



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

# **Transferência de Oxigênio e Condições de Cisalhamento em Biorreator Convencional com Impelidores Orelha de Elefante**

Maritza Catalina Condori Bustamante

São Carlos – SP

Setembro de 2013

MARITZA CATALINA CONDORI BUSTAMANTE

# **Transferência de Oxigênio e Condições de Cisalhamento em Biorreator Convencional com Impelidores Orelha de Elefante**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior

**São Carlos – SP**

**Setembro de 2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C746to      Condori Bustamante, Maritza Catalina.  
Transferência de oxigênio e condições de cisalhamento em biorreator convencional com impelidores orelha de elefante / Maritza Catalina Condori Bustamante. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
197 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Engenharia bioquímica. 2. Transferência de oxigênio. 3. Cisalhamento. 4. Impelidor orelha de elefante. 5. *Streptomyces clavuligerus*. 6. Ácido clavulânico. I. Título.

CDD: 660.63 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **MARITZA CATALINA CONDORI BUSTAMANTE**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 30 DE SETEMBRO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:



Alberto Colli Badino Júnior  
**Orientador / UFSCar**



Marcel Otavio Cerri  
**UFSJ**



Álvaro de Baptista Neto  
**FCFar/UNESP**



Antonio José Gonçalves da Cruz  
**UFSCar**



Claudio Alberto Torres Suazo  
**UFSCar**

*In memoriam,*  
*Professor Dr. Carlos Osamu Hokka*  
*\*1944*  
*† 09/09/2013*

*Dedico este trabalho a meu querido esposo  
V́ctor Anthony pela enooorme paciência,  
pela força em momentos de desânimo,  
por acreditar na minha pessoa, amor obrigada!  
A minha filha Sami Sayarumi, que em algum  
momento entenderá que todo o que eu faço é por ela,  
meu motivo. Desculpe minha filha que esse  
tempo perdido será repostado!  
A minha filha Nina Minmay, outro pequeno  
presente de Deus, a caminho.*

*Agradeço Senhor meu Deus por tamanha  
felicidade em minha vida!*

## *Agradecimentos*

Em primeiro lugar agradecer a Deus por me dar a vida, e colocar no meu caminho muitas pessoas maravilhosas.

Ao professor Dr. Alberto Colli Badino Jr por aceitar a orientação, por acreditar em minha pessoa, pela enorme paciência nestes quatro anos, assim como corrigir meus erros, me alentar em muitas situações difíceis na realização deste trabalho e conduzir-me nesta interessante área... Muito obrigada professor Alberto!

Ao professor Dr. Carlos Osamu Hokka, por apresentar-me a Engenharia Bioquímica e dar-me a enorme oportunidade de seguir uma pós-graduação nesta área, por acreditar em mim e incentivar-me, sempre ficará na minha lembrança. Maestro, muito obrigada!

Ao professor Dr. Marcel Otavio Cerri, pelas dicas e pelo incentivo e ânimo na continuidade desta pesquisa.

Ao técnico de laboratório Amadeus e ao técnico mecânico Oscar, por estarem sempre prestes em auxiliarem em qualquer situação não interessando o momento, vocês são demais!

Aos meus amigos e colegas do laboratório, que se tornaram minha segunda família. Maribel Valverde, Cecilia Ladeira, Gabriel Torresam, Mateus Nordi, Liliane M. de Oliveira, Luciana Brittes, Caroline Mendes, Jorge Sonogo, Agnes Mafra, Fernanda da Cunha, Guilherme Youssef, Camila Florêncio, Vanessa, Ana Maria Vélez, Tatiana de Freitas, Úrsula Zúñiga..... E muitos mais que é impossível colocarem todos nesta folha. Muito obrigada!

A meus sogros Antonio e Liliana por estarem sempre pendentes da gente. Dona Liliana obrigada por nós dedicar um pouco de seu tempo, pela força nesta etapa, pelo incentivo e me motivar, muito obrigada!

A minha avó Consuelo e minha irmã Daly, por entender meu afastamento, a pesar da distância, estão sempre presentes. Las adoro!

A meu pai Gaspar e meus tios Manuel, Lucila, Eufemia, por estarem sempre presentes.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

