cultura em suspensão e, portanto, uma abordagem similar aplicada ao desenvolvimento/melhoramento de processos fermentativos tradicionais pode ser adotada ao cultivo de células animais. Ressalta-se, no entanto, que o fato das células animais serem maiores e mais frágeis do que células microbianas e mais exigentes impõem que tais processos devam ser desenvolvidos e conduzidos com grande conhecimento sobre a fisiologia e morfologia destes agentes biológicos, bem como sobre as características hidrodinâmicas do meio, condições de aeração no biorreator e suas relações com a atividade e viabilidade celular.

A seguir abordar-se-ão os principais aspectos de um bioprocesso, descrevendo características do agente biológico, matérias-primas, preparo do(s) meio(s), biorreator(es) e separação e purificação de produto(s).

3. Agente Biológico: Características

O agente biológico deve ser selecionado, quando se tenciona transferir o bioprocesso para a escala industrial, em função das seguintes propriedades: elevada atividade, ou seja, ser capaz de converter rapidamente o substrato em produto com altos rendimentos, conduzindo a altos valores de produtividade; estabilidade sob condições ambientais extremas (elevada pressão osmótica do meio, elevada temperatura, elevada força iônica), devendo, ainda, ser tolerante e resistente a substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou encontradas em resíduos e efluentes. Técnicas da Biologia Molecular aplicada[1] e da Engenharia Metabólica[2] vêm sendo utilizadas para se maximizar essas propriedades desejáveis em um agente biológico. É importante ressaltar, que estas técnicas devem ser empregadas, quando necessárias, para maximizar o potencial produtor dos agentes biológicos responsáveis pelas transformações. A história da produção de penicilina é um clássico exemplo do impacto de manipulações genéticas associadas ao desenvolvimento de meios para melhoria do processo. A combinação de técnicas de mutação com otimização do processo fermentativo, resultou em um aumento no rendimento em penicilina da ordem de três vezes em magnitude (de 0,06 a 26 g/L). Portanto, conhecer as características/propriedades desses biocatalisadores (bem como melhorá-las) levará a inúmeras vantagens no desenvolvimento de Bioprocessos industriais.

Quando Bioprocessos são realizados por células vivas, uma vez definido o produto ou a atividade de interesse, a próxima etapa deve envolver uma pesquisa na literatura para identificar agentes biológicos portadores da característica desejada ou com potencial de possuí-la, seguida da aquisição de linhagens arquivadas em coleções de cultura e/ou pelo seu isolamento de amostras naturais, seguido de procedimentos de seleção e melhoramento de linhagens produtoras.

No cultivo de células microbianas, animais e vegetais em laboratório é necessário, para se conhecer suas características/propriedades, determinar seu crescimento, bem como monitorar suas conversões. Uma variedade de nutrientes é utilizada para os fins acima referidos, incluindo-se fonte de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oxigênio, vitaminas e sais minerais.

Esses agentes biológicos, particularmente microrganismos utilizados em processos industriais, devem ser adequadamente preservados e conservados

[1] *Biologia Molecular aplicada:* Ramo da Biologia que estuda a origem, transformação e interação dos genes e seus produtos de expressão no indivíduo, população ou espécie, possibilitando o controle a nível genético, a construção de agentes biológicos ótimos e combinações ótimas 'célula-biorreator'.

[2] *Engenharia Metabólica*: combinação de métodos analíticos e métodos matemáticos para quantificar fluxos *in vivo* com o auxílio de técnicas da Biologia molecular, objetivando programar modificações genéticas dirigidas a fim de melhorar propriedades celulares.

como cultura pura. Através de diferentes técnicas é possível manter todas as características da população microbiana de interesse e, dessa forma, sempre que uma nova produção é iniciada a qualidade do produto também é mantida. Assim, a manutenção e a preservação de microrganismos são etapas de extrema importância para assegurar a sua viabilidade e atividade, bem como prevenir mudanças genéticas que podem levar à redução ou perda das propriedades fenotípicas desejadas. Técnicas de manutenção e preservação de microrganismos incluem: repiques periódicos, conservação em parafina, em glicerol, liofilização, criopreservação etc. Estas técnicas estão amplamente descritas na literatura (ver referências bibliográficas recomendadas).

Após procedimento de inoculação, a célula desenvolve seu metabolismo, a fim de produzir energia para suportar suas reações biossintéticas e de manutenção energética. As moléculas-combustíveis (carbohidratos, lipídios, proteínas) utilizadas pela célula contêm elevado nível de energia química, devido ao seu alto grau de ordem estrutural, apresentando, relativamente, baixa entropia. Durante o catabolismo, essas substâncias são degradadas a moléculas menores, como dióxido de carbono, água, álcoois etc. Como resultado dessa transformação, a molécula-combustível sofre uma perda do seu conteúdo de energia livre (forma de energia capaz de realizar trabalho a temperatura e pressão constantes). A energia livre liberada durante as reações do catabolismo, e por isso chamadas de exoergônicas, é conservada na forma de energia química nas ligações covalentes de certos compostos, como o ATP.

Os processos biossintéticos (anabolismo), transporte ativo através da membrana e mobilidade celular envolvem reações endoergônicas (carentes de energia). As células têm suas necessidades atendidas através da energia produzida durante o catabolismo (Figura 4).

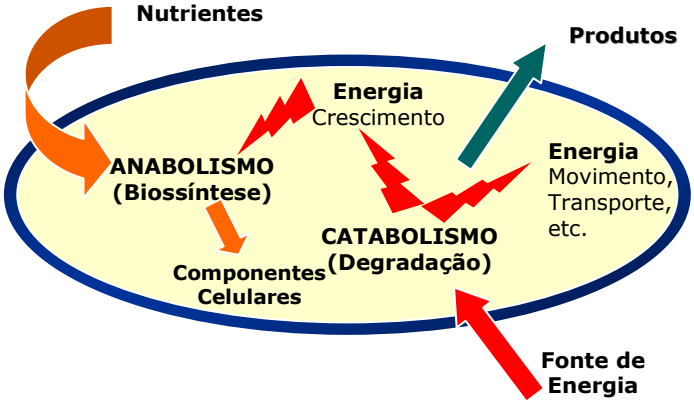


Figura 4: Esquema simplificado do metabolismo celular.

Muitas células vivas necessitam de oxigênio para manutenção de seu metabolismo. Em Bioprocessos conduzidos com microrganismos aeróbios, o oxigênio é suprido ao biorreator, via de regra, com bolhas de ar, através de um compressor, como será visto mais adiante. Já em Bioprocessos anaeróbicos, os microrganismos obtêm o oxigênio metabólico através de substâncias que contêm

oxigênio ligado molecularmente. Nos primeiros, o adequado suprimento de oxigênio para atender a demanda da célula é imperativo, assim como a manutenção de condições anaeróbicas estritas no segundo caso. Se essas exigências não forem atendidas o processo encontra-se com seu potencial limitado, podendo haver desvios no metabolismo celular ou mesmo sua interrupção, com a conseqüente perda da viabilidade celular.

Dentro da concepção de processo integrado, a associação de determinadas características do agente biológico (células ou enzimas), bem como das particularidades do sistema reacional, com os processos de *downstream* tem sido também uma tendência no desenvolvimento e melhoria da operacionalidade de Bioprocessos. Assim, se o agente biológico do processo for um microrganismo portador de propriedades agregativas (floculação), poder-se-ão suprimir equipamentos onerosos de separação de células, e utilizar novas configurações de biorreatores mais compactos e menos intensivos em energia, tornando o processo, conseqüentemente, mais econômico. Associações de sistemas reacionais com separação simultânea de produto(s) podem, também, ser desenvolvidas (imobilização de enzimas em suportes de colunas cromatográficas, sistemas de fermentação acoplados a módulos de membrana e outros à destilação a vácuo), com os conseqüentes benefícios técnicos e econômicos para a operação e a viabilidade dos Bioprocessos.

4. Nutrição dos Microrganismos

As necessidades nutricionais dos microrganismos são diversas, uma vez que estes apresentam diferenças inerentes na sua capacidade de sintetizar os constituintes celulares a partir de nutrientes simples. A demanda por água, fontes de energia, carbono, nitrogênio e elementos minerais, assim como o acesso/utilização de oxigênio, entretanto, é comum a todos os microrganismos.

4.1. Fontes de Energia:

De acordo com a forma pela qual os microrganismos assimilam energia, eles podem ser classificados em:

Fototróficos: possuem pigmentos fotossintéticos que permitem a utilização da luz como fonte de energia. Ex.: algas e bactérias fotossintetisantes.

Quimiolitotróficos: obtêm energia a partir da oxidação de um substrato inorgânico, geralmente específico para o microrganismo em particular, como hidrogênio, enxôfre, amônia, nitritos e sais ferrosos. Ex.: bactérias dos gêneros *Thiobacillus*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Hydrogenomonas* e *Desulphovibrio*.

Quimiorganotróficos: obtêm energia a partir do catabolismo de substratos orgânicos, açúcares em particular. A este grupo pertence a grande maioria dos microrganismos utilizados industrialmente (Madigan *et al*., 2000).

4.2. Fontes de Carbono:

Uma célula típica contém cerca de 50% de sua massa seca em carbono. Este elemento é necessário para a biossíntese de diversos constituintes celulares, como carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos etc. A forma de sua utilização está intimamente relacionada àquela que cada microrganismo em particular emprega para seu suprimento de energia. Organismos

quimiorganotróficos satisfazem a maior parte de suas necessidades de carbono pela incorporação de metabólitos obtidos pela degradação de substratos orgânicos, os quais também fornecem energia. Os autotróficos, por outro lado, são capazes de induzir a fotólise da água, que permite a fixação de dióxido de carbono e sua utilização como única fonte de carbono.

Desta forma, o potencial para utilizar fontes de carbono para o metabolismo varia enormemente entre os microrganismos. Desde os chamados compostos C_1 (CO, CO_2, formaldeído, metanol, metilamina), até macromoléculas complexas (glicogênio, amido, proteínas, celulose, ácidos nucléicos), praticamente todos os compostos orgânicos da natureza podem ser utilizados como fonte de carbono e/ou energia por microrganismos, desde que estes possuam os sistemas enzimáticos e de transporte adequados a cada fonte. Compostos orgânicos que contém carbono e nitrogênio, tais como aminoácidos e proteínas, podem servir tanto como fonte de carbono, como de nitrogênio.

As macromoléculas são inicialmente convertidas extracelularmente a subunidades menores, oligômeros ou monômeros, por enzimas despolimerizantes. Caminhos metabólicos periféricos são, então, utilizados para transformar estes compostos em metabólitos capazes de ser catabolizados por vias metabólicas centrais. Os di e oligossacarídeos de baixas massas moleculares (sacarose, maltose e outros), assim como oligopeptídeos e oligonucleotídeos podem ser hidrolisados extracelularmente ou primeiramente transportados para o interior da célula e então hidrolisados (Krämer & Sprenger, 1993).
Os carboidratos são as principais fontes de carbono e energia para os microrganismos, sendo a glicose a mais fácil e amplamente utilizada, seguida por frutose, manose e galactose (Gadd, 1988).

4.3. Fontes de Nitrogênio:

O nitrogênio é um constituinte essencial às células, uma vez que é necessário à formação de aminoácidos e ácidos nucléicos. Seu teor na célula pode atingir até 15% em massa seca.

Os microrganismos apresentam grande diversidade na assimilação de fontes de nitrogênio. Muitos são autotróficos para nitrogênio, sendo capazes de utilizar nitrato, amônio e, algumas vezes, nitrogênio gasoso como única fonte de nitrogênio. Outros, entretanto, necessitam do suprimento deste elemento sob a forma de aminoácidos ou de bases purínicas e pirimidínicas. Os microrganismos que requerem aminoácidos podem ser nutricionalmente deficientes por incapacidade de sintetizar ou o grupamento amino ou certos aminoácidos específicos. As necessidades do primeiro grupo podem ser supridas pelo fornecimento de qualquer aminoácido como fonte de nitrogênio. Os últimos, entretanto, requerem a provisão dos aminoácidos específicos (Rhodes & Fletcher, 1963; Madigan *et al.*, 2000).

4.4. Fontes de Minerais:

Os microrganismos necessitam, para suas funções estruturais e fisiológicas, de hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxôfre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro e, em alguns casos, cloro. Em adição, requerem elementos-traços, os quais desempenham importante papel como constituintes de enzimas e co-enzimas. Estes últimos incluem manganês, cobre, zinco, molibdênio, cromo,

níquel, cobalto e boro e são, em geral, necessários em quantidades relativamente baixas (Rhodes & Fletcher, 1963; Madigan *et al.*, 2000).

Por sua vez, a água é essencial para a ação enzimática, dissolução de materiais orgânicos e inorgânicos e como "reagente" em muitos processos metabólicos. Seu teor nas células situa-se na faixa de 70-90%.

Os nutrientes inorgânicos podem agir de quatro formas no interior da célula: entrar no metabolismo levando à síntese de compostos necessários ao funcionamento da célula; estimular o metabolismo como co-fator para reações enzimáticas; inibir o metabolismo e, finalmente, contribuir para as propriedades osmóticas (Jennings, 1988).

4.5. Fatores de Crescimento:

Muitos microrganismos são incapazes de sintetizar certos aminoácidos, substâncias orgânicas simples e complexas ou vitaminas, os quais são constituintes ou precursores de enzimas e coenzimas. Essas substâncias devem ser supridas ao meio de cultura sempre que necessário (Rhodes & Fletcher, 1963; Madigan *et al.*, 2000).

5. Matérias-Primas Glicídicas

A viabilidade técnica, os balanços mássicos e energéticos e a economicidade são aspectos relevantes que devem ser considerados na escolha da matéria-prima. Em geral, esta deve apresentar as seguintes características:

- composição adequada ao crescimento do agente biológico e à formação do produto de interesse;
- baixo custo de obtenção, beneficiamento, transporte e estocagem;
- elevada disponibilidade e facilidade de padronização dos componentes;
- não contribuir para dificultar os processos de separação do produto.

Uma grande variedade de matérias-primas, geralmente provenientes da agro-indústria, é utilizada como fonte(s) de substrato/carbono/energia e outros nutrientes. De uma forma geral, as matérias-primas para Bioprocessos podem ser agrupadas em função da estrutura e complexidade molecular dos substratos[3]. Em algumas, os substratos encontram-se na forma polimérica, e sua hidrólise prévia será necessária, caso o agente biológico não seja capaz de sintetizar enzimas que catalisam a despolimerização desses substratos. Assim, estas matérias-primas podem conter:

- substratos solúveis que podem ser facilmente extraídos e convertidos prontamente a produto(s), como por exemplo: sacarose, glicose, frutose e lactose, de cana de açúcar, beterraba, melaço, soro de leite etc;
- polissacarídeos insolúveis, que precisam de tratamento moderado para solubilização e hidrólise, antes da conversão a produto(s) como por exemplo: amido de milho, mandioca, trigo, cevada, batata etc;
- polissacarídeos insolúveis altamente resistentes, que necessitam de pré-tratamento físico, seguido de hidrólise química ou enzimática para produzir

[3] Substrato é o reagente primário do qual o produto é obtido.

substratos na forma monomérica, que serão convertidos a produto(s), como por exemplo: celulose e hemicelulose de matérias-primas lignocelulósicas.

A figura 5 apresenta a classificação das matérias-primas em função de seus respectivos substratos.

