

Questão 1)

A moderna prática de engenharia de Bioprocessos deve contemplar, mediante a utilização quantificada de dados e procedimentos moleculares referentes à diversos microrganismos e células existentes, uma análise abrangente, desde a elaboração e mapeamento genético do sistema de expressão de interesse, passando pela análise do metabolismo celular dos compostos de interesse, até a seleção da melhor estratégia de modelagem necessária para identificação e otimização dos componentes do microrganismo/célula de interesse. Neste sentido os modernos técnicas de sequenciamento de genomas de microrganismos possibilitam o mapeamento de sequências de genes responsáveis pela expressão de proteínas/orgânitos no metabolismo dos compostos de interesse, além da identificação dos fatores operons e mecanismos de controle da expressão gênica. Grande parte dos estudos concentram-se hoje em dia e dispõem para a utilização pela comunidade científica e industrial para a utilização na construção de modelos aplicativos à identificação de biomoléculas, otimização de condições de cultura, e informação a respeito de proteínas, moléculas e suas implementações, à nível genético com impacto no metabolismo e capacidade de expressão do sistema biológico alvo. A combinação de tais informações e estratégias de modelagem com a adequada análise de dados experimentais oriundos de bioprocessos e bioanálises em variadas escalas, permite a construção de um conjunto de ferramentas matemáticas e computacionais aplicadas para a projeto de processos biotecnológicos, sua ampliação de escala e efetiva implementação industrial.

No campo da genômica, a informação a respeito das sequências codificantes e dos elementos que contribuem a expressão gênica de tais sequências é proveniente dos parâmetros de obtenção e sequenciamento do DNA dos sistemas de expressão de interesse industrial. As culturas de células de interesse, após os procedimentos de isolamento e seleção de células puras podem ser submetidas à processos de extração celular e extração do material genético (DNA) a ser analisado. Após a remoção de debris celulares, mitocôndrias, organelos, pode-se obter o DNA a ser sequenciado. Em muitos metodologias, o material genético é tratado enzymaticamente para fragmentação dos caudais de DNA.

B 1 Rafael

Posteriormente, os fragmentos são separados por técnicas como Western Blotting e eletroforese em gel (SDS-PAGE). Cabe ressaltar, que em muitos metaculogias, se aplica uma etapa de expansão do material genético utilizando-se DNA polimerase, primas, uma fonte de nucleotídeos e sais de Mg<sup>2+</sup> (cofator) em uma técnica chamada de PCR. Tal etapa é aplicada na replicação dos fragmentos de DNA obtidos anteriormente. Após a replicação dos clones de recombinação do material genético, os fragmentos podem ser marcados com os soroentes específicos, os quais se recombinam com os diferentes nucleotídeos, componentes dos nucleos de DNA. A partir da análise da estrutura de fluorescência dos soroentes, pode-se obter a identificação da sequência de cada fragmento. Outra técnica muito utilizada e de rápida expansão no laboratório, se baseiam em arrays de DNA (DNA microarrays), que permitem a rápida sequenciamento do material genético combinando efeitos de hibridização entre a DNA de interesse e aquela aderida e marcada em suportes sólidos como detecção e identificação das sequências/bases, por fluorescência. Uma vez sequenciados os bases de dados a respeito do material genético de microrganismos de interesse podem ser publicados. Diversas universidades e instituições de pesquisa mantêm bases de dados online para consulta, como o caso da base BRENDA<sup>®</sup>, a qual possui uma variedade de diversos enzimas e suas propriedades, ou da Base KEGG<sup>®</sup>, a qual oferece informações completas sobre diversos rotas metabólicas e enzimas atuantes, mesmo rotas.

A partir das informações contidas nos bases o pesquisador pode tomar decisões quanto à melhor estratégia de modelagem do sistema de expressão de interesse. A decisão passará pela escolha de uma abordagem de modelagem estruturada ou não-estruturada. No primeiro caso, a abordagem contempla em diferentes graus a heterogeneidade interna do sistema de expressão, a existência de sistemas de sinal metabólicos, sistemas de regulação proteômica e genômica e sistemas de sinalização bicomolecular. Nesse caso, os parâmetros de engenharia metabólica, sempre a modelagem por grafos ou equações diferenciais das taxas metabólicas e parâmetros de controle metabólico são os mais indispensáveis