Devido à natureza dos caldos de cultivo envolvendo microrganismos filamentosos aeróbios, de modo de obter adequada transferência de oxigênio e homogeneização do meio são tradicionalmente empregados biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado utilizando o impelidor turbina de Rushton. Porém, esse impelidor apresenta desvantagens tais como o alto consumo de energia e elevado cisalhamento imposto ao meio, que pode provocar mudanças morfológicas irreversíveis aos microrganismos, prejudicando o rendimento dos cultivos. Na literatura especializada são indicados os impelidores denominados orelha de elefante ou “*Elephant Ear*” (EE), nas configurações de escoamento descendente (*down-pumping*) (EEDP) e de escoamento ascendente (*up-pumping*) (EEUP), como adequados para cultivos de células sensíveis ao cisalhamento. No entanto, esta característica nunca foi demonstrada quantitativamente. No presente trabalho foram avaliados e comparados parâmetros de transferência de oxigênio e hidrodinâmicos em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado, equipado com impelidores como a clássica turbina de Rushton (TR) e com EE nas configurações EEDP e EEUP. Inicialmente foram obtidas equações de previsão para a quantificação da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) nos diferentes sistemas em função da frequência de agitação do impelidor e vazão específica de ar e das propriedades reológicas de fluidos pseudoplásticos, com base em metodologia que utiliza o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio como parâmetro característico. Valores obtidos de  $\dot{\gamma}_m$  para o impelidor TR pelas correlações obtidas ficaram dentro de uma faixa de valores estimados por correlações de literatura validando a metodologia empregada. Com base nas correlações de  $\dot{\gamma}_m$  e nos resultados de consumo de potência, pode-se quantificar a dissipação de energia e a microescala de Kolmogorov (tamanho de micro-turbilhões). Para fluidos não-Newtonianos, os impelidores TR e EEUP geraram os menores micro-turbilhões com tamanhos nas faixas de 45,0-127,0  $\mu\text{m}$  e de 80,6-123,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente, mostrando serem esses impelidores mais cisalhantes que o impelidor EEDP. Também com base nas equações de previsão de  $\dot{\gamma}_m$ , foram avaliadas as influências das condições de transferência de oxigênio e de cisalhamento em cultivos de *Streptomyces clavuligerus* visando a produção de ácido clavulânico em biorreator convencional com os impelidores TR, EEDP e EEUP a 800 rpm, 0,50 vvm e 30°C. A partir das amostras coletadas ao longo dos cultivos, foram obtidos perfis de  $k_{La}$  e de  $\dot{\gamma}_m$ . Foram acompanhadas as mudanças morfológicas decorrentes das condições de cisalhamento impostas pelos diferentes impelidores mediante a técnica de análise de imagens. Os impelidores TR e EEDP impuseram, respectivamente, maiores e menores transferências de oxigênio e condições de cisalhamento ao caldo. A eficiência do padrão de escoamento gerado pelos impelidores EEs foi crucial nas primeiras horas do cultivo, sendo altamente benéfico quando utilizado o impelidor EEUP, o qual apresenta um cisalhamento controlado ao longo do cultivo. A melhor condição de cultivo em função da produção de ácido clavulânico foi obtida utilizando o impelidor EEUP obtendo uma produção máxima de 453 mg/L e índice de consistência  $K=2,5 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{0,27}$ . Os resultados sugerem que a quantidade de hifas isoladas está diretamente relacionada com o K do caldo e a produção de ácido clavulânico. De acordo com a rápida fragmentação de *clumps* e surgimento de hifas isoladas, conclui-se que o impelidor TR cisalha mais que os impelidores EE, isto é, pelos tamanhos das hifas ramificadas e não ramificadas que foram geradas em maiores quantidades e em menores dimensões. Tal fato mostra uma vantagem no uso do impelidor EEUP em cultivos de microrganismos sensíveis ao cisalhamento, e que necessitam de níveis superiores de oxigenação, não prejudicando o desempenho do processo. Estes resultados sugerem essa vantagem está associada ao padrão de escoamento imposto pelo impelidor EEUP.

**Palavras-chave:** Transferência de oxigênio, Cisalhamento, Impelidor orelha de elefante, *Streptomyces clavuligerus*, Ácido clavulânico.



## ABSTRACT

Due to owing to the nature of culture involving aerobic filamentous microorganisms, conventional aerated stirred-tank bioreactors using the Rushton turbine impeller are widely employed in order to achieve good mixing and oxygen mass transfer. However, this impeller presents disadvantages such as high power consumption, and generates higher shear in the medium, which can cause irreversible morphological changes in microorganisms, damaging the culture performance. In literature, impellers called "Elephant Ear" (EE), presented in down-flow (down-pumping) (EEDP) and up-flow (up-pumping) (EEUP) configurations, are indicated as suitable for cultivation of shear sensitive cells. However, this characteristic has never been demonstrated quantitatively. In the present study, the oxygen transfer and hydrodynamics parameters were evaluated and compared in a conventional aerated stirred-tank bioreactor equipped with impellers as the classical impeller Rushton turbine (RT) and with EE in EEDP and EEUP modes. Firstly, prediction equations were obtained for quantifying the average shear rate ( $\dot{\gamma}_{av}$ ) in the different systems, as function of the operating conditions ( $600 \leq N \leq 1000$  rpm and  $0.40 \leq \phi_{ar} \leq 1.2$  vvm) and rheological properties of the pseudoplastic fluids (K and n), based on a methodology that uses the volumetric oxygen transfer coefficient as characteristic parameter. The values of  $\dot{\gamma}_{av}$  obtained from the correlations for the RT impeller were within a range of values estimated from correlations of the literature, showing that the methodology utilized is valid. Based on correlations of  $\dot{\gamma}_{av}$  and on results of power consumption, the energy dissipation and Kolmogorov micro-scale (micro eddy sizes) could be estimated. For non-Newtonian fluids, the RT and EEUP impellers generated micro-eddies with smaller sizes in the range from 45.0-127.0 and 80.6-123.7  $\mu\text{m}$ , respectively, showing that the impellers RT and EEUP are more shear than EEDP impeller. Using the prediction equations of  $\dot{\gamma}_{av}$ , the effect of shear conditions in cultures of *Streptomyces clavuligerus* were evaluated in conventional bioreactor equipped with RT, EEDP and EEUP impellers at 800 rpm, 0.50 vvm and 30°C. Profiles of the volumetric oxygen transfer coefficient and shear rate were obtained during the cultivation. The morphological changes resulted from shear conditions imposed for the different impellers were analyzed using image analysis technique. The RT and EEDP impellers imposed the highest oxygen transfer and smaller shear to the broth, respectively. The flow pattern generated by EE impellers was crucial at the beginning of the cultivation, and is highly beneficial when EEUP impeller were used, since it presented a controlled shear throughout the cultivation. The best cultivation condition for the clavulanic acid production was obtained using the EEUP impeller, which resulted in a maximum concentration of 453 mg/L and a consistency index  $K = 2.5 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{0.27}$ . The results suggested that the isolated hyphae are directly related to the K of the broth and clavulanic acid production. According to the rapid fragmentation of clumps and emergence of isolated hyphae, it was concluded that the RT impeller presents shear rates higher than the EEs impellers, since the size of branched and non-branched hyphae were smaller and in greater quantities. This fact shows an advantage in the EEUP impeller use in shear sensitive microorganism cultures that requiring high levels of oxygen, without affecting the process performance. This advantage is associated with the flow pattern generated for the EEUP impeller.