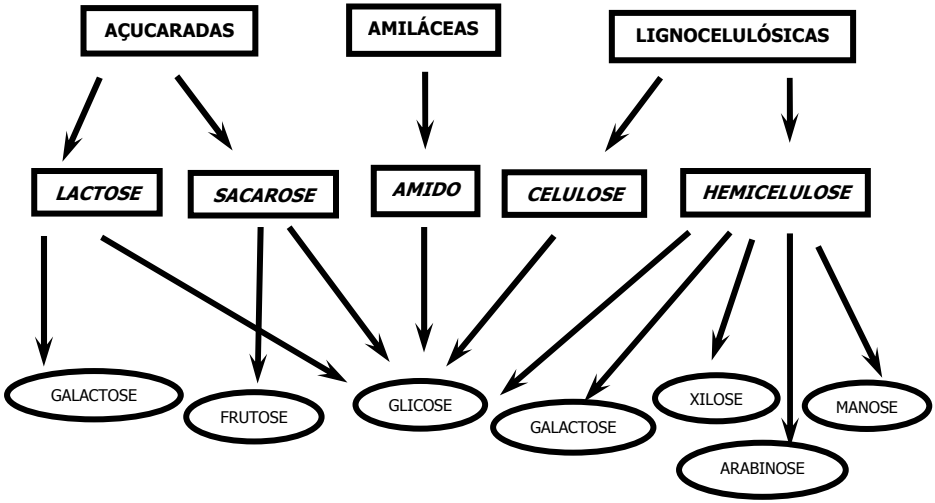


Figura 5: Principais matérias-primas glicídicas e seus substratos correspondentes.

Em determinados Bioprocessos, como a produção de enzimas por fermentação no estado sólido, pode-se prescindir de pré-tratamentos, intensivos em energia e, consequentemente, onerosos, já que muitos microrganismos têm a habilidade de atacar o complexo contendo o(s) polissacarídeo(s) e outras macromoléculas na sua forma íntegra, como fazem na natureza.

Obviamente que, quando se avalia a utilização dessas matérias-primas, existem aspectos particulares que devem ser levados em consideração, por estarem relacionados à viabilidade técnica, a balanços mássicos e energéticos e à economicidade do Bioprocesso em desenvolvimento, como mencionado anteriomente. Há que se ressaltar, que a matéria-prima é um dos componentes mais relevantes nos custos de produção, havendo casos em que pode representar até 75% dos custos totais, sendo esta uma das razões pelo crescente interesse no aproveitamento de resíduos agro-industriais e florestais como matérias-primas para uma grande variedade de bioconversões (Pereira Jr., 1991).

O perfil das matérias-primas tradicionalmente utilizadas nos processos microbianos convencionais não sofreu significativas modificações nos últimos cinqüenta anos. A tecnologia do DNA recombinante, entretanto, vem gradativamente aumentando a importância de fontes de carbono pouco utilizadas anteriormente. Como exemplo, a crescente utilização das leveduras metilotróficas *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha,* para a produção de enzimas recombinantes preconiza o seu crescimento inicial em fontes de carbono menos

repressoras como o glicerol e a indução do gene de interesse com metanol (Cereghino & Cregg, 2000; Gelissen, 2000).

6. Meios de Cultivo

Os meios de propagação e produção devem conter os nutrientes (fonte de carbono/energia/substrato, fonte de nitrogênio, co-fatores[4], precursores[5] e elementos traços) em concentrações tais que resultem em atividade máxima do agente biológico, não sendo as condições ótimas para o crescimento celular, necessariamente, as mesmas para o processo produtivo.

A escolha dos nutrientes adequados à geração do produto de interesse está relacionada à atividade metabólica desenvolvida pelo agente biológico. Nesse ponto destaca-se, então, a importância das informações obtidas sobre as exigências nutricionais da população microbiana envolvida no processo. Buscam-se, então, as fontes adequadas que possuam os componentes necessários ao bom desempenho da célula. Assim, há que se fortificar a matéria-prima com componentes que faltam, retirar aqueles que inibem, de modo a permitir uma rápida e eficiente conversão do substrato em produto com o rendimento desejado.

É evidente que quanto maior o atendimento às exigências nutricionais, mais apta estará o célula viva a responder aos estímulos externos. Conseqüentemente, mais eficiente será a conversão do produto de interesse e maior a produtividade. Satisfazer as exigências nutricionais das células ou compor adequadamente o meio de cultivo em laboratório, cujas dimensões dos biorreatores são pequenas, pode ser fácil, empregando-se nutrientes puros e caros. No entanto, para compor o meio industrial do Bioprocesso, alguns nutrientes deverão ser selecionados de acordo com suas características não só nutricionais, mas também econômicas, não podendo ser esquecidas as particularidades inerentes ao agente da transformação, quanto ao que será aproveitado para suas reações metabólicas ou a algum efeito de inibição sobre essas reações ou mesmo sobre a síntese do produto final.

A escolha da fonte de carbono é muito importante devido ao fato de a síntese de diversas biomoléculas estar sujeita à repressão catabólica[6]. A glicose, por exemplo, apesar de ser, em geral, excelente fonte para o crescimento celular, tem sido reportada como repressora para a síntese de diversas substâncias, em particular na produção de enzimas e antibióticos (Lambert & Meers, 1983).

---

[4] **Cofatores**: são componentes essenciais, orgânicos ou inorgânicos, necessários em pequenas quantidades para a atividade máxima dos sistemas enzimáticos. Ex: metais, vitaminas e substâncias químicas complexas.

[5] **Precursor**: é um reagente específico, cuja adição ao meio resulta na incorporação de um determinado grupo estrutural à molécula do produto. Não é obtenível pela reação de fermentação, tendo que ser fornecido pré-formado. Ex: ácido fenil-acético (produção de penicilina) e íon cobalto na produção de cianocobalamina (vitamina B12).

[6] **Repressão catabólica**: sistema coordenado que determina preferência por glicose, inibindo a expressão de óperons que codificam enzimas de rotas metabólicas alternativas. A repressão catabólica resulta da redução nos níveis de cAMP na célula pela presença de glicose, ocasionando na inatividade de CAP (*catabolic activator protein*).

Da mesma forma, a fonte de nitrogênio deve ser escolhida com bastante critério. É conhecido que fontes de nitrogênio chamadas de preferenciais, ricas ou de fácil metabolismo, como o íon amônio, a glutamina, a asparagina e a mistura de aminoácidos e peptídeos presentes na peptona e outros concentrados protéicos comerciais, são repressoras da produção de diversas enzimas. Ao contrário, prolina e uréia, ornitina e alantoina, entre outros, denominadas fontes não preferenciais, pobres ou de assimilação mais lenta, são fontes de nitrogênio não repressoras e, portanto, o seu uso em geral favorece a produção de biomoléculas sensíveis à repressão por nitrogênio (Adrio, 2003; Walker, 1998; Magasanik & Kaiser, 2002).

Entre as fontes de nitrogênio inorgânicas, o sulfato de amônio é o sal mais utilizado devido ao seu baixo custo, sendo também empregado o nitrato de sódio. Adicionalmente, existe uma grande disponibilidade de fontes de nitrogênio orgânico de grande aplicação em Bioprocessos industriais, como a uréia. As principais fontes de nitrogênio complexas empregadas são: extrato de levedura (rico em vitaminas do complexo B e aminoácidos); licor da maceração do milho (subproduto da industrialização do milho, fonte bem balanceada em carbono, nitrogênio, enxofre e sais minerais, contendo ainda vitaminas, como riboflavina, niacina, ácido pantotênico, biotina e piridoxina); farinha de soja (resíduo da indústria de produção de óleo de soja, rico em nitrogênio, o qual é, entretanto, mais complexo e de mais difícil assimilação do que o nitrogênio do licor da maceração do milho) (European Comission, 2002).

O valor do pH do meio de cultura é parâmetro de fundamental importância e também deve ser otimizado, de forma a proporcionar um bom crescimento celular e elevados rendimentos em produto. Há que se ressaltar que quando o agente biológico for enzimas, ou mesmo quando estas biomoléculas são os produtos do Bioprocesso, a atividade e a estabilidade enzimáticas são fortemente dependentes da força iônica do meio, temperatura, pH e da relação entre a concentração de substrato e de enzima. Estas variáveis básicas influenciam o desempenho catalítico das enzimas por afetarem suas conformações, estejam elas livres ou imobilizadas. Estudos devem ser conduzidos previamente a fim de se eleger as condições ótimas para a catálise enzimática.

Os meios de cultivo podem ser complexos ou quimicamente definidos. Os meios complexos são formulados com base em subprodutos industriais e extratos naturais, tais como: melaço, milhocina, extrato de levedura e outros. Sua composição é complexa e variável e contém várias fontes de cada elemento. Estes meios podem requerer suplementação com compostos que proporcionem quantidades adicionais de alguns elementos, tais como: N, Mg e P. Os meios complexos são extensamente utilizados em Microbiologia básica (taxionomia, fiosiologia e genética), Microbiologia de águas e de alimentos e em Fermentações industriais. Exemplos de componentes de meios complexos encontram-se na Tabela 6.

Os meios quimicamente definidos são formulados com compostos puros, tais como: glicose, sulfato de amônio, fosfato mono ou di ácido de potássio etc. Sua composição química é conhecida e reproduzível, contendo fontes de cada elemento e dos nutrientes essenciais requeridos. Estes meios são usados preferencialmente em pesquisa e desenvolvimento de Bioprocessos. Uma classe especial de meio quimicamente definido é o meio mínimo, que se pode definir como aquele formado por uma fonte única de cada elemento ou componente.

Os meios complexos são adequados em nível industrial por serem mais baratos e porque, em certos casos, se obtêm melhores rendimentos e produtividades volumétricas. Isto se deve a uma variedade de moléculas orgânicas, em sua constituição, que evitam que a célula necessite sintetizá-las a partir de glicose e compostos inorgânicos. Por outro lado, os meios quimicamente definidos permitem um melhor controle das condições ambientais para o crescimento e para a produção, sendo fácil excluir substâncias tóxicas ou inibidoras e incluir precursores e/ou indutores nos níveis adequados. Por esta razão, certas fermentações que requerem um controle estrito das condições ambientais, resultam mais produtivas quando se utilizam meios quimicamente definidos. A Tabela 7 mostra, a título de exemplo, a composição de um meio quimicamente definido para o cultivo de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 6: Exemplos de componentes de meios complexos industriais.

Componente	***Origem***
Melaço	Indústria açucareira
Milhocina	Subproduto do processamento de milho
Licor sulfítico	Efluente da indústria de polpa e papel
Soro/permeado de soro de leite	Subproduto do processamento de queijo
Vinhoto	Subproduto da produção de etanol
Farinha de soja e pescado	Industrialização da soja e pescado
Extrato de levedura	Indústria de levedura de panificação

Tabela 7: Meio quimicamente definido para o cultivo de células de *S. cerevisiae.*

Componente	***Concentração (g/L)***
Glicose	18,0
$(NH_4)_2SO_4$	3,2
$MgSO_4.7H_2O$	0,39
KH_2PO_4	0,68
NaCl	0,008
$FeSO_4.7H_2O$	0,002
$CuSO_4.5H_2O$	0,001
$ZnSO_4.7H_2O$	0,003
$CaCl_2$	0,028
$CoCl_2.6\ H_2O$	0,0002

6.1. Otimização do meio de cultivo

A otimização da composição do meio de cultivo para obter-se máximo rendimento em produto não é uma tarefa fácil. Tradicionalmente, abordagens empíricas têm sido adotadas, nas quais os efeitos de componentes individuais do meio sobre o rendimento em biomassa e produto são investigados em frascos cônicos agitados. As fontes de carbono são examinadas primeiramente e, posteriormente, as fontes de nitrogênio, até que todas as combinações dos componentes do meio sejam estudadas, atingindo-se um meio de "composição otimizada". Normalmente, compostos repressores são descartados e aqueles que estimulam ou induzem a síntese de enzimas são mantidos. Ressalta-se que este

procedimento envolve um grande número de experimentos e demanda um tempo muito grande para se chegar a composição otimizada do meio, sendo os constituintes investigados individualmente e, via de regra, negligenciados os efeitos interativos entre os mesmos. Um procedimento alternativo pode ser utilizado na otimização de meios em Bioprocessos, baseado em métodos estatísticos que permitem otimizar as concentrações dos componentes fundamentais do meio, levando-se em consideração o grau de inter-relação entre eles (Demain & Solomon, 1986). Após seleção dos principais componentes do meio que afetam o rendimento em produto e a produtividade, procede-se a combinação dos mesmos de acordo com uma metodologia estatística (Planejamento Fatorial), que permite o planejamento dos experimentos. Desta forma, os efeitos de vários componentes podem ser determinados simultaneamente, com um número relativamente pequeno de experimentos.

O Planejamento Fatorial de experimentos baseia-se no estudo de dois parâmetros do processo. São eles os "fatores" e os "níveis". Fatores são as variáveis do processo, como por exemplo, a temperatura de crescimento de um microrganismo ou a concentração de determinado nutriente em um meio de cultivo. Já os níveis são as diferentes condições pesquisadas, geralmente são utilizados níveis superiores, inferiores e centrais.

Para um melhor entendimento, imaginemos um Planejamento experimental envolvendo a temperatura de crescimento de determinado microrganismo e a concentração de um nutriente em seu meio de cultivo. Podemos estabelecer para cada fator estudado (temperatura e concentração) 3 níveis de estudo (Tabela 8):

Tabela 8: Definição de Fatores e Níveis para o Planejamento Experimental.

	Nível		
Fator	Superior	Central	Inferior
Temperatura de cultivo	37ºC	35ºC	33ºC
Concentração de nutriente	5%	3%	1%

A representação de um planejamento fatorial é n^k, sendo n o número de níveis e k o número de fatores. Utilizando os dados da tabela anterior, temos que $n = 3$ e $k = 2$, então o planejamento fatorial em questão terá um total de 3^2 experimentos, ou seja, 9 condições experimentais diferentes. Estas condições experimentais são representadas por uma matriz de planejamento (Tabela 9), onde cada nível possui sua representação numérica: o superior é representado pelo valor +1, o central pelo valor 0 e o inferior pelo valor –1.

Veja que todas as condições possíveis estão descritas na Tabela 9. Os experimentos são então realizados, tendo sido definida previamente a variável de resposta, geralmente, no caso de otimização de Bioprocesso, a concentração do produto ou o fator de rendimento ou, ainda, a produtividade volumétrica ou específica. Após a obtenção dos resultados de cada um dos experimentos relacionados, a análise estatística destes dados pode ser realizada utilizando um "software" apropriado, que fornecerá valores críticos dos fatores, bem como a sua significância e grau de interação.

Tabela 9: Matriz de Planejamento Experimental.

Experimento	Temperatura de crescimento	Concentração de nutrientes
1	+1 (37ºC)	+1 (5%)
2	+1 (37ºC)	0 (3%)
3	+1 (37ºC)	-1 (1%)
4	0 (35ºC)	+1 (5%)
5 (C)	0 (35ºC)	0 (3%)
6	0 (35ºC)	-1 (1%)
7	-1 (33ºC)	+1 (5%)
8	-1 (33ºC)	0 (3%)
9	-1 (33ºC)	-1 (1%)

Observe que nesta matriz um importante fator foi ignorado: o tempo de cultivo do microrganismo. Caso utilizássemos também este fator, teríamos uma nova matriz com 3^3 experimentos, compreendendo 27 condições experimentais diferentes.

É importante comentar que réplicas são muito importantes para o Planejamento experimental, pois permitem que analisemos o erro intrínseco ao Bioprocesso, chamado de erro experimental. O tipo de réplica mais importante é a do ponto central de experimentos, marcado com (C) na Tabela 9. Análises estatísticas demonstram que a utilização de um número superior a 5 réplicas para o ponto central dispensa duplicatas dos outros pontos experimentais.

6.2. Formulação de meio de cultivo com base na composição centesimal de microrganismos

Conhecendo-se a composição elementar da célula (Tabela 8), pode-se determinar a sua "fórmula mínima" e estimar estequiometricamente suas necessidades nutricionais. Esta composição é dependente do meio em que o microrganismo foi cultivado.