Na segunda parte, a modelagem não-estruturada é aplicada nas condições de escassez de informação do metabolismo celular, das características dos enzimas atuantes nas vias metabólicas e incompletude da caracterização da informação genética. Neste caso, o uso de modelos de tipo "caixa-preta" são inevitáveis, mas igualmente úteis, principalmente pela rápida aplicabilidade em sistemas de produção estrutural. Na abordagem não-estruturada trabalha-se com médias (não-regressão) ou distribuições (regressão) de propriedades biológicas relevantes para características do processo biotecnológico, como velocidades específicas de crescimento, taxa de consumo de substrato, eficiência, rendimento, entre outros. Tais propriedades refletem de forma resumida ("lumped") toda a ação da maquinaria metabólica interna dos sistemas de produção.

Nas abordagens não-estruturadas é comum a caracterização simplificada do crescimento do sistema de produção, por meio de modelos como o de Monod, mares, etc, os quais contabilizam os efeitos da ação de substratos sobre a velocidade de crescimento.

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad (\text{monod}) \quad \mu = \frac{\mu_{max} \cdot S^m}{K_s^m + S^m} \quad (\text{mares})$$

A abordagem também envolve a caracterização de efeitos de ativação ou inibição de crescimento dos sistemas de produção, pelos substratos ou por produtos com os produtos do metabolismo celular (termo  $1 + \frac{I}{K_i}$ , com I sendo a inibição, por exemplo). A caracterização de efeitos como a taxa de consumo de substrato para manutenção celular, a utilização de meios de sem substrato frente ao meio, a ação de produtos de manutenção, taxa de morte celular, entre outros efeitos tem permitido a construção de diversos modelos simplificados que descrevem com precisão o desenvolvimento dos cultivos e a geração de produtos.

A obtenção de tais modelos requer a realização de estudos experimentais para sua caracterização e validação. Os estudos são realizados em uma condição o perfil de evolução temporal de variáveis mensuráveis como concentrações de substrato, produtos,  $O_2$ , etc., para posterior tratamento estatístico.

3 18 julho 20

termos de "modeling" e "data fitting"), com o objetivo de eliminar o efeito de erros sistemáticos sobre o comportamento medido. A seleção das variáveis que tipicamente caracterizam o processo cinético ( $pH$ ,  $V_0$ ,  $K_1$ , etc) é realizada por procedimentos de estimativa de parâmetros a partir dos modelos não-lineares, ou por técnicas de linearização, largamente utilizadas, mas não-recomendadas, devido à amplificação dos erros sobre os parâmetros ajustados.

Finalmente, após a obtenção dos modelos cinéticos e de correlação de todos os efeitos relevantes, pode-se, por meio de equações matemáticas de diversos tipos de linearização, obter os modelos matemáticos para simulação em diferentes escalas e até mesmo para estudos de extrapolação de escala, sem a necessidade de uso de regras e correlações empíricas (extrapolação por modelos de processo).

Rafael

Questão 2)

A classificação dos tipos de biorreatores permite agrupar as operações que conservem similitudes em termos de suas principais características, que dependem da natureza da unidade que opera a biotransformação, as condições de cultivo e as medidas de segurança.

Iniciando-se pela classe mais geral, os biorreatores podem ser classificados em biorreatores enzimáticos, nos quais somente enzimas (incluindo ou sem células vivas) são utilizadas para operar a biotransformação desejada, ou em biorreatores efetivamente biológicos, operados por microrganismos (leveduras, bactérias, micófitos), ou células de organismos superiores (células de mamíferos como CHO, HEK, PER.C6, células de insetos, de insetos, etc.).

Em um segundo nível de classificação, podemos classificar os reatores de cultivo, como em suspensão, em fase sólida e em sistemas imobilizados. Os reatores em suspensão são largamente aplicados à diversos processos nos quais há expansão das células e geração de produtos em meio líquido (podendo ou não agitado ou aerado). Cultivos em suspensão são aplicados para cultura de muitos bactérias, leveduras e micófitos por exemplo, além de células de mamíferos e de outros animais, resistente ao resquecimento decorrente da dissolução de fluidos. Os reatores em fase sólida são aplicados principalmente, ao se utilizar substratos sólidos, como nos casos de biorreatores lignocelulósicos, tipicamente utilizados na cultura de fungos filamentosos. O modo de cultura imobilizado tem sido aplicado nos casos em que células, que normalmente crescem em suspensão no meio de cultura, são fixadas em suportes sólidos e sistemas capilares. A imobilização pode ser realizada por enclausuramento das células em matrizes de alginato de cálcio, adsorção em suportes porosos, modificados com glutaraldeído ou outros agentes funcionalizantes de superfície, ou por adesão à superfícies sólidas, como no caso de cultura de algumas células animais. O modo de imobilização pode ser aplicado também em biorreatores "cell-free", ou seja, efetivamente baseadas em enzimas incluídas.