**Keywords:** Oxygen transfer, Shear, Elephant Ear impeller, *Streptomyces clavuligerus*, Clavulanic acid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1. (a) Biorreator aeróbio convencional tipo tanque agitado. (b) Dimensões geométricas.....	8
Figura 2.2. Ambiente interno de biorreatores industriais. a) Inspeção periódica de um biorreator tipo tanque agitado (foto Yuri Raysper, 2005). b) Instalação de um impelidor de grandes lâminas <i>hydrofoil</i> (Nienow, 2012).....	9
Figura 2.3. Diferentes tipos de impelidores oferecidos pela ASEPCO PollyMixer.....	10
Figura 2.4. Tipos de escoamento de acordo à orientação das pás do impelidor; fluxo radial em (a) e fluxo axial em (b), em biorreatores providos de <i>baffles</i> (SMITH, 2011).....	12
Figura 2.5. Impelidor tipo turbina Rushton ou <i>flat-bladed turbine</i> . Utilizado para gerar dispersão e elevados valores de cisalhamento.....	13
Figura 2.6. Vantagens e desvantagens no uso do impelidor turbina Rushton. (a) Alta turbulência. (b) Formação de cavernas nas regiões do impelidor, (SZALAI, 2004). .....	14
Figura 2.7. Impelidor orelha de elefante ou <i>Elephant Ear</i> (EE): (a) configuração de escoamento descendente ( <i>down-pumping</i> ) e (b) configuração de escoamento ascendente ( <i>up-pumping</i> ). .....	15
Figura 2.8. Relações entre parâmetros de transferência de oxigênio e hidrodinâmicos em cultivos em diversos níveis (OCHOA e GOMEZ, 2009).....	19
Figura 2.9. Representação esquemática de resistências associadas à transferência de oxigênio desde o seio da bolha até seu consumo pela célula. ....	27
Figura 2.10. Reogramas de fluidos.....	34
Figura 2.11. Consequência da exposição de um microrganismo filamentosos ao alto cisalhamento. ....	35
Figura 2.12. Perfil de velocidade na região próxima ao impelidor. (HO e OLDSHUE, 1987). .....	36
Figura 2.13. Regiões do potencial interação bolha-célula, que pode causar dano celular e regiões de alto cisalhamento em um biorreator agitado com turbina Rushton.....	37
Figura 2.14. Diagrama do número de potência ( $N_p$ ) em função número de Reynolds ( $Re$ ) para sistemas com diferentes impelidores (RUSHTON et al., 1950a, 1950b). .....	45

Figura 2.15. Estruturas morfológicas encontrada em cultivos típicos de fungos filamentosos e actinomicetos.....	50
Figura 2.16. Complexa interação entre morfologia, produtividade e condições de cultivo de microrganismos filamentosos (PAPAGIANNY, 2004). .....	51
Figura 2.17. Acoplamento entre fenômenos relacionados ao biorreator. Em linhas contínuas e pontilhadas referem-se ao acoplamento físico e bioquímico (OLMOS et al., 2013). .....	52
Figura 2.18. Bactéria filamentosa <i>Streptomyces clavuligerus</i> , amostra correspondente a um meio de inóculo, pode ser observada a vitalidade do <i>clump</i> . .....	55
Figura 2.19. Estrutura química do ácido clavulânico pertencente à classe estrutural $\beta$ -lactama apresentando uma potente atividade antibacteriana. ....	56
Figura 3.1. Biorreator Bioflo IIC (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Co., Inc.).....	59
Figura 3.2. (a) Dimensões do biorreator utilizado e em (b) posição do aspersor em função ao impelidor.....	59
Figura 3.3. Impelidor tipo turbina Rushton. (a) fotografia do impelidor e em (b) as dimensões. ....	60
Figura 3.4. Impelidor orelha de elefante ( <i>Elephant Ear</i> ): (a) modo de escoamento descendente (EEDP) e (b) dimensões geométricas. ....	61
Figura 3.5. Impelidor orelha de elefante ( <i>Elephant Ear</i> ): (a) modo de escoamento ascendente (EEUP) e (b) dimensões geométricas. ....	62
Figura 4.1. Localização dos impelidores no eixo do agitador: (a) configuração empregada no LEB-DEQ/UFSCar. b) configuração indicada no manual da New Brunswick Scientific. ....	74
Figura 4.2. Localização dos impelidores dentro do biorreator. a) EEDP e b) EEUP.....	75
Figura 4.3. Sistema empregado para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ). ....	76
Figura 4.4. Sequência experimental para a determinação de $k_L a$ . ....	77
Figura 4.5. Interface da aba de monitoramento desenvolvida no sistema supervisorio. ....	78
Figura 4.6. Conjunto experimental semelhante utilizado para medida de consumo de potência: 1. Biorreator agitado Bioflo IIC, 2. Motor, 3. Banho termostaticado, 4. Fototacômetro, 6. Fluxômetro, 7. Indicador de frequência (indicador de potência), 8. Dinamômetro e braço. ....	79
Figura 4.7. Sistema experimental utilizado no estudo do diâmetro de bolha mediante obtenção de imagens. ....	81