Para que o processo de reprodução celular seja possível, os requerimentos em matéria, energia e informação deverão ser atendidos, respeitando-se os princípios de conservação de massa e energia, de forma a possibilitar a construção de uma nova célula igual a anterior (Figura 6).

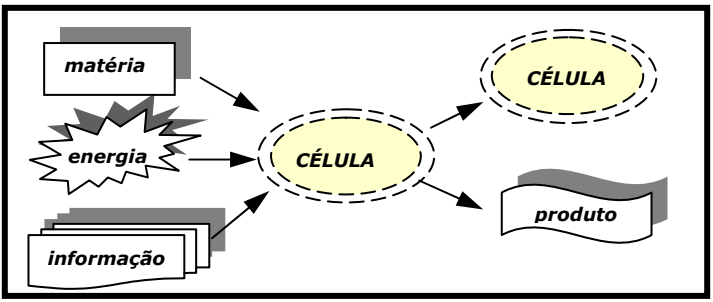


Figura 6: Requerimentos para o crescimento/multiplicação celular.

A informação para a construção de uma nova célula está contida no material genético do microrganismo e é transmitida de geração a geração. A matéria deve ser fornecida através de componentes do meio de cultivo e a energia é obtida do catabolismo da fonte de carbono e energia, de reações de oxidação ou de radiação solar no caso de microrganismos fotossintéticos.

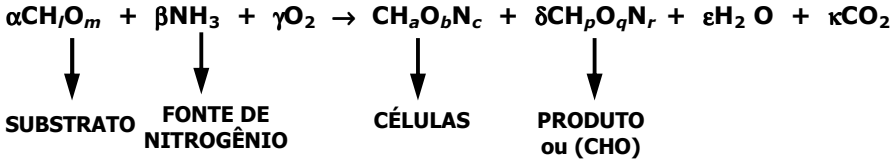
As células são representadas com base em sua composição elementar. Composições típicas de bactérias, leveduras e fungos filamentosos estão apresentadas na tabela a seguir. Os elementos quantitativamente mais importantes são: carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio (90-92% do total da massa celular), o que justifica a aproximação feita na equação estequiométrica, descrita a seguir. De grande importância encontra-se um segundo grupo de elementos, compostos por: Mg, P, S, Ca, Na e K, que devem ser fornecidos como compostos aptos à metabolização pela célula. A fonte de carbono e energia pode ser um carboidrato ou outro composto orgânico, ou mesmo CO_2, carbonato ou bicarbonato no caso de células quimioautotróficas e fotossintéticas. A fonte de nitrogênio pode ser amônio, aminoácidos, proteínas, uréia, nitrato ou nitrogênio molecular, sendo as duas primeiras as mais comuns. O restante dos elementos é suprido através de sais inorgânicos. Devido a deficiências genéticas, certas linhagens requerem fatores de crescimento, tais como vitaminas, aminoácidos e nucleotídeos, como mencionado anteriormente.

Tabela 10: Composição centesimal de células microbianas.
Fonte: Bailey & Ollis (1986).

ELEMENTOS	***BACTÉRIA***	***LEVEDURA***	***BOLORES***
Carbono	46-52	46-52	45-55
Hidrogênio	8-12	8-12	8-12
Oxigênio	18-24	18-24	18-24
Nitrogênio	10-14	5-9	3-7
Magnésio	0,1-0,5	0,1-0,5	0,1-0,3
Fósforo	2,0-3,0	0,8-2,5	0,4-4,5
Enxofre	0,1-1,0	0,01-0,25	0,1-0,5
Cálcio	0,01-1,0	0,1-0,3	0,1-1,4
Potássio	1,0-4,5	1,0-4,0	0,2-2,5
Ferro	0,02-0,2	0,01-0,5	0,1-0,2
Outros	<0,01	<0,01	<0,01
COMPOSTOS			
Proteínas	50-60	35-45	25-40
Carboidratos	6-15	30-45	40-55
Lipídios	5-10	5-10	5-10
Àc. Nucléicos	15-25	5-15	2-10
Cinzas	4-10	4-10	4-10

É possível representar o crescimento microbiano mediante uma equação química que seja regida pelos princípios da estequiometria e da cinética. Note que as estruturas moleculares do substrato, fonte de nitrogênio e do produto são conhecidas e sabendo-se que, de uma forma geral, em aerobiose 50-60% do carbono contido no substrato incorporam-se à plasticidade celular e em

anaerobiose apenas 10-20%, pode-se estimar a concentração dos nutrientes que irão compor o meio de cultivo.



7. Esterilização de Meios e Equipamentos

Há Bioprocessos bastante exigentes quanto à esterilidade dos meios de cultivo, havendo, também, grande rigor asséptico não só no transporte do meio esterilizado ao biorreator, bem como no próprio sistema reacional. Pode-se citar como exemplos de processos que demandam esterilização: a produção de antibióticos, vacinas, vitaminas e enzimas. Por outro lado, outros requerem apenas uma esterilização incipiente (pasteurização), tendo em vista que o próprio produto age como uma 'barreira' à contaminação, devido ao seu caráter tóxico aos microrganismos contaminantes. A bioprodução de combustíveis, solventes e ácidos orgânicos insere-se neste último caso. Há, também, Bioprocessos em que se prescinde totalmente de assepsia, como é o caso dos biotratamentos, nos quais a microbiota nativa ou exógena, atuando de forma consorciada, é extremamente desejável para se reduzir da carga orgânica poluidora.

O processo de esterilização é geralmente levado a cabo por agentes físicos. Os mais empregados são o calor (seco e úmido), a filtração através de membranas microporosas e as radiações (especialmente a ultra violeta). O calor seco é empregado na esterilização de instrumental e vidraria e o calor úmido, à pressão atmosférica ou saturado sob pressão, é aplicado à esterilização de equipamentos e, principalmente, de meios de cultivo. Esta última, a forma mais usual, pode ser realizada em conjunto ou separadamente do biorreator e, ainda, em batelada ou continuamente.

Na prática industrial verifica-se o emprego da esterilização de meios de cultivo em batelada e em conjunto com o biorreator, fazendo-se passar vapor saturado sob pressão através de serpentinas ou jaquetas (aquecimento indireto), ou pela injeção de vapor saturado diretamente no meio contaminado (aquecimento direto). Neste último caso, há que se levar em consideração a diluição do meio de cultivo causada pela condensação do vapor ao entrar em contato com o meio contaminado.

Na esterilização em batelada, o tempo total de esterilização é relativamente grande, podendo dar origem a decomposição de nutrientes termo-sensíveis, como as vitaminas, ou provocar reações indesejáveis entre os constituintes do meio, como por exemplo, reações entre amino-ácidos e açúcares (reação de *Maillard*) ou de caramelização (decomposição dos açúcares). Neste sentido, esta modalidade de esterilização vem sendo substituída, sempre que possível, pela esterilização contínua, na qual se preserva mais a integridade dos constituintes do meio, já que o aquecimento e o resfriamento são praticamente instantâneos,

não havendo variação de temperatura na seção de espera, que retém o meio de cultivo a ser esterilizado em temperaturas elevadas, por curto tempo de exposição (Figura 8). Obviamente, a esterilização contínua é essencial para sistemas contínuos de fermentação.

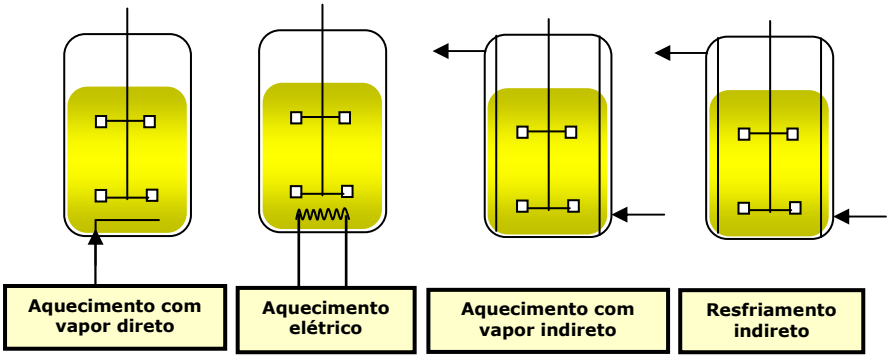


Figura 7: Tipos de transferência de calor na esterilização de meios e equipamentos.

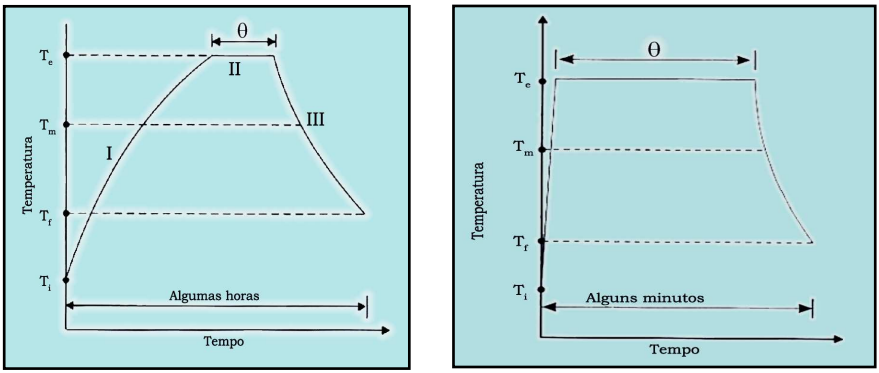


Figura 8: Esterilização em Batelada (à esquerda) *versus* Contínua (à direita).
T_i: temperatura inicial; T_f: temperatura de fermentação; T_m: temperatura mínima letal; T_e: temperatura de esterilização; θ: tempo de esterilização; I: seção de aquecimento; II: seção de esterilização propriamente dita; III: seção de resfriamento.

O meio preparado e esterilizado deve, então, sofrer a ação dos agentes biológicos, seja pela inoculação de uma suspensão suficientemente concentrada de células ativadas e propagadas ou recicladas ao processo, seja pela adição de unidades de atividades enzimáticas suficientes para catalisar a transformação do substrato em produto, com altas conversões e taxas de produção.

8. Biorreator

A mistura reacional, constituída de meio (de cultivo ou para conversão enzimática) e agente biológico, será então processada em biorreatores[7], onde deverão ser mantidas as condições ótimas para o agente biológico expressar o máximo de sua atividade catalítica, seja através do metabolismo da célula ou de simples reação enzimática. Quando se tratar de um processo puramente enzimático, o meio reacional é adicionado de unidades de atividade enzimática e a catálise é realizada também em biorreatores para máximo de conversão e produtividade.

No biorreator, vários fenômenos químicos, físicos e, naturalmente, biológicos ocorrem. Por essa razão, o desenvolvimento de Bioprocessos constitui-se em uma das mais complexas e fascinantes áreas de atuação da Engenharia Bioquímica. Por exemplo, no projeto de um biorreator, devem ser levados em consideração os seguintes aspectos: a cinética do Bioprocesso, o cálculo das tubulações e equipamentos necessários para manutenção de esterilidade, as características hidrodinâmicas do meio reacional, a transferência de massa de nutrientes na célula, a transferência de massa de oxigênio da fase gasosa para o seio do líquido e, posteriormente, para as células (em processos aerados), a transferência de massa de produtos e subprodutos das vizinhanças das células para o seio do meio de cultivo, a transferência de calor metabólico e o controle da fisiologia microbiana.

Pode-se encontrar uma grande variedade de configurações de biorreatores. Dentre elas, os **biorreatores agitados mecanicamente** (STB-*stirred tank bioreactor*) são, sem dúvida, os mais estudados e utilizados industrialmente (Figura 9). Embora não necessariamente ideais, os tanques agitados apresentam versatilidade e fornecem bons resultados para uma grande gama de Bioprocessos. Isto é particularmente importante para as companhias farmacêuticas, pois diferentes substâncias podem ser produzidas no mesmo biorreator durante o seu tempo de vida. Adicionalmente, os investimentos em capital para a construção destes equipamentos são normalmente recuperados na comercialização do primeiro produto.

Apesar de sua flexibilidade, pois podem ser empregados para uma grande gama de bioconversões, os biorreatores do tipo STB apresentam certas desvantagens, como por exemplo: demandam grande aporte de energia para a agitação mecânica, tendem a afetar a morfologia celular, são de difícil escalonamento e têm de ser cuidadosamente projetados para produzir adequada mistura e aeração.

Nos **biorreatores agitados pneumaticamente** (Figura 10), a potência necessária para se atingir o grau de mistura desejável no sistema reacional, a fim de se produzirem altas taxas de transferência de massa e calor, é suprida pela energia cinética do líquido, através de sua circulação pelo movimento das bolhas gasosas, isto é, pneumaticamente. Este tipo de biorreator, conhecido na literatura inglesa como *airlifit* (com circulação interna ou externa) ou coluna de bolhas (*bubble column*), é aplicado a sistemas biológicos suscetíveis às forças cisalhantes, tão intensas em biorreatores agitados mecanicamente. Além da sua elevada relação altura:diâmetro ($6{:}1 \leq H/D_T \leq 20{:}1$), quando comparado com os

[7] Biorreator: tanque/recipiente no qual células ou enzimas realizam uma reação biológica.

biorreatores do tipo STB (até 4:1), os biorreatores agitados pneumaticamente possibilitam a operação contínua de bioprocessos com altas densidades celulares (células imobilizadas ou floculantes), resultando em altos valores de produtividade volumétrica. Há registros na literatura de processos que tiveram seus tempos de conversão de substrato em produto reduzidos de dias para horas, pelo emprego deste tipo de biorreator. As altas relações H/D_T são necessárias a fim de se alcançarem elevadas retenções das bolhas gasosas no seio do líquido e de gerar altas pressões hidrostáticas na região próxima à distribuição do ar (na base do biorreator), que induzirão o movimento do líquido.

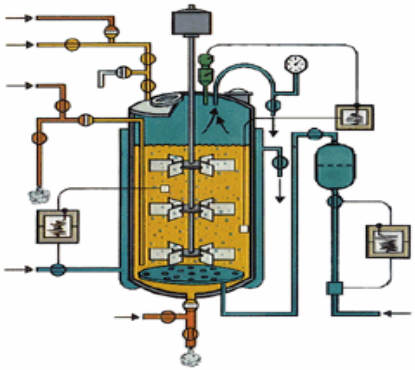


Figura 9: Biorreator agitado mecanicamente.

O biorreator *airlift* difere da coluna de bolhas pela presença de um dispositivo, colocado interna ou externamente, denominado *draft tube*. As funções deste dispositivo incluem: o aumento do grau de mistura, imprimindo, fundamentalmente, escoamento axial, a redução da coalescência das bolhas e a equalização das forças cisalhantes ao longo do biorreator. Tanto o biorreator *airlift* quanto o de coluna de bolhas são comumente utilizados em culturas de microrganismos sensíveis ao cisalhamento decorrente da movimentação do líquido.

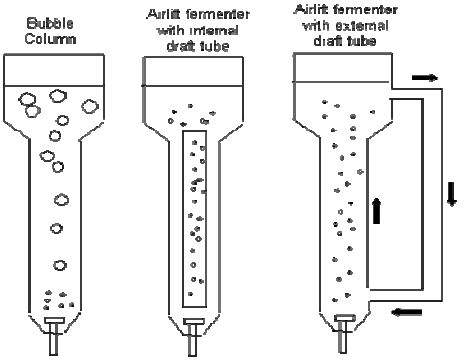


Figura 10: Biorreatores com escoamento pneumático.

Biorreatores a membrana (*hollow-fiber* e *flat-sheet*) vêm, também, sendo utilizados com sucesso, em determinados Bioprocessos. Sua principal vantagem está na possibilidade de confinar células ou enzimas dentro do biorreator, separando-as da corrente de saída do sistema quando se opera continuamente, e tornando esta etapa desnecessária durante o processo de *downstream*. Embora, esta vantagem possa ser também conseguida com outras técnicas de imobilização, o confinamento de células em biorreatores a membrana microporosa é, talvez, a maneira mais inócua de imobilização de células e enzimas, pois não são utilizados agentes químicos nem condições drásticas de aprisionamento. O uso de biorreatores de membrana é particularmente atraente em sistemas bifásicos, pois muitas dificuldades associadas com emulsificação e separação de fases podem ser evitadas.