RS

5

P

Em um processo natural de classificação, pode-se agrupar os processos em não-aeróbios, aeróbios sem aerogênio e aeróbios com aerogênio. Os cultivos não-aeróbios não envolvem a fermentação aerotolerante do meio de cultura por serem medidos em pneumotaxia. Cultivos em superfície, não classificados nessa categoria (ex: produção de lactulose bacteriana). Os cultivos aeróbios sem aerogênio não aplicam em processos biotecnológicos, mas geram a fermentação do processo é fermental, mas não é dissipada a aerogênio do mesmo, como nos casos de cultivos em anaerobiose. (ex: fermentação acetona-butanol-etanol, por *Cl. butylicum*). No caso dos cultivos aeróbios aerados, há a recuperação de fermentação do meio utilizando energia mecânica ou por meio de encocamento propiciado pela superfície de as me licreatas. Tal modo de funcionamento ~~é~~ é aplicado em diversas produções de compostos, por exemplo na produção de penicilina, na etapa de separação da reação em que há grande consumo de  $O_2$  para membranas celulares, precedendo a etapa de fermentação.

Por fim, quanto ao modo de separação, pode-se classificar os processos em batelada simples, batelada sequencial, batelada alimentada e processo contínuo (com ou sem reciclo de células). Na batelada simples, os cultivos descontinuos, não existem canais de entrada ou saída no reator, levando a acumulação de células e produtos. A batelada sequencial é um modo de separação no qual, após certo tempo de fermentação, o meio de cultura fermentado é parcialmente removido e um certo volume de meio novo em substituição é adicionado no licreatos. A batelada alimentada envolve a alimentação do meio de cultura no licreatos sem concretiza da produtividade celular e de produtos. Há acumulação de células e produtos, em virtude de não haver saída de resíduos. No caso de cultura contínuo, a separação é realizada por meio da inserção de uma saída de entrada e de uma saída de saída, permitindo para saída da mesma razão. Nesse modo, não há bioacumulação de células ou produtos, dada a necessidade de geração de produtos e substituição

remoção de massa de bicarbonato. Tal modo de separação pode ser implementado com a recirculação de uma parte dos células, quanto com recirculação das células,

Em termos de modelagem dos modos de bioprocessos, pode-se especificar a balança simples para uma configuração de tipo tanque agitado, da seguinte forma:

Para a balança de células, considerando uma mudança infinitesimal na concentração celular  $X$ , no volume de reatores  $V$

$$V \frac{dX}{dt} = \mu_x X \cdot V, \text{ com } \mu_x \text{ sendo a taxa de crescimento celular.}$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x X \rightarrow \text{integrando-se temos, } X = e^{\mu_x(t-t_0)} X_0$$

Para a balança de massa referente ao consumo de substrato, temos que:

$$V \frac{dS}{dt} = -r_s \cdot V, \text{ sendo } \frac{dS}{dt} = \frac{dS}{dX} \cdot \frac{dX}{dt} \text{ e } S \text{ o substrato.}$$

$$V \frac{dS}{dt} = -Y_{x/s}^{-1} \cdot \frac{dX}{dt} = -Y_{x/s}^{-1} \cdot \mu_x X, \text{ com } Y_{x/s} \text{ sendo o rendimento de células em termos de substrato}$$

Para a balança de massa do produto, temos que:

$$V \frac{dP}{dt} = r_p \cdot V, \text{ sendo } \frac{dP}{dt} = \frac{dP}{dX} \cdot \frac{dX}{dt}, \text{ com } P \text{ sendo a concentração de produto.}$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x} \cdot \frac{dX}{dt} = Y_{p/x} \cdot \mu_x X, \text{ com } Y_{p/x} \text{ sendo o rendimento de produto em relação à biomassa produzida.}$$