Figura 4.8. Procedimento experimental dos cultivos em biorreator.....	83
Figura 4.9. Tratamento das imagens com o software Image-Pro® Plus™ 6. (a) Fotografia referente a <i>clumps</i> e hifas ramificadas às 9 horas de cultivo com o impelidor EEUP com aumento de 100x. Em (b) e (c) Tratamento dessa imagem. ....	85
Figura 5.1. Determinações de $k_{L,a}$ através da Equação 3.6 para fluidos Newtonianos (FN) ou soluções de glicerol utilizando o impelidor TR em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.....	88
Figura 5.2. Valores experimentais de $k_{L,a}$ em função dos valores calculados pela Equação (5.1) para fluidos Newtonianos agitados com o impelidor TR.....	90
Figura 5.3. Determinações de $k_{L,a}$ através da Equação 3.6 para fluidos Newtonianos (FN) ou soluções de glicerol utilizando o impelidor EEDP em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.....	91
Figura 5.4. Valores experimentais de $k_{L,a}$ em função dos valores calculados pela Equação (5.2) para fluidos Newtonianos agitados com o impelidor EEDP.....	92
Figura 5.5. Determinações de $k_{L,a}$ através da Equação 3.6 para fluidos Newtonianos (FN) ou soluções de glicerol utilizando o impelidor EEUP em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.....	93
Figura 5.6. Valores experimentais de $k_{L,a}$ em função dos valores calculados pela Equação (5.3) para fluidos Newtonianos agitados com o impelidor EEUP.....	95
Figura 5.7. Resultados experimentais de $k_{L,a}$ para fluidos não-Newtonianos (FNN) utilizando o impelidor TR em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm. ....	97
Figura 5.8. Valores experimentais de $k_{L,a}$ em função dos valores calculados pela Equação (5.4) para fluidos não-Newtonianos agitados com o impelidor TR. ....	98
Figura 5.9. Resultados experimentais de $k_{L,a}$ para fluidos não-Newtonianos (FNN) utilizando o impelidor EEDP em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm. ....	99
Figura 5.10. Valores experimentais de $k_{L,a}$ em função dos valores calculados pela Equação (5.5) para fluidos não-Newtonianos agitados com o impelidor EEDP.....	101

Figura 5.11. Resultados experimentais de $k_{L,a}$ para fluidos não-Newtonianos (FNN) utilizando o impelidor EEUP em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm. ....	102
Figura 5.12. Valores experimentais de $k_{L,a}$ em função dos valores calculados pela Equação (5.6) para fluidos não-Newtonianos agitados com o impelidor EEUP.....	104
Figura 5.13. Variação de $\gamma m$ para o biorreator equipado com o impelidor TR com diferentes FNN em função da frequência de rotação (N) e da vazão específica de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm. ....	107
Figura 5.14. Variação de $\gamma m$ para o biorreator equipado com o impelidor EEDP com diferentes FNN em função da frequência de rotação (N) e da vazão específica de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.....	108
Figura 5.15. Variação de $\gamma m$ para o biorreator equipado com o impelidor EEUP com diferentes FNN em função da frequência de rotação (N) e da vazão específica de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.....	110
Figura 5.16. Velocidade de cisalhamento média ( $\gamma m$ ) em função da frequência de agitação (N) para os três impelidores (TR, EEDP e EEUP) considerando a solução XGS-5 em diferentes condições de aeração: $\phi_{ar} = 0,40$ vvm, $\phi_{ar} = 0,80$ vvm, $\phi_{ar} = 1,20$ vvm.....	114
Figura 5.17. Comparação de correlações de $\gamma$ da literatura para fluidos não-Newtonianos em regime turbulento utilizando o impelidor TR: I) Comportamento de $\gamma m$ em (a, b, c) no presente trabalho para 0,40; 0,80 e 1,20 vvm; (d) Pérez et al. (2006); (e) Kelly e Gigas (2003); (f, g) Campesi et al. (2009) e, em II) Comportamento dos valores de $\gamma_{max}$ desenvolvida por Robertson e Ulbrecht (1987) considerando 0,40; 0,80 e 1,20 vvm....	117
Figura 5.18. Consumo de potência para o sistema equipado com o impelidor TR em sistemas com H <sub>2</sub> O e SG-5 sob as diferentes condições de aeração ( $\phi_{ar}$ ): (a) $P_g/P_0$ em função da frequência de rotação N. (b) número de potência ( $N_p$ ) em função da frequência de rotação N.....	119
Figura 5.19. Consumo de potência para o sistema equipado com o impelidor EEDP em sistemas com H <sub>2</sub> O e SG-5 sob as diferentes condições de aeração ( $\phi_{ar}$ ): (a) $P_g/P_0$ em função da frequência de rotação N. (b) número de potência ( $N_p$ ) em função da frequência de rotação N.....	120
Figura 5.20. Consumo de potência para o sistema equipado com o impelidor EEUP em sistemas com H <sub>2</sub> O e SG-5 sob as diferentes condições de aeração ( $\phi_{ar}$ ): (a) $P_g/P_0$ em	