Biorreatores com células/enzimas imobilizadas: Nas últimas duas décadas houve grandes e rápidos desenvolvimentos no uso de enzimas e células para propósitos industriais, analíticos e médicos. A fim de tornar seu uso mais conveniente, estes agentes biológicos têm sido imobilizados, assemelhando-se aos catalisadores de fase sólida da química convencional. Células (vivas ou mortas) e enzimas podem ser imobilizadas por vários métodos. Em princípio, estes métodos são classificados em duas categorias: imobilização ativa ou passiva. A imobilização ativa requer o uso de agentes químicos, que ativarão a superfície do suporte ou possibilitarão a criação de uma matriz porosa, na qual o agente biológico fique aprisionado, enquanto que a imobilização passiva ocorre quando filmes biológicos aderem naturalmente na superfície ou no interior de um suporte inerte ou, ainda, quando flocos de células são formados. A Figura 11 ilustra os métodos de imobilização de agentes biológicos.

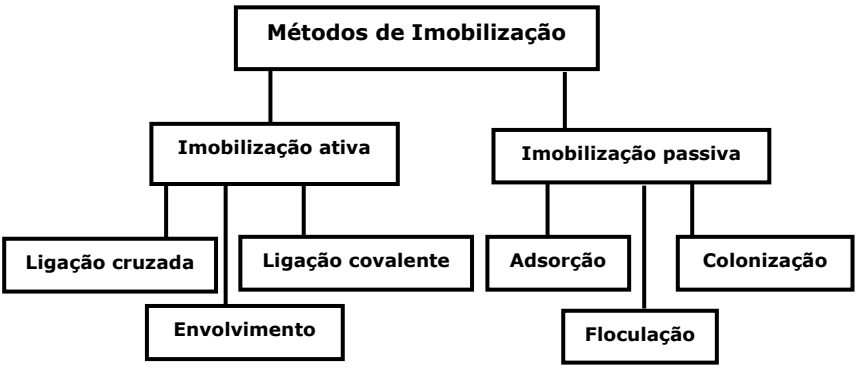


Figura 11: Métodos de imobilização de agentes biológicos.

No método do envolvimento há o confinamento físico do material biológico em uma matriz polimérica formadora de gel. O método apresenta como vantagens, a baixa toxidez e a alta capacidade de retenção de células. Os materiais mais utilizados são os polímeros naturais como: agar; K-carragenina; alginato e

pectina ou polímero sintético como a poliacrilamida. Neste último caso há necessidade de agente funcional para formação de ligações cruzadas, o que pode conferir certa toxicidade às células.
Na técnica da ligação covalente, os suportes são especialmente funcionalizados para conter um grupamento químico que será responsável pela imobilização do material biológico ao suporte. Dentre os materiais suportes, as esferas de vidro (diâmetro variando de 100 a 500 μm) tratadas com γ-aminopropil-trietoxisilano são bastante empregadas. Posteriormente, o grupamento amina resultante reage com glutaraldeído (agente bifuncional), de forma a se produzir uma estrutura especial que possui um grupamento carbonila (-HC=O) altamente reativo. A interação da célula/enzima com o suporte se dá pela ligação da carbonila do suporte funcionalizado com os grupamentos aminas das enzimas ou das proteínas da parede celular. Sua limitação está associada a potencial toxicidade do sistema, conferida pela presença do glutaraldeído (Pradella, 2001).

A adsorção é um método no qual o material biológico adere a suportes que não foram funcionalizados. As forças de interação envolvem: interações eletrostáticas entre cargas opostas das estruturas protéicas e da superfície do suporte; ligações iônicas entre grupos aminos e carboxílicos e ligações covalentes parciais entre grupos aminos da parede celular e grupo hidroxila da superfície do suporte. Sua limitação refere-se à influência acentuada das condições ambientais na capacidade de retenção das células (concentração iônica; pH e fluxo do material líquido) ao suporte (Ansejo & Merchuk, 1995).

A floculação é um fenômeno no qual células isoladas, suspensas em um líquido, agregam-se para formar flocos (auto-imobilização), resultando em rápida sedimentação ou flotação. Os fatores envolvidos na formação de flocos são de natureza genética, ambiental, fisiológica e estrutural. As forças de interação associadas à floculação envolvem: ligação proteína-carboidrato (leveduras) e formação de polissacarídeos (biofilmes) em células bacterianas (Pereira Jr. & Bu'Lock, 1993 e 1994).

Várias vantagens associadas à imobilização de células/enzimas podem ser apontadas:

- Possibilidade de aplicação em reações enzimáticas de múltiplas etapas;
- Rendimentos e produtividades elevados;
- Estabilidade operacional geralmente alta;
- Operações de extração e/ou purificação de enzimas são desnecessárias;
- Altas densidades celulares podem ser empregadas;
- Densidades celulares e atividades enzimáticas podem ser mantidas por longos períodos de operação;
- Produtos podem ser facilmente separados da biopartícula catalítica;
- Menor suscetibilidade a contaminações microbianas.

Por outro lado as seguintes desvantagens potenciais são apresentadas:

- Reações indesejáveis podem ocorrer pela presença de várias enzimas cataliticamente ativas;
- Desprendimento de células e enzimas do suporte;
- Problemas ligados à transferência de massa intra-particular.

Os tipos de **biorreatores para células/enzimas imobilizadas** mais

comumente utilizados em são: CSTB, leito fixo e leito fluidizado, sendo os dois últimos mais indicados por minimizarem a exposição da biopartícula (agente biológico imobilizado) a elevados graus de cisalhamento e colisões (Figura 12). Para se aplicar esta técnica em processos industriais, estudos devem ser realizados para elucidar algumas características dos sistemas imobilizados, principalmente no tocante à fisiologia celular ou à conformação da enzima imobilizada e aos problemas de transferência de massa intra-particular e no próprio biorreator. No entanto, esses sistemas vêm sendo utilizados industrialmente, em países avançados, com sucesso na produção de etanol (combustível e champanhe), acrilamida, alanina e dos ácidos orgânicos: aspártico, málico e fumárico.

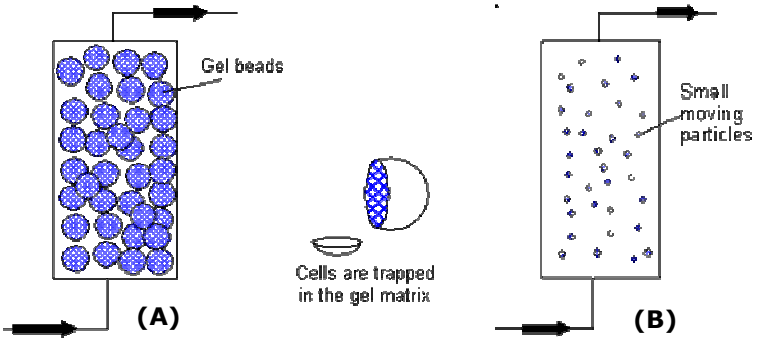


Figura 12: Biorreatores com células/enzimas imobilizadas. (A) leito fixo; (B) leito fluidizado.

Configurações de **biorreatores** têm sido também propostas para o cultivo de **células animais** (livres ou imobilizadas/ancoradas). Estes sistemas requerem cuidadosa análise para a seleção/projeto de biorreatores, tendo em vista a ausência de parede celular nestas células, o que as torna muito mais suscetíveis a forças cisalhantes do que outros organismos e, por conseguinte, rompem-se com mais facilidade. Este problema é agravado pelo tamanho relativamente grande dessas células e pela falta de mobilidade individual. Células animais ancoradas em microcarreadores não sofrem movimentos de rotação nem translação, consequentemente, não podem reduzir (amortizar) o impacto das forças decorrentes de sua exposição às forças mecânicas transferidas ao fluido. O cultivo de células animais em biorreator tem sido considerado um dos grandes desafios da Biotecnologia moderna (Ansejo & MerchuK, 1995).

Da mesma forma, o cultivo de **células vegetais** em biorreator é também um dos assuntos em voga na Biotecnologia moderna. O interesse comercial nestes cultivos está relacionado com a produção de metabólitos secundários de alto valor agregado, com aplicação na agricultura (inseticidas) e, em especial, nas áreas farmacêutica e médica, como por exemplo: analgésicos, anestésicos e outros fármacos utilizados no combate a desordens circulatórias e cardíacas, malária, leucemia e etc. A opção pelo cultivo em biorreator deve-se a maior

facilidade no controle da fisiologia dessas células, o que permite maximizar rendimentos e produtividades. Os avanços da Biologia Molecular, Engenharia Metabólica e da Engenharia Bioquímica indicam que o sucesso comercial de tais bioprocessos não está distante de realização. Este é um outro campo para grandes desenvolvimentos, assim como o desenvolvimento de foto-biorreatores (Ansejo & MerchuK, 1995).

Qualquer que seja a configuração escolhida, para processos conduzidos com rigor estéril, a construção do biorreator deve atender aos seguintes requerimentos:

- passível de ser esterilizado quando culturas puras são empregadas;
- deve ser de simples geometria e construção;
- deve conter um número mínimo de flanges e soldas;
- não deve conter zonas mortas;
- material deve possuir rugosidade superficial mínima;
- suportar carregamento (espessura de chapa compatível com o volume a ser processado);
- deve ter capacidade de suportar altas pressões, particularmente em bioprocessos nos quais esterilização é requerida;
- deve apresentar ótimas condições de mistura (baixo e uniforme cisalhamento) e permitir uniforme suspensão de sólidos;
- deve possuir condições de fluxo claramente definidas, com alimentação de substrato compatível com as taxas de metabolização;
- deve possibilitar adequado transporte de massa, particularmente em relação à transferência de oxigênio, em processos aerados;
- adequada instrumentação para o monitoramento e controle (*on line* ou *off line*) das variáveis de processo;
- deve prever o controle de espuma;
- flexibilidade, podendo ser empregado em outros bioprocessos;
- estabilidade a longo termo;
- compatibilidade com as etapas de à montante (*upstream*) e à jusante (*downstream*);
- Fácil escalonamento.

Um dos grandes problemas existentes na operação de biorreatores decorre da dificuldade de medições de variáveis de processo a serem controladas. No caso de variáveis físicas, como temperatura, vazão, velocidade de agitação e taxa de aeração, ou físico-químicas, como pH, potencial redox, pressão parcial de oxigênio e a composição dos gases de saída, estas são usualmente empregadas como avaliações diretas, podendo ser medidas *on line*, através da utilização de sistemas de controle e outros equipamentos comerciais. Por outro lado, o controle de variáveis químicas ou bioquímicas é de difícil realização e pesquisas vêm sendo conduzidas no sentido de desenvolver instrumentos sensíveis para o monitoramento destas variáveis, capazes de relacionar variações de espécies químicas com sinais elétricos ou espectrofotométricos, utilizando como elemento sensor um agente biológico (biossensores).

Biorreatores são "peças-chaves" no desenvolvimento de Bioprocessos. Não se pode discutir o desenvolvimento/otimização de bioprocessos sem prestar atenção especial nas características e fenomenologias que ocorrem nestes equipamentos.

9. Modos de Operação de Bioprocessos

9.1. Quanto à condução

A forma mais utilizada de condução de Bioprocessos é a **batelada simples**, na qual ao meio de cultivo é adicionada uma suspensão celular e o processo é transcorrido, sem adições de meio novo, nem retiradas de meio reacional durante o seu curso. A batelada simples é caracterizada pela alteração nas condições ambientais a todo instante do Bioprocesso (as concentrações de nutrientes são reduzidas e de células, produtos e sub-produtos aumentadas). O principal problema desta forma de operar Bioprocessos é decorrente de fenômenos de inibição pelo substrato, produto e outros metabólitos. Por exemplo, elevadas concentrações de substrato são inibitórias ao agente biológico. Este efeito está relacionado, em células vivas, a fenômenos osmóticos que resultam em plasmólise celular. As possíveis razões para o fenômeno são: repressão na síntese de enzimas, desidratação dos sistemas enzimáticos, devido à perda de água da célula e/ou inibição do transporte de nutrientes para o seu interior. É, também, fato bem conhecido que a célula viva polui seu ambiente com produtos do seu metabolismo até cessar o crescimento e, eventualmente, perder sua viabilidade, fenômeno este conhecido como inibição pelo produto. Ressalta-se que esses fenômenos são dependentes da linhagem e das condições de cultivo.

Para se contornar esses problemas de inibição/repressão, outras formas de condução podem ser utilizadas, como a **batelada alimentada** e suas variantes, que possibilitam a manutenção da concentração desses inibidores/repressores em níveis sub-inibitórios/sub-repressores, com implicações diretas no desempenho da célula. A técnica de batelada alimentada é definida como um modo de operação na qual um ou mais nutrientes necessários ao crescimento celular são adicionados ao biorreator, intermitentemente ou continuamente, sem que ocorra retirada de material durante a operação. A flexibilidade de operação oferecida por esta forma de condução é adequada a Bioprocessos em que o crescimento celular e/ou formação de produtos são significativamente sensíveis à concentração do substrato limitante. Técnicas de fermentação em batelada alimentada são adotadas à produção de várias enzimas e antibióticos, uma vez que a formação destas biomoléculas é muitas vezes sujeita à repressão pelo substrato.

A **condução contínua** é outra modalidade de se operar biorreatores. Como o próprio nome sugere tanto a alimentação de meio nutriente, quanto a retirada de produto (meio fermentado) são realizadas de forma contínua. Sua principal vantagem, quando comparada com outras formas de condução, está ligada à possibilidade de se operar o sistema por extensos períodos de tempo, resultando em aumento de produtividade. Adicionalmente, o agente biológico converte substrato em condições estacionárias, que podem ser determinadas previamente para o seu melhor desempenho, em contraste com a batelada simples, na qual o agente biológico está submetido, a todo o momento, a condições ambientais diferentes. Os processos contínuos podem ser conduzidos com um único biorreator (com e sem reciclo de células) e com biorreatores em série. As seguintes vantagens da condução contínua podem ser apontadas: inexistência de tempos improdutivos, levando o biorreator a permanecer muito mais tempo em serviço; as operações que antecedem e sucedem o processo podem ser realizadas continuamente; possibilidade de instrumentação e controle

automático, levando a menores gastos com mão de obra; maior uniformidade do produto; e as condições ambientais são constantes, o que possibilita o estudo das várias influências sobre o agente do bioprocesso. No entanto, riscos de contaminação e problemas ligados à degenerescência do agente (mutação e variação) são citados como desvantagens da condução contínua.

Ressalta-se que esta forma de condução do processo é particularmente adequada para a escolha das fontes de carbono e nitrogênio e também de outros nutrientes. Sumariamente, se uma cultura contínua em estado permanente é submetida a pulsos contendo componentes individuais e se a concentração celular ou do produto de interesse mostrar um aumento transiente, então aquele componente particular é limitante para o crescimento ou para a produção e sua concentração no meio deverá ser aumentada para maximizar os rendimentos. Indutores e repressores podem ser identificados a partir do aumento ou da diminuição transiente do rendimento, em função da adição de tais moléculas. Portanto, os componentes-chaves de um meio podem ser rapidamente identificados sem a necessidade de um grande número de experimentos em frascos agitados, como mencionado anteriormente.