No caso de biotecnologia alimentícia, analisamos uma reação de estrutura  
na seguinte em substrato em mesma biotecnologia:

$$\frac{dm_x}{dt} = \mu_x X \cdot V, \text{ com } m_x \text{ igual à } V \cdot X.$$

$$\frac{d(V \cdot X)}{dt} = \mu_x X \cdot V$$

$$\frac{dV \cdot X + V dx}{dt} = \mu_x X \cdot V, \text{ temos que } \frac{dV}{dt} = F(t) \text{ (vazão de} \\ \text{alimentação)}$$

$$F(t) \cdot X + V \frac{dx}{dt} = \mu_x X V$$

$$V \frac{dx}{dt} = \mu_x X V - F(t) \cdot X \rightarrow \frac{dx}{dt} = \mu_x X - \frac{F(t) \cdot X}{V}$$

$$\frac{dx}{dt} = X (\mu_x - D), \text{ com } D \text{ sendo a taxa de diluição de meios.}$$

No caso a perfil de alimentação de substrato  $F(t)$ , pode ter  
diferentes comportamentos, como por exemplo, ser contínuo e linear com o  
tempo ou em etapas (steps).

Para os balanços de massa de substrato temos:

$$\frac{dm_s}{dt} = -r_s V + F \cdot S_0$$

$$\frac{d(V \cdot S)}{dt} = \frac{V ds}{dt} + S \frac{dV}{dt} = -r_s V + F S_0$$

$$\frac{V ds}{dt} = -r_s V + F S_0 - F S = -r_s V + F(S_0 - S)$$

com  $r_s = Y_{X/S}^{-1} \cdot \mu_x \cdot X$ , temos que:

$$\frac{V ds}{dt} = -Y_{X/S}^{-1} \mu_x X \cdot V + F(S_0 - S) \rightarrow \frac{ds}{dt} = D(S_0 - S) - Y_{X/S}^{-1} \mu_x X$$



Obtenha para o preditor  $\dot{P}$  dentro de uma:

$$\frac{dmp}{dt} = r_p \cdot V$$

$$\frac{d(V \cdot P)}{dt} = r_p \cdot V$$

$$V \frac{dP}{dt} + P \frac{dV}{dt} = r_p V$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p \frac{V}{V} - P \cdot \frac{F}{V}$$

onde  $r_p = Y_x \mu_x \cdot X$ , temos:

$$\frac{dP}{dt} = Y_x \mu_x \cdot X - P \cdot D$$

No sistema vivo, para se cultivar em modo contínuo, temos que  $V \frac{dX}{dt} = \mu_x X V + F \cdot X_0 - F \cdot X$ , para ser alimentado sem células  $X_0 = 0$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x X - \frac{F}{V} \cdot X, \text{ no estado estacionário, temos } \frac{dX}{dt} = 0$$

$$\mu_x \cdot X = D \cdot X$$

$$D = \mu_x$$

Para o balanço de massa do substrato, temos:

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \cdot V + F S_0 - F S, \text{ no estado estacionário temos } \frac{dS}{dt} = 0$$

$$F S_0 - F S = r_s V, \text{ com } r_s = Y_{x/s}^{-1} \cdot \mu_x \cdot X \text{ e sendo } S_0 \text{ a concentração de substrato na alimentação.}$$

$$D(S_0 - S) = Y_{x/s}^{-1} \mu_x \cdot X$$

$$D S_0 - Y_{x/s}^{-1} \mu_x X = D S \rightarrow S = S_0 - \frac{Y_{x/s}^{-1} \mu_x X}{D}$$

*Rafael*

Orçamento do produto é descrito como:

$$\frac{dmp}{dt} = \frac{VdP}{dt} = r_p V \cdot FP, \text{ no estado estacionário e}$$

$$\text{com } r_p = Y_x \cdot \mu_x \cdot X$$

$$FP = Y_x \cdot \mu_x \cdot X \cdot V$$

$$P = \frac{Y_x \cdot \mu_x \cdot X}{D}$$

, com  $P$  sendo a concentração de produtos.

(Questão 3) A modelagem dos fenômenos de transporte de massa e sua relação com a separação de agitação e aeração são fundamentais para a adequada dimensionamento de vasos reacionais, especialmente de reatores de substrato e principalmente de Oxigênio às células, em bioreatores nos quais há necessidade de bioprocessamento e aeração.