função da frequência de rotação N. (b) número de potência ( $N_p$ ) em função da frequência de rotação N.....	121
Figura 5.21. Dissipação de energia $\epsilon Tg$ imposta aos sistemas com FN equipados com três impelidores sem aeração em diferentes níveis de agitação. ....	124
Figura 5.22. Níveis da dissipação de energia $\epsilon Tg$ impostos aos sistemas com fluido não-Newtoniano (SGX-5) variando N equipado com impelidores TR, EEDP e EEUP. Níveis de aeração: a) $\phi_{ar} = 0,40$ vvm, b) $\phi_{ar} = 0,80$ vvm e c) $\phi_{ar} = 1,20$ vvm. ....	126
Figura 5.23. Valores da microescala de Kolmogorov ( $\eta_K$ em $\mu m$ ) para um sistema com FN ( $H_2O$ ) não aerado, com diferentes níveis de agitação com impelidores TR, EEDP e EEUP. ....	128
Figura 5.24. Microescala de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) considerando para um FNN (SGX-5), agitado com diferentes níveis de agitação em impelidores TR, EEDP e EEUP. Condições de aeração: a) $\phi_{ar} = 0,40$ vvm b) $\phi_{ar} = 0,80$ vvm e c) $\phi_{ar} = 1,20$ vvm.....	130
Figura 5.25. Variação de $\epsilon_G$ em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor TR operando com FN em diferentes níveis de aeração: a) $\phi_{ar} = 0,40$ vvm, b) $\phi_{ar} = 0,80$ vvm e c) $\phi_{ar} = 1,20$ vvm.....	132
Figura 5.26. Variação de $\epsilon_G$ em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor EEDP operando com FN em diferentes níveis de aeração: a) $\phi_{ar} = 0,40$ vvm, b) $\phi_{ar} = 0,80$ vvm e c) $\phi_{ar} = 1,20$ vvm.....	134
Figura 5.27. Variação de $\epsilon_G$ em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor EEUP operando com FN em diferentes níveis de aeração: a) $\phi_{ar} = 0,40$ vvm, b) $\phi_{ar} = 0,80$ vvm e c) $\phi_{ar} = 1,20$ vvm.....	135
Figura 5.28. Variação de $\epsilon_G$ em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor TR operando com FNN em diferentes níveis de aeração: a) $\phi_{ar} = 0,40$ vvm, b) $\phi_{ar} = 0,80$ vvm e c) $\phi_{ar} = 1,20$ vvm.....	139
Figura 5.29. Variação de $\epsilon_G$ em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor EEDP operando com FNN em diferentes níveis de aeração: a) $\phi_{ar} = 0,40$ vvm, b) $\phi_{ar} = 0,80$ vvm e c) $\phi_{ar} = 1,20$ vvm.....	140
Figura 5.30. Variação de $\epsilon_G$ em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor EEUP operando com FNN em diferentes níveis de aeração: a) $\phi_{ar} = 0,40$ vvm, b) $\phi_{ar} = 0,80$ vvm e c) $\phi_{ar} = 1,20$ vvm.....	142

Figura 5.31. Imagens digitais do comportamento hidrodinâmico de H <sub>2</sub> O agitada com três impelidores com $\phi_{ar} = 0,40$ vvm em diferentes condições típicas de agitação empregadas em cultivos de microrganismos filamentosos altamente aeróbios.....	145
Figura 5.32. Imagens digitais do comportamento hidrodinâmico de H <sub>2</sub> O agitada com três impelidores com $\phi_{ar} = 0,80$ vvm em diferentes condições típicas de agitação empregadas em cultivos de microrganismos filamentosos altamente aeróbios.....	146
Figura 5.33. Imagens digitais do comportamento hidrodinâmico de H <sub>2</sub> O agitada com três impelidores com $\phi_{ar} = 1,20$ vvm em diferentes condições típicas de agitação empregadas em cultivos de microrganismos filamentosos altamente aeróbios.....	147
Figura 5.34. Ilustração do tratamento de imagem visando a contagem das bolhas no sistema agitado com o impelidor EEUP a 600rpm utilizando o software Image Pro-plus. ....	149
Figura 5.35. Dados obtidos a partir do tratamento no Image Pro-plus para posterior avaliação. ....	150
Figura 5.36. Diâmetro de bolha media ( $D_{BM}$ ) em mm para os três sistemas de impelidores (TR, EEDP, EEUP) e diferentes condições de agitação e aeração. A) $\phi_{ar} = 0,40$ ; B) $\phi_{ar} = 0,80$ ; C) $\phi_{ar} = 1,20$ vvm.....	151
Figura 5.37. Padrão de escoamento para os três sistemas de impelidores utilizados neste trabalho. ....	153
Figura 5.38. Biorreatores tipo tanque agitado durante cultivos sob as mesmas condições de em operação (800 rpm, $\phi_{ar} = 0,50$ vvm) com diferentes impelidores: (a) TR, (b) EEDP e (c) EEUP. ....	154
Figura 5.39. Imagem do caldo de cultivo com o impelidor TR em 10 horas de cultivo, com destaque para a grande formação de espuma.....	155
Figura 5.40. Perfis do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ) nos cultivos operando com os impelidores TR, EEDP e EEUP e condições de $N=800$ rpm e $\phi_{ar}= 0,50$ vvm. ....	156
Figura 5.41. Variações de $K$ , $k_{L,a}$ e de $\gamma m$ ao longo dos cultivos com impelidor turbina de Rushton (TR) operando com $N=800$ rpm e $\phi_{ar}= 0,50$ vvm. As barras indicam os desvios padrão. ....	157
Figura 5.42. Variações de $K$ , $k_{L,a}$ e de $\gamma m$ ao longo dos cultivos com o impelidor EEDP operando com $N=800$ rpm e $\phi_{ar}= 0,50$ vvm. As barras indicam o desvio padrão. ....	157
Figura 5.43. Variações de $K$ , $k_{L,a}$ e de $\gamma m$ ao longo dos cultivos com o impelidor EEUP operando com $N=800$ rpm e $\phi_{ar}= 0,50$ vvm. As barras indicam o desvio padrão. ....	158