A eleição da forma de condução será função da cinética do Bioprocesso, tendo-se que avaliar o momento em que a síntese do produto se inicia. Desta forma, em que pesem as complexidades dos bioprocessos, estes podem apresentar a síntese do produto de forma associada, semi-associada e não associada ao crescimento microbiano. Pelo estudo cinético, pode-se orientar no projeto do processo que melhor convém ao bioprocesso. Assim é que, os produtos que se formam associadamente ao crescimento podem ter ser processos conduzidos continuamente. Já no caso de produtos que têm a sua síntese de forma não associada ao crescimento, a distinção de duas fases orienta no sentido de realizar-se a produção do agente separadamente, tendo até um meio de composição diferente ao de produção. O processo deverá, portanto, ser operado em duas fases e, desta forma, passível de ser conduzido continuamente. Conclusões análogas à anterior, aplicam-se aos processos que apresentam cinética mista (semi-associada).

A seguir, estão ilustradas as diferentes formas de condução de bioprocessos para uma melhor compreensão dos possíveis arranjos produtivos (Figuras 13 a 20).

Obviamente, que a escolha de um desses arranjos está ligada, como mencionado anteriormente, à cinética do processo, mas também aos aspectos técnicos e econômicos do bioprocesso em desenvolvimento. Por exemplo, a reutilização de células traz benefícios econômicos, no que concerne a utilização mais efetiva do substrato para a síntese do produto propriamente dita, minimizando o consumo deste reagente primário para a plasticidade celular. Da mesma forma, o reciclo de células na condução contínua permite que se trabalhe com os biorreatores com altas densidades celulares, resultando em aumentos na produtividade volumétrica e específica do bioprocesso. Estas estratégias são particularmente interessantes no caso do produto ser uma substância de baixo valor agregado. Por outro lado, substâncias de alto valor agregado (como antibióticos, vitaminas e proteínas terapêuticas) que, via de regra, apresentam cinéticas de produção mais lentas, devem ter seus processos de produção atendendo aos mais altos padrões de qualidade. Neste sentido, alto rigor estéril é requerido e a adoção da reutilização de células não se mostra como uma alternativa interessante para a condução desses bioprocessos, pelos riscos inerentes de contaminação.

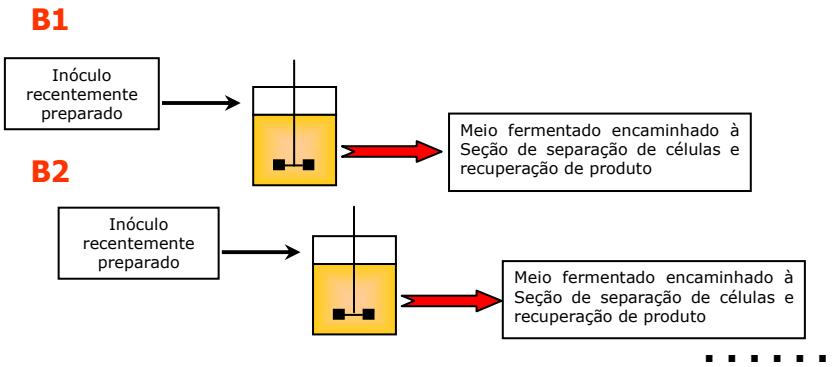


Figura 13: Batelada com um inóculo para cada biorreator

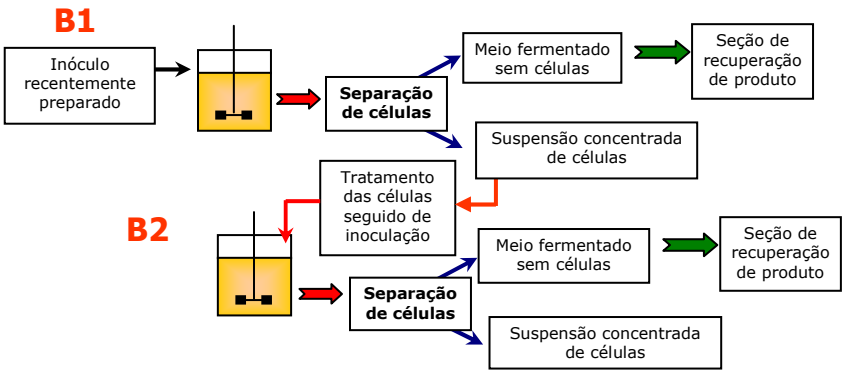


Figura 14: Batelada com recuperação do inóculo.

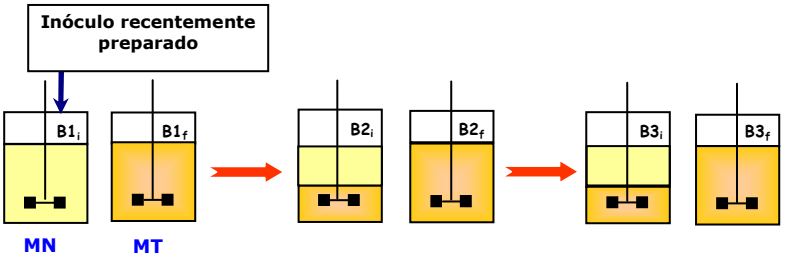


Figura 15: Batelada seqüencial ou repetida.

BN_i: início da batelada: BN_f: final da batelada. MN: meio novo; MT: meio transformado.

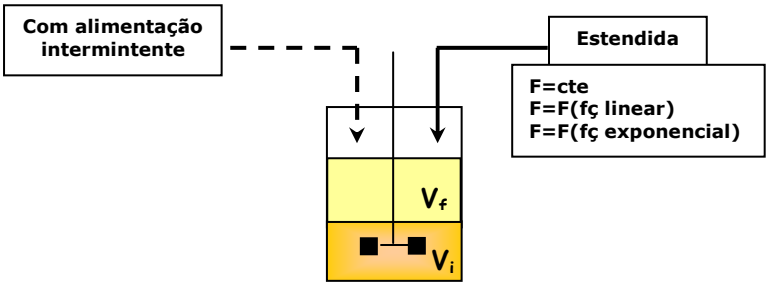


Figura 16: Batelada alimentada com diferentes formas de alimentação.
V_i: volume inicial; V_f: volume final.

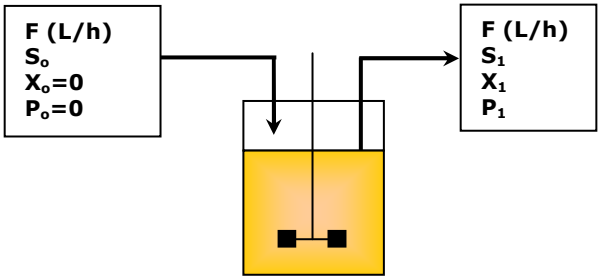


Figura 17: Processo Contínuo com um único biorreator.
F: vazão de alimentação e de meio transformado; S: concentração de substrato; X: concentração de células; P: concentração de produto (o índice "o" refere-se à condição inicial e o índice "1" às concentrações na corrente que sai do biorreator).

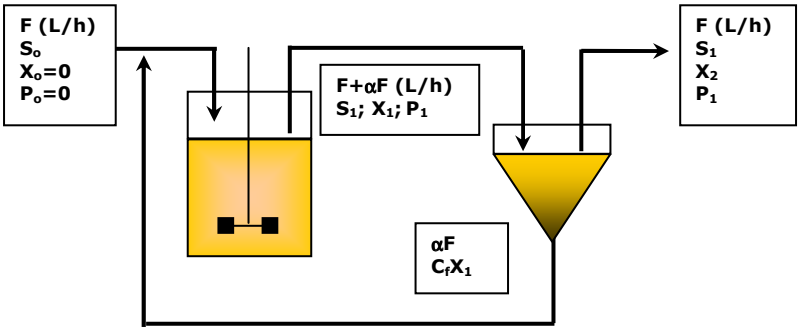


Figura 18: Processo Contínuo com um único biorreator e com reciclo de células.
F: vazão de alimentação e de meio transformado; S: concentração de substrato; X: concentração de células e P: concentração de produto (o índice "o" refere-se à condição inicial; o índice "1" às concentrações na corrente que sai do biorreator e o índice "2" às concentrações que saem do separador). α: razão de reciclo e C_f: fator de concentração de células. Note que no separador as concentrações de substrato e produto são as mesmas que saem do biorreator, admitindo-se que não haja transformação na seção de separação de células.

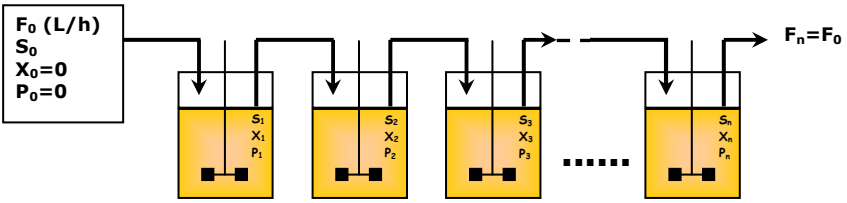


Figura 19: Processo Contínuo com biorreatores em série sem alimentação adicional.
Os índices de S; X e P referem-se aos valores correspondentes à ordem do biorreator da série.

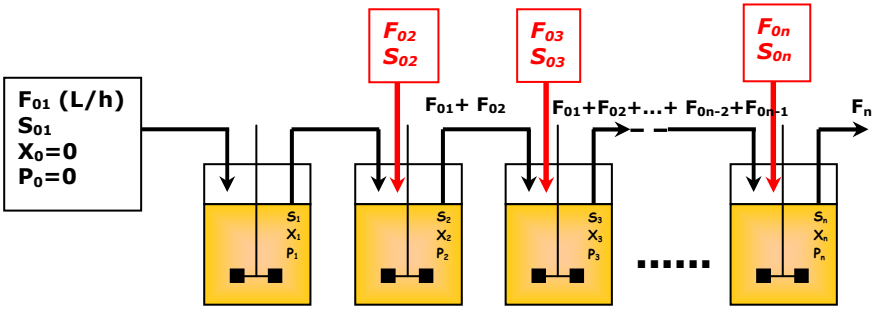


Figura 20: Processo Contínuo com biorreatores em série com alimentação adicional.
Os índices de F_0; S; X e P referem-se aos valores correspondentes à ordem do biorreator da série.

9.2. Quanto ao desenvolvimento do agente microbiano

Bioprocessos podem ainda ser operados em superfície, em profundidade (submerso) e por fermentação no estado sólido. Os **processos em superfície** são aqueles em que a biomassa (massa de células) situa-se na superfície do meio líquido, em contato direto com o ar atmosférico, que fornece o oxigênio necessário à população celular. O meio de cultivo é colocado em recipientes rasos, de modo a oferecer grande área ao desenvolvimento do agente. A diminuição da concentração de nutrientes nas camadas superficiais faz com que cheguem à superfície, por difusão, os nutrientes existentes nas camadas mais profundas. Também, por difusão, o(s) produto(s) do metabolismo se dispersa(m) no meio em fermentação. Pelo exposto, a difusão e a relação entre a área oferecida e o volume de meio desempenham papel importante no estudo de bioprocessos operados em superfície. Este tipo de Bioprocesso limita-se, via de regra, aos fungos filamentosos, que tendem formar película micelial na superfície do meio. No entanto, registra-se a produção clássica de vinagre pelo processo Orleanense, que é realizada por determinadas espécies de bactérias aeróbicas do

gênero *Acetobacter*. Pelo fato de as taxas de transferência de massa de nutrientes serem reduzidas, os tempos de fermentação são consideravelmente longos. Adicionalmente, os processos em superfície são de difícil operacionalidade e considerados anti-econômicos, pois resultam em alto custo de produção devido à custosa manipulação com esterilização (incluindo ambiente), enchimento, esvaziamento e limpeza das várias bandejas necessárias à produção em larga escala.

Os **processos submersos** são aqueles em que a célula produtora se desenvolve no seio do meio de cultivo, geralmente agitado e, no caso de fermentações aeróbicas, o oxigênio necessário à população em desenvolvimento é suprido, através de um compressor, por borbulhamento de ar no líquido. Comparados com os processos em superfície, os processos submersos oferecem uma série de vantagens, como por exemplo: podem-se manipular, com maior facilidade, maiores volumes de meio, facilitando a sua operacionalidade; a massa de células responsáveis pela transformação fica totalmente submersa no meio nutriente uniforme, que pode ser ajustado para fornecer as condições ideais de crescimento e produção. Absorção de nutrientes e excreção de metabólitos são realizadas com maior eficiência, levando a menores tempos de processo e, consequentemente, ganhando-se em produtividade. Atualmente, a maioria das fermentações industriais importantes é realizada por processo submerso. Pode-se citar que uma determinante na redução no preço de muitos produtos, anteriormente obtidos por processos em superfície, foi a possibilidade de adaptá-los aos processos submersos. O exemplo clássico é, novamente, a produção de penicilina que teve seu processo de produção modificado nos idos de 40. O desenvolvimento da tecnologia de fermentação submersa para a produção de antibióticos foi logo adotado pela indústria de enzimas e, hoje, a maioria delas é produzida por este processo.

A **fermentação no estado sólido** é definida como um processo no qual o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem na superfície de substratos sólidos e na ausência de água livre, diferentemente da fermentação submersa e em superfície, em que, via de regra, o(s) substrato(s) e outros nutrientes encontram-se na sua forma solúvel. Substratos tradicionalmente utilizados constituem-se em produtos agrícolas como o arroz, o trigo, o painço, a cevada, o milho e a soja, além de substratos não convencionais como os resíduos agro-industriais e florestais, destacando-se: o bagaço de cana-de-açúcar, o sabugo de milho, o farelo de trigo e a palha de arroz. Estes resíduos têm despertado grande interesse da comunidade científica e industrial, pela possibilidade de seu uso como matérias-primas para bioconversões, o que é corroborado pelo número crescente de publicações neste tema. O grande interesse decorre do fato dessas matérias-primas não possuírem custos de produção associados diretamente, sendo uma forma de se agregar valor a resíduos que se formam em abundância nos setores agrícolas e agro-industriais. Adicionalmente, dá-se solução para o acúmulo dessas biomassas residuais, que representam um sério problema ambiental para as indústrias. Em resumo, a operação da fermentação no estado sólido pode ser realizada sem agitação mecânica, com agitação ocasional ou contínua, ou em colunas recheadas com circulação de líquido (Raghavarao *et al.*, 2003).

A fermentação em estado sólido apresenta as seguintes vantagens:

- Simplicidade dos meios de cultivo. O substrato sólido pode requerer somente

adição de água, embora outros nutrientes possam ser adicionados;
- Ausência de requerimentos de máquinas e equipamentos sofisticados;
- Os biorreatores podem ter dimensões menores pelo fato do substrato devido ao baixo conteúdo em água do sistema;
- Demanda reduzida de energia;
- Baixo grau de umidade, reduzindo os problemas de contaminação;
- As condições de crescimento do microrganismo agente do bioprocesso são similares às encontradas em seu ambiente natural;
- Os produtos, principalmente enzimas, são obtidos em maiores concentrações do que em fermentações submersas;
- Ausência de formação de espuma;
- Material fermentado pode ser extraído imediatamente pela adição direta de solventes, ou por filtração.

Porém, existem alguns fatores limitantes nas fermentações no estado sólido, tais como: menor disponibilidade e acessibilidade ao(s) substrato(s); só podem ser operadas em batelada; problemas de transferência de massa (oxigênio e nutrientes), calor e momento; dificuldades no aumento de escala e, principalmente, no monitoramento e no controle das variáveis físico-químicas, tais como: pH, temperatura, oxigênio e grau de mistura.

9.3. Quanto ao suprimento de oxigênio

O fornecimento de oxigênio está intrinsecamente ligado ao metabolimo da célula ou ainda ao direcionamento que se impõe a este, de modo a se obter o produto desejado. Sendo assim, os Bioprocessos podem ser desenvolvidos com e sem aeração. Os processos aerados são aqueles que se passam com absorção de oxigênio livre, podendo ser realizados com aeração natural ou forçada. Na primeira modalidade o oxigênio necessário ao cultivo provém do ar ambiente. Grande parte dos processos em superfície e em fermentação no estado sólido, descritos anteriormente, são aerados de forma natural.