Normalmente agitação e aeração são dimensionados em conjunto pois a potência necessária para agitar um determinado volume de cultura é afetada pela aeração, desde que se as injetadas tanto a arbor como mistura de massa semelhante, e por sua consequência tende a dispersar parte da energia mecânica transmitida ao fluido pelas impelidas.

O transporte de massa, e mais especificamente a transferência de transporte de massa, é um fenômeno que pode se dar com limitações na presença de fenômenos interfaciais, desde que não se garanta a adequada disponibilização de nutrientes ou de oxigênio.

Que analisamos a transferência de oxigênio até as células, uma análise similar poderia ser realizada para substratos, depende-se que se oxigênio presente nos bolhas produzidas pela aeração, deve difundir até a interface líquido-gás, depois difundir através da camada de filme estagnada em torno da partícula, em seguida ser transportada para o meio por um processo de difusão e advecção combinados, para então ser absorvida pelas células e ser consumida.

Para a modelagem de todos esses fenômenos de transporte de massa, desde os próprios fenômenos de difusão no interior das células, está entre, normalmente modela-se a taxa de transporte de oxigênio por meio da equação a seguir:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} - m_{O_2} = K_L a (C_s - C)$$

Nessa equação, o transporte de  $O_2$ , se considera que efetivamente é transportado para a fase líquida, é modelado por meio de uma constante global de transferência de massa ( $K_L$ ), a qual descreve o transporte através

da área  $a$ . O fluxo de  $O_2$  é limitado pela baixa solubilidade de  $O_2$  no fluido, denota por  $E_s$ . Para maior, a força motriz é denota como a concentração efetivamente dissolvida, obtida da concentração de equilíbrio ( $E_s$ ) no limite de solubilidade.

Conforme foi rememorado, a difusão de ar (fase líquida de baixa densidade) na massa de sulfato provoca a alteração da densidade da mesma, o que impacta diretamente na potência transmitida por agitação. Diversos trabalhos demonstram a redução da potência transmitida na massa devido à aeragem. A relação entre  $P/P_0$ , com  $P$  sendo a potência com aeragem e  $P_0$  sendo a potência sem aeragem, apresenta um perfil decrescente com o número adimensional de aeragem, o qual é proporcional ao volume de ar injetado.

A constante  $K_L a$ , a qual denota a transferência de massa, de oxigênio, em mesmo exemplo, pode ser relacionada à potência de agitação e ao volume de ar injetado por meio da seguinte equação:

$$K_L a = A \left( \frac{P_g}{V} \right)^m V_s^m$$

Para equação A,  $m$  e  $n$  são constantes de ajuste que devem ser ajustadas à dados experimentais em sistemas

específicos, sendo de especial importância entre sistemas geometricamente diferentes.  $P_g$  é a potência no reator aerado,  $V$  é o volume do reator e  $V_s$  a vazão superficial na ponta do impulsor.

O aumento da vazão de ar e da potência transmitida também aumentam a taxa de transferência de  $O_2$ , a qual tende a decrescer com o aumento do volume de meio (volume do reator), geralmente devido ao aumento do tempo de residência das bolhas e de sua coalescência na massa, reduzindo a área de transferência de massa.

As relações estabelecidas no modelagem do efeito de transferência de massa influenciadas pela agitação e aeragem não também aplicadas nos processos de crescimento de cristal.

Caso se aumentas a escala do processo, diferentes materiais podem ser aplicados, sem se afetarem de se mantém constante um determinado fenômeno ou variável, desde que se mantenham semelhanças geométricas entre se reatores de pequena escala e se reatores de larga escala.

Entre os reatores usados, existe a igualdade de potência por reatores com a seguinte:

$$\left(\frac{P_1}{V_1}\right)^m = \left(\frac{P_2}{V_2}\right)^m$$

A igualdade dos parâmetros  $K_1 a$ , principalmente nos casos em que se deseja manter a taxa de transferência constante e processos em que a reação é controlada:

$$(K_1 a)_1 = (K_1 a)_2$$

Entre outros muitos critérios é a velocidade superficial constante, na qual se alteram outros valores, buscando manter a eficiência provocando um fluxo constante. Tal critério é usado principalmente em leques, com células perfuradas, mesmo células agitadas.

$$(V_s)_1 = (V_s)_2$$

$D_1 P_1 = D_2 P_2$ , com  $D$  igual ao diâmetro do agitador e  $P$  igual à velocidade de rotação em RPM.