Figura 5.44. Fotografias alusivas às diferentes classes morfológicas apresentadas por <i>S. clavuligerus</i> no caldo de cultivo: a) <i>pellet</i> (aumento 40x); b) <i>clumps</i> ; c) hifas ramificadas e d) hifas não ramificadas (aumento de 100x).....	160
Figura 5.45. Porcentagens de classes morfológicas ao longo dos cultivos com diferentes impelidores: (a) TR, (b) EEDP e (c) EEUP.....	161
Figura 5.46. Área média de <i>pellets</i> ( $AM_P$ ).....	163
Figura 5.47. Diâmetro médio de <i>pellets</i> ( $DM_P$ ).....	163
Figura 5.48. Comprimento médio de <i>pellets</i> ( $CM_P$ ).....	163
Figura 5.49. Perímetro convexo médio de <i>pellets</i> ( $PCM_P$ ).....	163
Figura 5.50. Área média de <i>clumps</i> ( $AM_C$ ).....	164
Figura 5.51. Diâmetro médio de <i>clumps</i> ( $DM_C$ ).....	164
Figura 5.52. Comprimento médio de <i>clumps</i> ( $CM_C$ ).....	164
Figura 5.53. Perímetro convexo médio de <i>clumps</i> ( $PCM_C$ ).....	164
Figura 5.54. Fotografia de um <i>clump</i> durante um cultivo de <i>S. clavuligerus</i> . ....	166
Figura 5.55. Área média de hifas ramificadas ( $AM_{HR}$ ).....	167
Figura 5.56. Diâmetro médio de hifas ramificadas ( $DM_{HR}$ ).....	167
Figura 5.57. Comprimento médio de hifas ramificadas ( $CM_{HR}$ ).....	167
Figura 5.58. Perímetro convexo médio de hifas ramificadas ( $PCM_{HR}$ ).....	167
Figura 5.59. Área média de hifas não ramificadas ( $AM_{HNR}$ ).....	169
Figura 5.60. Diâmetro médio de hifas não ramificadas ( $DM_{HNR}$ ).....	169
Figura 5.61. Comprimento médio de hifas não ramificadas ( $CM_{HNR}$ ).....	169
Figura 5.62. Perímetro convexo médio de hifas não ramificadas ( $PCM_{HNR}$ ).....	169
Figura 5.63. Número de extremidades de hifas ramificadas ( $NE_{HR}$ ).....	172
Figura 5.64. Unidade de crescimento hifal de hifas ramificadas ( $UCH_{HR}$ ).....	172
Figura 5.65. Dissipação de energia e tamanho de micro-turbilhões gerados nos cultivos com o impelidor TR.....	173
Figura 5.66. Dissipação de energia e tamanho de micro-turbilhões gerados nos cultivos com o impelidor EEDP.....	174
Figura 5.67. Dissipação de energia e tamanho de micro-turbilhões gerados nos cultivos com o impelidor EEUP.....	174
Figura 5.68. Resultados do cultivo B-1 em biorreator tipo tanque agitado equipado com o impelidor TR.....	177



Figura 5.69. Resultados do cultivo B-2 no biorreator tipo tanque agitado equipado com o impelidor EEDP.....	178
Figura 5.70. Resultados do cultivo B-3 no biorreator tipo tanque agitado equipado com o impelidor EEUP.....	179