Nas células de metabolismo aeróbio, o oxigênio é especialmente utilizado como aceptor final de elétrons, participando, ao término da cadeia respiratória, na reoxidação de co-enzimas, resultando na produção de ATP, que é a principal fonte de energia nas células. Por outro lado, como será visto mais adiante, o oxigênio é pouco solúvel em água, sendo o valor da sua concentração de saturação da ordem de alguns miligramas por litro. Em virtude disto, torna-se impossível fornecer de uma só vez todo o oxigênio necessário a uma cultura em desenvolvimento, devendo o mesmo ser continuamente suprido ao biorrreator, independentemente da forma de operação do Bioprocesso.

Em Bioprocessos com aeração forçada, o ar atmosférico esterilizado é normalmente borbulhado no seio do meio, onde se dissolve parte do oxigênio que é utilizado pelo agente da transformação. A Figura 21 ilustra o percurso do oxigênio da fase gasosa até o interior da célula, na qual se podem observar as diferentes resistências opostas a sua transferência até a absorção pela célula. O grande campo de aplicação da aeração forçada situa-se nos processos submersos, que por permitir uma mais rápida solubilização do oxigênio no meio, torna-o mais facilmente utilizável. Algumas vezes emprega-se oxigênio puro ou misturado ao ar, o que resulta em melhorias na transferência de massa da fase gasosa para a líquida, com a conseqüente melhoria no desempenho do Bioprocesso.

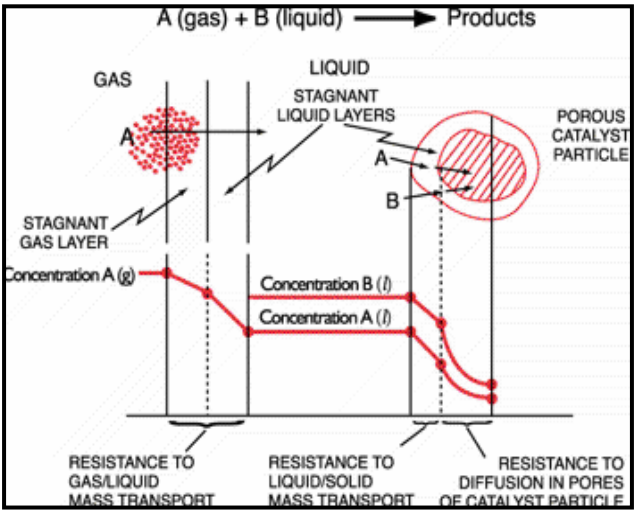


Figura 21: Transferência de oxigênio da fase gasosa até a biopartícula catalítica.

O fornecimento de oxigênio a uma cultura em desenvolvimento, muitas vezes se constitui no "gargalo" da tecnologia de produção. É comum, que determinadas fermentações aeradas, estejam limitadas em suas possibilidades de melhorar rendimento e produtividade, não por razões inerentes à capacidade das células, mas sim por problemas no projeto e operação de biorreatores, em relação à necessidade de satisfazer, principalmente, as altas demandas de transferência de massa, mas também de momento e de calor.

Para se determinar a taxa ótima de transferência de massa ou taxa de absorção de oxigênio da fase gasosa para a líquida, deve-se atentar para dois aspectos: o suprimento e a demanda de oxigênio. Evidentemente, que em um meio em fermentação, a taxa com que o oxigênio se dissolve é dada pela diferença entre o que se fornece e o que é efetivamente utilizado pelas células. O **suprimento** está relacionado às variáveis de ordem física, tais como: vazão de ar, velocidade de agitação, grau de mistura, temperatura, geometria do biorreator etc, sendo estudado pelas teorias clássicas de transferência de massa gás-líquido. Já a **demanda** está ligada à fisiologia da célula e diz respeito à quantidade de oxigênio dissolvido necessária ao cultivo sendo, portanto, proporcional à massa de células. Define-se, assim, como demanda a quantidade de oxigênio necessária por unidade de tempo e por unidade de volume de meio de cultivo ou em fermentação. Matematicamente, o balanço de oxigênio para um biorreator em operação pode ser expresso pela seguinte equação (Bailey & Ollis, 1986):

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a \left(C_S - C_L\right) - q_{O_2} X$$

onde:

dC_L/dt: taxa de transferência de O_2 ou taxa de absorção de O_2, moles de O_2 /m^3.h
K_L: coeficiente global de transferência de massa de O_2 na fase líquida, m/h
a: área específica da superfície de interface, m^{-1}
C_S: concentração de saturação de O_2 dissolvido, moles/m^3
C_L: concentração de O_2 dissolvido no seio do meio em fermentação, moles/m^3
q_{O2}: demanda específica de oxigênio, moles de O_2/g células.h
X: concentração de células no meio em fermentação, g/m^3

Se a demanda supera as possibilidades de suprimento, o crescimento se realiza com limitação de oxigênio, no entanto, muitas vezes a produção de determinada substância de interesse comercial se dá em condições de restrição de oxigênio.

Na prática, o ideal e o econômico seria igualar o suprimento à demanda, mas isto se torna difícil e não recomendável devido à baixa solubilidade do oxigênio em meios líquidos. As temperaturas para a produção de biomoléculas por fermentação estão na faixa de 30°C e nesta, a solubilidade do oxigênio em água pura é cerca de, apenas, 7 mg/L, diminuindo notoriamente com o aumento da temperatura. Em um meio de cultivo líquido a solubilidade do oxigênio torna-se ainda menor devido à presença de solutos (células e sais). Por conseguinte, o potencial de transferência encontra-se limitado pelo baixo valor de C_s. Adicionalmente, a alta resistência à dissolução do oxigênio, nestas condições, resulta em um baixo valor para a capacidade de oxigenação do biorreator (K_La).

O sistema de fornecimento de ar deverá incluir necessariamente tubulações, válvulas, medidores e reguladores de pressão, rotâmetros, pré-filtros e filtros de ar para a remoção de todas as partículas maiores que 0,22 μm.

Pesquisas na área de desenvolvimento de Bioprocessos anaeróbicos têm sido também intensificadas nos últimos 20 anos. Os microrganismos agentes desses processos, além de sua importância clínica, apresentam considerável importância ecológica, como também grande interesse industrial. O cultivo desses agentes biológicos, anaeróbios estritos, requer técnicas que efetivamente removam o oxigênio (ar) do meio líquido e da fase gasosa em contato com fase líquida. Os biorreatores industriais utilizados nesses cultivos devem possuir alta relação altura:diâmetro, e o borbulhamento de gases inertes, como nitrogênio, muitas vezes é requerido para assegurar condições plenas de anaerobiose. Os dois clássicos exemplos de processos anaeróbicos são: a fermentação acetona-butanólica e a metanogênica. Analogamente à produção de metano, a fermentação acetona-butanólica é realizada em duas fases: a "acetogênica", na qual há a produção de ácidos orgânicos e hidrogênio e a "solventogênica", processo que converte ácidos orgânicos a solventes (acetona, butanol e etanol). Nestas fermentações a agitação física é difícil ou onerosa e o transporte de nutrientes essenciais pode estar limitado pela difusão, o que ocasiona redução nas taxas de metabolização.

A taxa de reação em biorreatores é diretamente proporcional à concentração de biomassa. Em bioprocessos anaeróbicos, o rendimento em biomassa é baixo e a quantidade de células que pode ser produzida a partir do(s) substrato(s) é limitada. A economicidade desses processos e as taxas de biorreação podem ser aumentadas pela retenção da biomassa no sistema reacional, empregando técnicas de imobilização (passiva ou ativa) ou mesmo pela adoção de

configurações de biorreatores que permitam a retenção da biomassa, como os biorreatores a membrana, ou com dispositivos internos de retenção de biomassa (biorreator UASB - ***U**pward-Flow **A**naerobic **S**ludge **B**lanket Reactor*).

10. Processos de Separação e Purificação do Produto

Outra parte integrante de um bioprocesso e que também define o seu êxito é a seção de recuperação de produto (*downstream processing*). Nesta fase, informações de aspectos citológicos e fisiológicos do microrganismo serão de grande valia. A fisiologia microbiana indicará não apenas a geração como também a localização do produto. Se o mesmo for secretado, as etapas de recuperação seguem um roteiro diferente da recuperação do produto intracelular, como esquematizado na Figura 3. No segundo caso será necessário romper estruturas celulares cuja composição será importante na escolha das técnicas adequadas para a liberação do produto.

O projeto dos equipamentos que irão compor esta seção será função da localização do produto (intracelular ou extracelular), do seu tamanho molecular, concentração, solubilidade, polaridade, volatilidade e de outras propriedades físico-químicas do meio de fermentação, como viscosidade, densidade, impurezas e partículas indesejáveis. A opção pela(s) operação(ões) de separação será influenciada pelo tamanho do próprio bioprocesso e do valor do produto. Os arranjos deverão ser em série a fim de se atingir o grau de pureza requerida (ex. extratos enzimáticos brutos ou enzima purificada) e a forma final exigida para um dado produto (produto cristalizado, liofilizado, líquido concentrado, prensado). A seqüência de operações, através da qual o meio contendo a biomolécula a ser separada deve passar para a obtenção de um produto de alta pureza, constitui-se basicamente de quatro etapas (Abrahão Neto, 2001).

1. Remoção de material insolúvel (particulado). Operações comuns: filtração, centrifugação, decantação ou sedimentação.
2. Isolamento primário. Durante esta etapa a concentração de produto aumenta consideravelmente e substâncias com diferentes polaridades são separadas do produto. Operações típicas: extração por solvente, precipitação e ultrafiltração.
3. Purificação. Destina-se à remoção de impurezas como também concentração de produto. Exemplos são: a precipitação fracionada e muitos tipos de cromatografia líquida de alto desempenho.
4. Isolamento final do produto: Esta última etapa deve fornecer o produto desejado em uma forma adequada para formulação final ou comercialização direta. As operações aqui incluem: centrifugação e subseqüente secagem de um produto cristalizado (liofilizado ou seco por *spray drying*).

11. Extrapolação de Escala

A extrapolação de escala é um problema comum a vários ramos da Engenharia Química. No caso de Bioprocessos conduzidos com células (microbianas ou não), entretanto, o assunto tem tratamento especial. Além de se utilizar de conceitos estabelecidos no tratamento de outros processos da indústria química, deve-se levar em consideração, a característica especial de um

bioprocesso para a produção de substâncias de interesse comercial*: a presença de um ser vivo*. A extrapolação de escala envolve dois aspectos: a ampliação de escala (*scale up*) e a redução de escala (*scale down*) (Figura 22). Na ampliação de escala, utiliza-se dados obtidos na otimização do processo em escala piloto ou de laboratório para estabelecimento das variáveis de operação na escala industrial. A redução de escala diz respeito à reprodução em equipamento piloto das condições ambientais que possam ser obtidas na planta industrial, a fim de permitir a obtenção de resultados aplicáveis à melhoria do processo já instalado na fase maior.

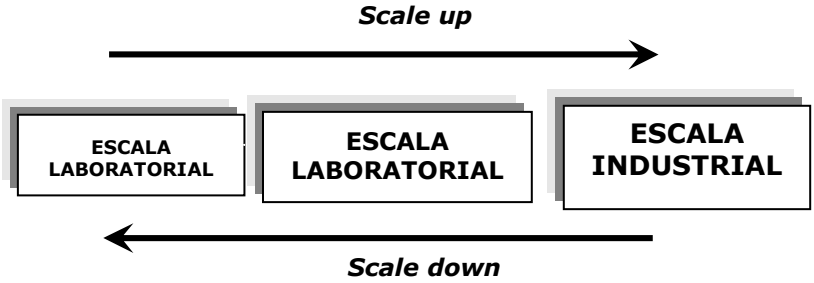


Figura 22: Ampliação e redução de escala em Bioprocessos.

A extrapolação de escala se constituiu em um dos grandes desafios da *Engenharia Bioquímica*. Muitas vezes ao se ampliar a escala de produção, obtêm-se resultados diferentes e insatisfatórios àqueles obtidos em escalas reduzidas (laboratorial e piloto). Isto se deve seguramente ao fato das condições ambientais não terem sido mantidas constantes, afetando, consequentemente, o comportamento das células do agente biológico em questão.

A escala industrial depende do tipo de substância que se esteja produzindo. Obviamente que o tamanho da escala será uma função de fatores econômicos ligados, principalmente, à demanda do produto pelo mercado consumidor, bem como o seu valor agregado. Via de regra, quanto menor o valor agregado do produto, maior a escala de produção, a fim de se garantir o êxito econômico (rentabilidade) da empresa em relação ao capital nela investido. Em escala de produção industrial, podemos encontrar biorreatores de algumas centenas até alguns milhões de litros (Tabela 9). No entanto, em todos os casos, os Bioprocessos desenvolvidos em escala laboratorial ou de bancada, requererão, em maior ou menor grau, uma etapa de escalonamento.

Na ampliação de escala, utiliza-se dados obtidos na otimização do processo em escala piloto, ou de laboratório, para estabelecimento das variáveis de operação na escala industrial. A regra básica na ampliação de escala em Bioprocessos é procurar manter, nas diferentes escalas, as condições ambientais ótimas. Estaremos, assim, fornecendo as condições necessárias para se ter a reprodutibilidade da atividade fisiológica do microrganismo (o agente da transformação química do substrato em produto).

Tabela 9: Escala de produção de Bioprocessos.

Bioprocesso	***Tamanho do Biorreator*** (m^3)
Álcool; Antibióticos; Amino-ácidos e Leveduras	50 a 500
Cerveja	2.000
Tratamento de Efluentes	20.000
Novas Biomoléculas (m.os recombinantes, células animais ou vegetais)	algumas centenas de litros (máx)

Há vários critérios para ampliação de escala, baseados na similaridade necessária para se conseguir as mesmas respostas obtidas em escalas reduzidas. A aplicação adequada de cada um deles, ou a sua combinação com outro(s) depende de uma série de fatores, característicos para cada Bioprocesso. Os critérios de similaridade usualmente utilizados no trato deste problema são os seguintes:

- similaridade geométrica: relação constante entre as dimensões lineares correspondentes nas duas escalas;
- similaridade cinemática: manutenção da velocidade do fluido em pontos equivalentes nas duas escalas;
- similaridade dinâmica: manutenção das forças aplicadas nas duas escalas;
- similaridade térmica: manutenção da temperatura em pontos equivalentes nas duas escalas;
- similaridade química: manutenção da composição química do meio em pontos equivalentes nas duas escalas.

A primeira mudança de escala que um bioprocesso experimenta é quando se passa da etapa de investigação em frascos agitados a uma que envolve biorreatores pequenos de laboratório. As condições estabelecidas em frascos agitados são, em geral, de difícil reprodução em escalas maiores. A etapa seguinte no escalonamento de um bioprocesso ocorre quando se trata de reproduzir as condições ambientais entre um biorreator de laboratório e um de nível piloto ou industrial. Neste caso, mesmo que se mantenha a similaridade geométrica entre os biorreatores envolvidos, não é possível manter constantes todas as variáveis físico-químicas que determinam o micro-ambiente da biomassa presente no biorreator. Ao ampliar-se a escala, há parâmetros que modificam necessariamente. Os mais evidentes são a relação *área/volume* e a *pressão hidrostática*.

Se considerarmos um biorreator com geometria tipicamente cilíndrica, é claro que a área (que determina, por exemplo, a transferência de calor e o nível de aeração superficial) aumenta ao quadrado com a escala, enquanto o volume é uma função cúbica da escala. Isto faz com que a relação *área/volume* se modifique pelo simples fato de se aumentar o tamanho do biorreator, o que implica numa transferência de oxigênio superficial mais importante nos biorreatores de laboratório, sendo praticamente desprezível em biorreatores de grande escala (Geraats, 1994).