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Relações geométricas num biorreator tipo tanque agitado. ....	9
Tabela 2.2. Correlações para a $\gamma_m$ e $\gamma_{max}$ em biorreatores mecanicamente agitados (adaptado de Chisti, (2001)). ....	40
Tabela 2.3. Regime de escoamento de fluidos em tanques agitados em função do Número de Reynolds (Re) (OBENG e KRESTA, 2003). ....	44
Tabela 2.4. Relações geométricas dos sistemas utilizadas na Figura 2.11 (Badino, 1997).....	45
Tabela 3.1. Viscosidades dinâmicas das soluções aquosas de glicerol a 30 °C. ....	63
Tabela 3.2. Parâmetros reológicos das soluções da goma xantana a 30 °C.....	63
Tabela 5.1. Comparação do número de potência nos sistemas estudados nessa tese de doutorado. ....	123
Tabela 5.2. Valores da dissipação de energia $\epsilon Tg$ em função das condições de agitação e aeração para três sistemas agitados com impelidores TR, EEDP e EEUP, utilizando como fluidos H <sub>2</sub> O (FN) e SGX-5 (FNN).....	125
Tabela 5.3. Valores da microescala de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) para frequências de agitação entre 600 e 1000 rpm nos sistemas equipados com os impelidores TR, EEDP e EEUP, utilizando FN (H <sub>2</sub> O) sem aeração e FNN (SGX-5) com diferentes níveis de aeração...	129
Tabela 5.4. Faixa de valores de $\epsilon_G$ obtidos para cada tipo de impelidor operando com fluidos Newtonianos em diferentes condições de agitação e aeração. ....	137
Tabela 5.5. Valores máximos e mínimos de $\epsilon_G$ obtidos para cada tipo de impelidor operando com fluidos não-Newtonianos. ....	138
Tabela 5.6. Valores máximos e mínimos das dimensões médias obtidas, referente a cada classe morfológica nos cultivos em biorreatores de <i>S. clavuligerus</i> com os três impelidores utilizados nessa pesquisa. ....	171
Tabela 5.7. Classificação dos impelidores em função das variáveis obtidas em cada cultivo. ....	180

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Apresentação das dimensões do biorreator Bioflo IIC da New Brunswick Scientific.....	60
Quadro 2. Dimensões do impelidor turbina Rushton. ....	61
Quadro 3. Dimensões geométricas dos impelidores <i>Elephant Ear</i> . ....	62
Quadro 4. Composição do médio de cultura de reativação da linhagem <i>S. clavuligerus</i> . ....	70
Quadro 5. Composição dos médios de crescimento de <i>S. clavuligerus</i> e produção de ácido clavulânico (Teodoro et al., 2006).....	71
Quadro 6. Condições de agitação e aeração empregadas nos cultivos em biorreator T=30 °C. ....	82
Quadro 7. Diluições utilizadas nos cultivos realizados para análise morfológica.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Símbolo</b>	<b>Definição</b>	<b>Unidade</b>
$A_{bolhas}$	Área total de troca de massa ou área total das bolhas	$m^{-1}$
$A_T$	Área da seção transversal do biorreator	$m^3$
$a$	Área interfacial de troca de massa	$m^{-1}$
b, c, d, e	Parâmetros da Equação 3.9 para determinar $k_L a$	(-)
br	Distância do braço do motor até o dinamômetro (Eq. 3.17)	m
$C$	Concentração	$\%V.V^{-1}$ , $kg.m^{-3}$
$C_l$	<i>Clearance</i> espaço livre do eixo até a base reator	m
$C_A$	Comprimento do agitador no líquido	m
$C$	Concentração do $O_2$ dissolvido na fase líquida	$g.O_2.m^{-3}$
$C_{AC}$	Concentração de ácido clavulânico	$mg.L^{-1}$
$C_e$	Concentração de $O_2$ dissolvido lido pelo eletrodo ou sinal do eletrodo	$mmol.L^{-1}$
$C_{e0}$	Concentração de $O_2$ do sinal do eletrodo no tempo 0 ( $t=t_0$ )	$mmol.L^{-1}$
$C_{es}$	Concentração de $O_2$ do sinal de eletrodo na saturação	$mmol.L^{-1}$
$C_G$	Concentração de glicerol	$mg.L^{-1}$
$C_i$	Concentração do $O_2$ dissolvido em equilíbrio na interface gás-líquido	$gO_2.m^{-3}$
$C_P$	Comprimento da pá	m
$C_S$	Concentração de saturação de $O_2$	$g.O_2.m^{-3}$
$C_X$	Concentração celular	$g_X.L^{-1}$
$\Delta C$	Gradiente de concentração	
$D$	Diâmetro do tanque	m
$D_E$	Diâmetro externo do tanque	m
$D_e$	Diâmetro do eixo	m
$D_I$	Diâmetro interno do tanque	m
$D_T$	Diâmetro de tanque	m
$D_{IA}$	Distância do aspersor	m

$D_L$	Coeficiente de difusão na camada gás-líquido	$m^2.s^{-1}$
DO	Demanda de oxigênio	$g_{O_2}.L^{-1}.h^{-1}$
$D_{O_2}$	Difusividade do oxigênio através da película estagnada da fase líquida	$m^2.s^{-1}$
$d_B$	Diâmetro de bolha	mm
$d_D$	Diâmetro do disco	m
$d_i$	Diâmetro do impelidor	m
E	Espessura da pá	m
EE	Impelidor oreja de elefante ou “ <i>Elephant Ear</i> ”	(-)
EEs	Impelidores “ <i>Elephant Ear</i> ”	(-)
EEDP	Impelidor “ <i>Elephant Ear down-pumping</i> ”	(-)
EEUP	Impelidor “ <i>Elephant Ear up-pumping</i> ”	(-)
FN	Fluido Newtoniano	(-)
FNN	Fluido não-Newtoniano	(-)
f, g, h, i, j	Parâmetros da Equação 3.12	(-)
g	Aceleração da gravidade	$m.s^{-2}$
H	Altura do reator	m
$H_E$	Comprimento da base (jaqueta de intercambio térmico)	m
$H_T$	Altura total do reator	m
$H_{TA}$	Altura total do agitador	m
$H_V$	Altura da dorna	m
$H_P$	Altura reta do vaso	m
$H_{IJ}$	Altura interna da jaqueta	m
$H_L$	Altura do líquido ou meio no reator	m
$H_e$	Constante de Henry	$g_{O_2}.m^{-3}.atm^{-1}$
$h_L$	Altura do líquido não gaseificado ( <i>hold-up</i> )	m
$h_D$	Altura da dispersão ( <i>hold-up</i> )	m
h	Altura do líquido do reator	m
K	Índice de consistência	$Pa.s^n,$ $kg.m^{-1}.s^{n-2}$
$K_2, a_2, b_2$ e $c_2$	Constantes de ajuste da correlação proposta por Cooper, Fernstrom e Miller (1944).	(-)