Outro aspecto que se altera necessariamente com a escala é a *pressão hidrostática*. Em biorreatores industriais, a pressão no fundo do tanque pode assumir várias atmosferas, enquanto que em biorreatores de laboratório ou piloto, a diferença de pressão entre a superfície e o fundo do tanque é mínima. Isto afeta significativamente a solubilidade do oxigênio e mesmo de gases do metabolismo celular, como o CO_2.

Outra razão para a dificuldade que se impõe em relação à dificuldade de manutenção das condições ambientais com o aumento de escala, deve-se a problemas ligados à *homogeneidade* do sistema. Os biorreatores pequenos, em geral, podem ser considerados bem misturados, sendo as condições operacionais medidas com sensores, e representativas do que ocorre em todo o equipamento, não sendo o caso de biorreatores industriais, incluindo aqueles de menor tamanho que operam fluidos viscosos e não Newtonianos.

Os aspectos de natureza física das condições ambientais (transferência de massa e calor, características do escoamento, grau de mistura, cisalhamento etc) dependem do tamanho do biorreator, podendo ser grande as variações quando a geometria da escala ampliada for diferente daquela menor, onde foi otimizado o Bioprocesso. Por outro lado, ao se aplicar a similaridade geométrica plena, verifica-se que a relação entre a área superficial (proporcional ao quadrado do diâmetro) e o volume (proporcional ao cubo do diâmetro) de um biorreator decresce acentuadamente com o aumento da escala. Isto tem implicações diretas na transferência de calor para esterilização do equipamento e meio, bem como para o controle da temperatura de fermentação.

Um outro exemplo que impede que a similaridade geométrica plena seja adotada em biorreatores de mistura completa está ligado à velocidade periférica, definida como $v_p=\pi DN$ (onde: D=diâmetro do impelidor e N=velocidade de agitação). Ao se ampliar a escala, mantendo-se a velocidade de agitação constante, ter-se-ão diferentes valores para este parâmetro, refletindo diretamente sobre a reologia do sistema. Adicionalmente, cultivos com microrganismos filamentosos ou suscetíveis a forças cisalhantes poderão ter sua morfologia alterada, resultando em diferentes respostas metabólicas ou perda de sua viabilidade.

A recomendação é que se identifique a variável-chave do processo, isto é, a mais sensível ao escalonamento. Os critérios mais usados são parâmetros físicos relacionados com as variáveis de operação. Avaliando os critérios mais comumente empregados na extrapolação de escala de fermentadores, Belmar (1984) destaca como mais importantes: o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La), a potência por unidade de volume (P_g/V) e a velocidade periférica (ND). Desta forma, o sistema é projetado, mantendo este critério de ampliação de escala, enquanto que os outros parâmetros, menos importantes, variarão.

12. Tratamento Biológico de Resíduos/Efluentes

Com o processo de industrialização e o desenvolvimento de tecnologias e produtos cada vez mais avançados, não só o progresso e o bem-estar foram gerados. Problemas ligados à poluição ambiental foram se acentuando e trouxeram como conseqüência a necessidade da conscientização quanto à importância da restrição de lançamentos indiscriminados de resíduos nos solos,

rios, lagos, oceanos e na atmosfera. Em todos esses ambientes habitam microrganismos. Por causa desta característica de crescimento nos mais variados ambientes, os microrganismos desempenham função-chave na reciclagem dos elementos na natureza.

A tecnologia de tratamento de efluentes difere ligeiramente da tecnologia de obtenção de bioprodutos industriais. Para o tratamento de efluentes, prescinde-se, naturalmente, dos cuidados assépticos ou da manutenção de culturas puras, como ressaltado anteriormente. A natureza nos ensina que uma população mista que estabelece uma interação positiva entre diferentes grupos ou espécies microbianas é capaz de transformar compostos de elevado grau de complexidade. Os compostos intermediários resultantes são, então, transformados em outros até que substâncias não tóxicas sejam geradas, numa cadeia de eventos em que todos os microrganismos desempenham um papel metabólico de vital importância para que a descontaminação/destoxificação do ambiente se estabeleça.

O tratamento de efluentes pode ser dividido basicamente em três etapas: **tratamento primário**, que visa à remoção dos contaminantes mais facilmente separáveis (partículas com tamanho superior a 100 μm). Operações típicas: gradeamento; desarenamento e desengorduramento.

Retiradas as partículas sedimentáveis, partículas suspensas menores e material solúvel são removidos no **tratamento secundário**. Estes materiais, em sua grande maioria, são orgânicos, sendo comum o tratamento biológico nestes casos. Devido à enorme habilidade em degradar um amplo espectro de substâncias orgânicas, bactérias, actinomicetos, leveduras, fungos filamentosos e protozoários têm sido cada vez mais empregados como agentes de transformação dos mais diferentes compostos, apresentando-se como alternativas poderosas aos métodos convencionais baseados na simples disposição e na energia térmica. A extensão desta degradação varia entre o que se denomina de biotransformação e mineralização. A primeira se constitui na degradação parcial de um composto e na formação de uma ou mais substâncias, que podem ou não ser menos tóxicas que o composto de origem. Já a mineralização é a transformação total de uma substância orgânica em outras inorgânicas, tais como dióxido de carbono e água.

A degradação da matéria orgânica, contida em efluentes industriais, é realizada biologicamente por uma grande variedade de microrganismos, que agem muitas vezes de forma sinérgica. Esses microrganismos são usados para converter matéria orgânica coloidal e carbonácea dissolvida em biomassa. Atualmente, diferentes compostos tóxicos têm sido degradados por ação microbiana, dentre eles hidrocarbonetos derivados de petróleo, herbicidas e pesticidas contendo organoclorados, organofosfatados, polímeros etc (Davis & Cornwell, 1991).

Pelo fato de a biomassa possuir densidade ligeiramente superior a da água, sua sedimentação é possível, permitindo a sua separação do material líquido tratado. Esta importante característica é utilizada como base de uma série de concepções de processo para o tratamento biológico de resíduos e efluentes sanitários ou industriais. É importante notar que a biomassa residual é também matéria orgânica, devendo-se buscar alternativas/soluções para sua destinação (reciclo no próprio biotratamento, digestão anaeróbica, incineração, disposição em aterros sanitários etc).

Dentre os processos biológicos tradicionais destacam-se: os *Lodos ativados* (processo contínuo e aerado, com reciclo da microbiota floculante); a *Digestão anaeróbica*, que além de reduzir a carga orgânica produz metano; a *Nitrificação*, processo que possibilita a oxidação de amônia a nitrito e, posteriormente, a nitrato, produzindo um efluente final com baixa demanda bioquímica de oxigênio. Outros tipos de processo incluem: lagoas aeradas, biodiscos, filtros percoladores, reatores seqüenciais descontínuos. Ressalta-se que muitas vezes faz-se necessária a combinação de processos biológicos para efetiva degradação do material orgânico e inorgânico. A figura, a seguir, ilustra uma concepção típica de um processo de tratamento biológico de efluentes.

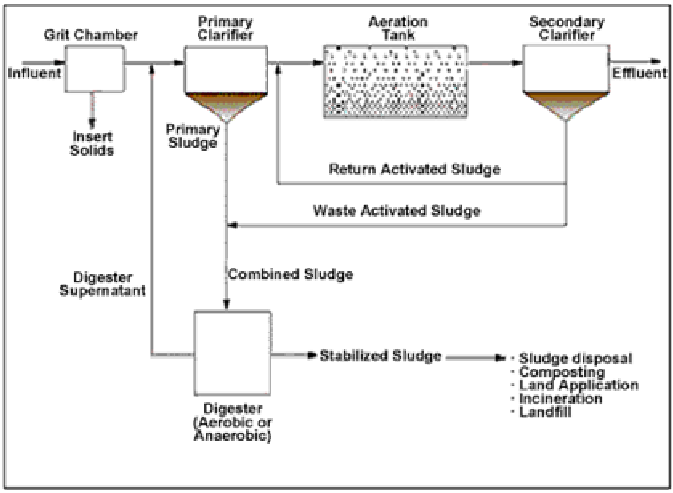


Figura 15: Representação esquemática de um processo de tratamento de efluentes. Fonte: Davis & Cornwell (1991).

O sistema de tratamento biológico por meio de lodos ativados é muito eficiente e largamente utilizado no tratamento de resíduos e efluentes domésticos e industriais. Para que o sistema funcione deve haver transformação bioquímica da matéria orgânica solúvel e insolúvel (coloidal), assim como da matéria inorgânica (N e P), sendo o ambiente bioquímico determinante na diversidade da comunidade microbiana para a efetiva degradação do resíduo/efluente a ser tratado.

Quanto à configuração do biorreator, a biomassa pode estar em suspensão ou aderida em suportes. Em relação ao oxigênio, os processos aeróbios suportam uma cadeia alimentar completa, desde bactérias até rotíferos; os anóxicos são mais limitados em variedades de organismos e os anaeróbios são predominantemente bacterianos.

O **tratamento terciário** é direcionado a remoção de todos ou alguns contaminantes remanescentes. Esta etapa é muitas vezes necessária para enquadrar o efluente final às condições de qualidade exigidas para o lançamento e disposição final no ambiente, seja qual for o corpo receptor. Os processos usados nesta etapa incluem tipicamente a filtração, ultra-filtração e adsorção.

Processos mais sofisticados empregam ainda a eletrodiálise e a osmose reversa.

Após o tratamento biológico, a filtração é uma operação muitas vezes compulsória, para o posterior descarte do efluente tratado e clarificado. Trata-se de um método mecânico de separação, que visa à remoção de sólidos suspensos ou de flocos resultantes das operações de floculação/coagulação. Um dos princípios mais importantes da filtração é que os sólidos recolhidos acabam por se constituir auxiliares da filtração, na medida em que se depositam na superfície filtrante. A remoção do material particulado depende muito do tamanho das partículas em questão, sendo, para as partículas de maiores dimensões, de fácil aplicação. No entanto, para partículas de dimensões relativamente reduzidas, a operação de filtração pode tornar-se extremamente dispendiosa. A filtração é também comum na desidratação de lamas resultantes dos diferentes tratamentos.

Para a separação de contaminantes remanescentes de menores dimensões e dissolvidos na fração aquosa, a técnica de ultra-filtração vem cada vez mais sendo aplicada no setor industrial, principalmente por possibilitar o reuso da água. Trata-se de um método que permite a separação de dois ou mais líquidos diferentes por meio da classificação dos tamanhos de moléculas existentes em uma mistura. O equipamento de ultra-filtração consiste em uma (ou várias) membranas adequadas ao que se deseja separar, onde o fluxo líquido é impulsionado por intermédio de uma bomba. O volume filtrado é direcionado para o recipiente de coleta e o fluxo é reprocessado várias vezes até que se elimine(m) todo(s) o(s) composto(s) indesejado(s). Na prática, uma bomba recircula continuamente o efluente contido em um tanque de armazenamento fazendo com que este passe pela superfície da membrana e retorne para o tanque. Cada passagem pela membrana resulta em um efluente mais concentrado, com moléculas maiores, enquanto a água e outras moléculas menores são extraídas do efluente. Desta forma, a água (corrente aquosa com mínima concentração de contaminantes) pode ser efetivamente separada. Neste processo chamamos a água que conseguimos extrair do sistema de "volume permeado" e o restante de "volume concentrado". Esta água recuperada pode ser simplesmente descartada ou reutilizada em outras áreas da indústria.

Outra técnica aplicada ao tratamento terciário é a adsorção, que é geralmente usada na remoção de compostos orgânicos refratários (recalcitrantes) presentes em muitos efluentes industriais e cuja remoção se torna difícil ou impossível por processos de tratamentos biológicos convencionais. É também comum utilizar-se a adsorção para tratamento de efluentes com metais pesados, sendo um processo bastante eficiente na sua remoção. O adsorvente mais comum em processos de tratamento de efluentes é o carvão ativado, que pode ter origem em diversos materiais. Destes, os mais comuns são o carvão betuminoso e linhito. O carvão ativado pode também ser produzido pela transformação, por torrefação, de materiais orgânicos em carvão granular. Os diferentes tipos de carvão ativado têm propriedades específicas dependendo do material de origem e do processo de ativação. A capacidade de adsorção traduz a eficiência do carvão na remoção de determinados contaminantes, como por exemplo, metais, cor, fenóis, etc das águas residuais. Dependendo das características do efluente um tipo de carvão pode ter um desempenho superior ao outro, desde que a sua capacidade seja maior nas concentrações de equilíbrio do efluente.

Qualquer que seja a solução adotada para o lançamento dos efluentes oriundos do processo produtivo ou na limpeza das instalações, é fundamental que a indústria disponha de sistema para o tratamento ou o condicionamento desses materiais residuais.

13. Considerações gerais

Para que Bioprocessos possam despertar o interesse tecnológico e comercial, seja na criação de um processo novo ou na otimização de um já existente, é essencial entender os fatores tecnológicos que afetam significativamente a sua competitividade. Tais processos têm seu desempenho avaliado através dos seguintes parâmetros, que ditarão sua viabilidade.

- Coeficientes de conversão em relação ao substrato consumido e à matéria-prima;
- Taxas cinéticas de consumo de substrato e de formação de produto;
- Estabilidade do biocatalisador ou da cultura;
- Produtividade;
- Concentração de produto do meio reacional.

De uma maneia geral, o programa de desenvolvimento de um Bioprocesso envolve as seguintes etapas: seleção e melhoramento de linhagens produtoras, otimização de meio de cultura em frascos agitados, experimentos em biorreatores de laboratório, avaliação em escala piloto e, posteriormente, estudos de ampliação de escala.

Bioprocessos devem ser periodicamente reavaliados e incorporados de inovações tecnológicas, a fim de se aumentar seu desempenho e lucratividade. A absorção de inovações tecnológicas, somente conseguidas através de Pesquisa & Desenvolvimento & Inovação, produz grande impacto no desenvolvimento e otimização de Bioprocessos. Assim, por exemplo, podemos lançar mão de técnicas da Biologia Molecular para dotar um microrganismo de uma determinada propriedade de interesse, ou mesmo potencializá-la, quando o agente microbiano a exibe com baixa expressão. Muito conhecimento novo é gerado, também, na área de Engenharia Metabólica, através da manipulação do metabolismo, decorrente de fenômenos de indução, repressão e até inativação de determinadas enzimas, levando à formação preferencial de um dado produto, por exemplo.

As técnicas de imobilização celular, que possibilitam a supressão de equipamentos onerosos para separação de células; os biorreatores não convencionais, menos intensivos em energia e mais eficientes e produtivos; o desenvolvimento de biossensores, integrados ao controle de bioprocessos; o aproveitamento de resíduos como matéria-prima para bioconversões; bem como o reciclo de efluentes no próprio processo, minimizando a sua geração, são outros exemplos de inovações e estratégias tecnológicas para se garantir o bom êxito de Bioprocessos.

Os rápidos avanços em tecnologia de DNA recombinante e fusão celular continuam a abrir novas frentes para a produção de biomoléculas, de proteínas heterólogas em diferentes sistemas de expressão, que incluem bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células animais e vegetais. Estas tecnologias têm sido aplicadas com sucesso na produção de proteínas de alto valor agregado para diagnoses, vacinas e substâncias terapêuticas, que vem atingindo vendas em

bilhões de dólares, com previsão de crescimento exponencial, e o Brasil apresenta todos os requisitos para se lançar, plenamente, no desenvolvimento da Biotecnologia, basta existir vontade política e mudança de cultura do setor industrial brasileiro.

14. Referências Bibliográficas Recomendadas

- Abrahão Neto, J. (2001). Purificação de Enzimas. In: Biotecnologia Industrial Vol 3 Processos Fermentativos e Enzimáticos. Eds. Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W; Schmidell, W.. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo, Brasil.
- Adrio, j.L. & Demain, A.L. (2003). Fungal Biotechnology. *International Microbioogy*, 6: 191-199.
- Ansejo, J.A. & Merchuck, J.C. (1995). Bioreactor System Design. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Antranikian, G. (1992) Microbial Degradation of Starch. In: Microbial Degradation of Natural Products. Ed. G. Winkelmann. New York.
- Atlas, R.M. (1997) Principles of Microbiology. 2nd ed. Wm. C. Brown Publishers, Iowa.
- Bailey, J.E. & Ollis, D.F. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill Inc., New York.
- Beggs, J.D. (1978) Transformation of Yeast by a Replicating Hydrib Plasmid. Nature, 275, 104-109.
- Belmar, M.T.C. (1984). Revisión bibliográfica, análisis y evaluación sobre la aplicación de los criterios de escalamiento en fermentaciones aerobias. Tesis de Licenciatura, Ingeniería de Alimentos, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM, México, DF.
- Bon, E. P. S. e Pereira Jr., N. (1999) Tecnologia Enzimática. E.P.S. Bon, Rio de Janeiro ISBN-85-901104-1-9.
- Breen, A. e Singleton, F. L. (1999) Fungi in Lignocellulose Breakdown and Biopulping. Current Opinion in Biotechnology 10, 252-258.
- Buckland, B.C. e Lilly, M.D. (1993) Fermentation: An Over View. In: Biotechnology vol.3 Bioprocessing, Rhem, H.-J. & Reed, G., Verlag Chemie, Basel.
- Cereghino, G.P.L, Cereghino, J.L., Ilgen, C. e Gregg, J.M. (2002) Production of recombinant proteins in fermentter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Current Opinion on Biotechnology, 13, 329-332.
- Cereghino, L. C. & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66.
- Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y.; Boyer, H.W. & and Helling, R.B. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 70 (11), 3240-3244.
- Coughan, M.P. (1985) The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 3, 39-109
- Couto, S.R. & Sanromán, M.A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry - A review. Journal of Food Engineering, 76 (3): 291-302.
- Darnell, J.; Lodish, H. e Baltimore, D. (1990) Molecular Cell Biology. 2nd ed. Scientific American Books, New York.
- Davis, M.L. & Cornwell, D.A. (1991). Introduction to Environmental Engineering. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Demain, A.L. & Solomon, N.A. (1986). Manual of Industrial Microbiology and Technology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- European Commission (2002). Final Report "Collection of Information on Enzymes". Contract no. B4-3040/2000/278245/MAR/E2. Co-operation between the Federal Environment Agency Austria and Inter-University Research Center for Technology, Austria. Disponível em: http://europa.eu.int/comm/environment/dansub/enzymerepcomplete .
- Gadd, G. M. (1988). Carbon Nutrition and Metabolism. In: Physiology of Industrial Fungi. Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK.
- Gellissen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Applied

Microbiology and Biotechnology, 54: 741-750.
- Gerhaats, S.M.G. (1994). Scaling-up of a lipase fermentation process: a practical approach, In: Advances in Bioprocess Engineering. Eds. Galindo, E. & Ramírez, 41-46, Kluwer Academic Pub., the Netherlands.
- Gerhartz, W. (1990). Enzymes in Industry. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Glazer, A. N. & Nikaido, H. (1995). Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. W. H. Freeman and Company, New York.
- Godfrey, T. (2003). The Industrial Enzymes Market: A Summary. ET Consulting. Disponível em: http://www.biocatalysts.com/frames/Biocatalysts_01.html.
- Gosh, B. K. e Ghosh, A. (1992) Degradation of Cellulose by fungal Cellulase. In: Microbial Degradation of Natural Products Ed. G. Winkelmann. New York.
- Hinnen, A., Hycks, J.B. e Fink, J.R. (1978) Transformation of Yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences-USA, 75, 1929-1933.
- Jacobsen S. E. e Wyman, E. (2000) Cellulose and Hemicellulose Hydrolysis Models for Application to Current and Novel Pretratment Process. Applied Biochemistry and Biotechnology, 84-86, 81-96.
- Jennings, D. H. (1988) Inorganic Nutrition. In: Physiology of Industrial Fungi. Blackwell Scientific Plubcation, Oxford, UK.
- Kelly, M. (1983) Yeast Extract. In: Industrial Enzimology – The Application of Enzymes in Industry. The Nature Press, New York.
- Kling, S. H.; Carvalho Neto, C.; Ferrara, M.A.; Torres, J. C. R.; Magalhães, D. B. e Ryu, D. Y. (1987) Enhancement of Enzymic Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse by Steam Explosion Pretreatment. Biotechnology and Bioengineering, 29, 1035-39.
- Krämer, R. e Sprenger, G. (1993). Metabolism. *In*: Biotechnology vol.1 Biological Fundamentals, Rhem, H.-J. e Reed, G., Verlag Chemie, Basel.
- Kuhad, R. C. e Singh, A. (1993). Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. Critical Reviews in Biotechnology, 13 (2), 39-67.
- Lambert, P.W. & Meers, J.L. (1983). The Production of Industrial Enzymes. Phil. Trans. Soc. Lond. B 300: 263-282.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M. & Parker, J. (2000). Brock Biology of Microorganisms. 9th ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA.
- Magasanik, B. & Kaiser, C.A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290: 1-18.
- Malburg Jr., L. M.; Lee, J. M. T. e Forsberg, C. W. Degradation of Cellulose by Rumen Microorganism. (1992) In: Microbial Degradation of Natural Products Ed. G.Winkelmann, New York.
- Marx, J. L. (1989). A Revolution in Biotechnology. Cambridge University Press. NY, USA.
- McNeil, B. &Harvey, L.M. (1990) Fermentation – A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford.
- Mitchell, D. A. Krieger, M., Stuart, D. M., Pandey, A. (2000). New Developments in Solid State fermentation II. Rational Approaches to the Design Operation and Scale-up of Biorreactors. Process Biochemistry, 35, 1211-1225.
- Odier, E. e Artaud, I. (1992) Degradation if Lignin. In: Microbial Degradation of Natural Products. Ed. G.Winkelmann. New York.
- Pandey, A., Soccol, C. e Mitchell, D. A. (2000). New Developments in Solid State fermentation I. Bioprocess and Bioproducts. Process Biochemistry, 35, 1135-1169.
- Panek, A.D. (1993) Yeast – 100 years of contribution to Biochemistry. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 26, 337-341.
- Pearce, C. (1997) Biologically Active Fungal Metabolites. Advances in Applied Microbiology, 44, 1-80.
- Pelczar, M. J.; Chan, E. C. S. e Krieg, N. R. (1996) Microbiologia Conceitos e Aplicações, 2ª. Ed. vol 2, Makron Books, São Paulo.
- Pereira Jr., N. & Bu'Lock, J.D. (1993). Cell wall proteins and their involvement in the flocculation of *Pichia stipitis*. Brazilian Journal of Microbiology, 24(2), 132-139.
- Pereira Jr., N. & Bu'Lock, J.D. (1994). The ionic character of the environment in the flocculation of *Pichia stipitis*. Brazilian Journal of Microbiology, 25(1), 51-56.
- Pereira Jr., N. (1991). Intensification of the Xylose Fermentation Process. *PhD Thesis*. The University of Manchester, UK.

- Piepersberg, W. (1993) *Streptomyces* and *Corynebacteria*. In: Biotechnology – Volume 1/Biological Fundamentals. H.-J. Rehm and G. Reed, Verlag Chemie, Basel.
- Pradella, J.G.C. (2001). Reatores com Células Imobilizadas. In: Biotenologia Industrial, vol. 2: Engenharia Bioquímica, 355-372. Ed. Edgard Blücher, São Paulo.
- Prescott, S.C. e DUNN, C.G. (1982) Industrial Microbiology. Avi Publishing Co. Inc., Westport.
- Priest, F.G. (1984) Extracellular Enzymes. Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd, Berkshire.
- Raghavarao, K.S.M.S.; Ranganathan, T.V. & Karanth, N.G. (2003). Biochemical Engineering Journal, 13, 127-135.
- Rehn, H.J. & Reed, G. (1993). Biotechnology, vols 1-12, VCH-Verlagsgesellchaft mbH, Weinheim, Germany.
- Rhodes, A. & Fletcher, D. L. (1963). Principles of Industrial Microbiology. Pergamon Press, Oxford, 1963.
- Sanches-Esquivel, S. (1988) Nitrogen Source Control of Microbial Processes. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Smith, A.D., Datta, S.P., Howard Smith, G., Campbell, P.N., Bentley, R. e McKenzie, H.A. (1997) Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press, Oxford.
- Smith-Doerr, L., Owen-Smith, J., Kenneth, W. K. & Powell, W. W. (1998). Networks and Knowledge Production: Collaboration and Patenting in Biotechnology. Forthcoming in *Corporate Social Capital*, eds. R.T.A.J. Leenders & S. Gabbay. Addison Wesley, Boston, USA.
- Stenesh, J. (1989) Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology – 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York.
- Stetter, K.O. (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. FEBS Letters, 425, 22-25.)
- Sunna, A. e Antranikian, G. (1997). Xylanolitic Enzymes from fungi and bacteria. Critical Reviews in Biotechnology 17(1), 39-67.
- Vandamme, E.J. (1984) Biotechnology of Industrial Antibiotics. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Walker, G. M. (1998) Yeast. Physiology and Biotechnology. John Wiley & Sons, New York.
- Wayman, M. e Parekh, S. R. (1990) Biotechnology of Biomass Conversion. Open University, Milton Keynes.
- Wilson, K. & Goulding, K.H. (1986). A Biologist´s Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Edward Arnold, London, UK.

Agradecimentos as seguintes instituições e empresas pelo apoio financeiro:

PETROBRAS

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES

FINEP
FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

FAPERJ
Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

ARACRUZ CELULOSE S.A.

OXITENO

Os Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Os temas de pesquisa desenvolvidos no LADEBIO advogam uma mudança de paradigma das atividades econômicas, em particular dos processos de produção industrial, integrando os princípios e estratégias de qualidade total com os requisitos de qualidade ambiental.

As linhas de pesquisa coordenadas pelo Professor Nei, ao longo de 30 anos de experiência, são características da sua área de especialização e estão ligadas ao "**Desenvolvimento de Bioprocessos**", envolvendo, em sua grande maioria, trabalhos de natureza teórico-experimental, com aplicação prática. São temas de estudo: o desenvolvimento de processos visando à produção de biocombustíveis, enzimas, polióis, antibióticos, bioinseticidas, biossurfactantes, ácidos orgânicos, aromas e fragrâncias, bem como o desenvolvimento de processos biológicos para o tratamento de resíduos e efluentes industriais.

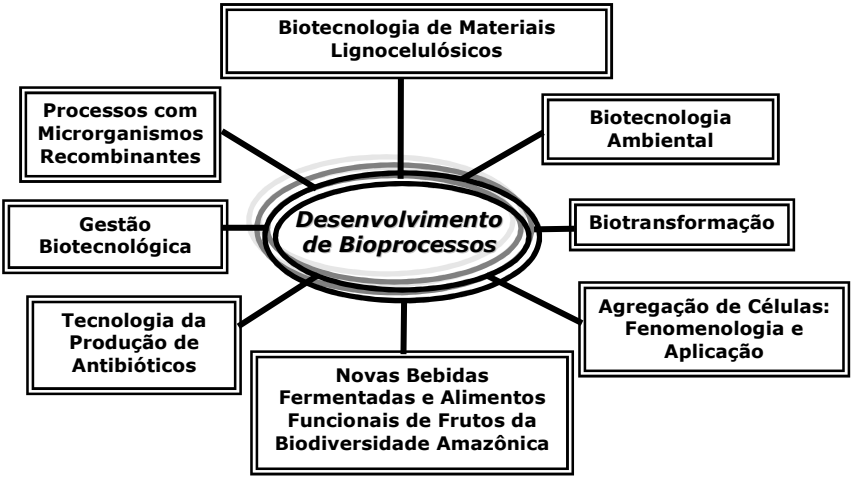
Como ferramentas para o desenvolvimento de bioprocessos nos projetos do LADEBIO, as seguintes estratégias são comumente adotadas: seleção e melhoramento de linhagens (naturalmente ocorrentes ou recombinantes), construção de biocatalisadores ótimos; otimização de meios; modos de operação e cinética de bioprocessos; imobilização de células e enzimas; caracterização e aplicação de bioprodutos, como também a avaliação do desempenho de biorreatores.

Devido à característica tecnológica das pesquisas do LADEBIO, em todos os trabalhos estabelecem-se compromissos com o desenvolvimento de bioprocessos que possam ser transformados em realidade industrial. Além disso, estudos envolvendo a gestão tecnológica são realizados a fim de se ter uma visão mais ampla e identificar tendências e desafios dos diferentes segmentos ligados à Biotecnologia, como por exemplo: estudos de Prospecção Tecnológica para a produção de combustíveis e outras substâncias químicas com base nas matérias-primas renováveis (Biorrefinaria), Transgenia, Biodiversidade, Meio Ambiente e Patente. Devido à natureza muldisciplinar da área Biotecnológica, um grande número de trabalhos é desenvolvido em parceria com outros grupos de pesquisa da própria UFRJ e de outras instituições de ensino e pesquisa externas, e também com empresas.

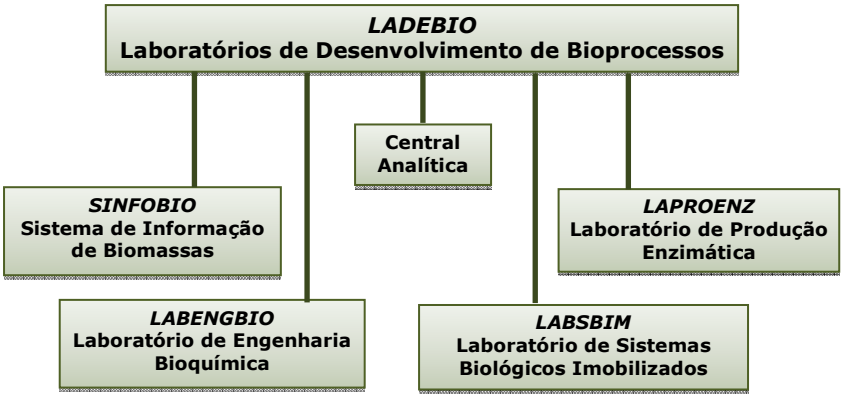
O conjunto de nossas atividades tem gerado resultados que hoje alimentam consórcios de pesquisa entre nossos laboratórios e Universidades e Centros de pesquisa nacionais e internacionais, tendo sido os Laboratórios de Bioprocessos da EQ/UFRJ credenciados pelo Programa Ibero-Americano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (IBEROEKA-CYTED/Espanha). Tem propiciado, também, interações entre a Universidade e a Indústria, como é o caso de projetos que vem desenvolvidos em parcerias com a PETROBRAS, ARACRUZ CELULOSE, BIONASA e OXITENO. Estas parcerias têm se constituído em um excelente exercício, não só para a busca de soluções para as empresas, mas também para a geração de conhecimento e formação de recursos humanos altamente capacitados para o desenvolvimento tecnológico em nosso país.

Contato:
Prof. Nei Pereira Jr.
Escola de Química – CT/UFRJ
Departamento de Engenharia Bioquímica
LADEBIO – sala E 121
Cidade Universitária - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro – RJ
Cep: 21949-900
Tels: 0XX.21.2562 7644/7645/7646
Fax: 0XX.21.2562 7616
e-mail: nei@eq.ufrj.br

LINHAS DE PESQUISA



INFRA-ESTRUTURA LABORATORIAL



amigadigital
www.amigadigital.net
(21) 2564 0873 / 2330 | amigadigital@ajato.com.br
amigadigita@amigadigital.com