$K_G$	Coeficiente global de transferência de massa com base na fase gasosa da Equação 2.23	$m.h^{-1}$
$K_L$	Coeficiente global de transferência de massa com base na fase líquida da Equação 2.23	$m.h^{-1}$
$k$	Constante adimensional depende do tipo de impelidor da Equação 2.34	(-)
$k_G$	Coeficiente convectivo de transferência de massa da película gasosa	$m.h^{-1}$
$k_L$	Coeficiente convectivo de transferência de massa da película líquida	$m.h^{-1}$
$k_{La}$	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	$s^{-1}$
$k_e$	Constante de atraso na resposta do eletrodo	$s^{-1}$
$L_P$	Largura da pá	m
$l$	Distancia entre impelidores	m
MD	Método dinâmico	(-)
MP	Método do degrau da pressão	(-)
MS	Método de oxidação de sulfito de sódio	(-)
N	Frequência de rotação do impelidor	$s^{-1}$ ou $m^{-1}$
$N_{O_2}$	Velocidade de transferência de oxigênio dada em $g_{O_2}.L^{-1}.h^{-1}$	$g_{O_2}.m^{-3}.h^{-1}$
$N_p$	Número de potência	(-)
$n$	Índice de comportamento de escoamento	(-)
$n_{O_2}$	Fluxo de $O_2$ por unidade de área	$g_{O_2}.m^{-2}.h^{-1}$
OD%	Porcentagem de oxigênio dissolvido	
$P_0$	Potência transferida para sistemas não gaseificados	W
P	Potência	W
$P_g$	Potência transferida para sistemas gaseificados	W
$P_g.V^{-1}$	Consumo de potência para o sistema gaseificado por unidade de volume	$W.m^{-3}$
$P_{gm}$	Potência transmitida por cada impelidor	W
Q	Vazão volumétrica de alimentação de ar	$m^3.s^{-1}$
$Q_{O_2}$	Velocidade específica de respiração microbiana	$g_{O_2}.g_X^{-1}.h^{-1}$

Re	Número de Reynolds	(-)
rpm	Revoluções por minuto	(-)
rps	Revoluções por segundo	(-)
SG	Solução de glicerol	(-)
SGX	Solução de goma xantana	(-)
Sc	Número de Schmidt (-)	(-)
$T$	Torque	
TR	Turbina de Rushton	(-)
$t_e$	Tempo de contato ou tempo de residência dos micro-turbilhões na interface (Eq 2.26)	s
$u$	Flutuação da velocidade	$m.s^{-1}$
V	Volume útil do biorreator L	$m^3$
$V_G$	Volume do gás	$m^3$
$V_L$	Volume do líquido	$m^3$
$V_m$	Volume de líquido dividido pelo número de impelidores	$m^3$
X	Largura da chicana	m
x, y, z, w	Coefficientes referentes à Equação 3.14	(-)

## LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Definição	Unidade
$\delta$	Espessura da película estagnada da fase líquida	
$\rho_L$	Densidade do líquido ou médio	$\text{kg.m}^{-3}$
$\varepsilon$	Dissipação de energia	$\text{W.kg}^{-1}$ ou $\text{m}^2.\text{s}^{-3}$
$(\varepsilon_T)_l$	Taxa de dissipação de energia	$\text{W.kg}^{-1}$ ou $\text{m}^2.\text{s}^{-3}$
$(\bar{\varepsilon}_T)_l$	Taxa de dissipação de energia global	$\text{W.kg}^{-1}$ ou $\text{m}^2.\text{s}^{-3}$
$(\bar{\varepsilon}_T)_{l \max}$	Taxa de dissipação de energia local ou máxima	$\text{W.kg}^{-1}$ ou $\text{m}^2.\text{s}^{-3}$
$(\bar{\varepsilon}_T)_g$	Taxa de dissipação de energia específica	$\text{W.kg}^{-1}$ ou $\text{m}^2.\text{s}^{-3}$
$(\bar{\varepsilon}_T)_s$	Taxa de dissipação de energia devido ao borbulhamento de ar	$\text{W.kg}^{-1}$ ou $\text{m}^2.\text{s}^{-3}$
$(\bar{\varepsilon}_T)_{lg}$	Taxa de dissipação de energia gerada pelo impelidor num sistema gaseificado	$\text{W.kg}^{-1}$ ou $\text{m}^2.\text{s}^{-3}$
$\varepsilon_G$	Retenção gasosa global ou <i>hold-up</i>	(-)
$\phi_{ar}$	Vazão específica de alimentação de ar	$\text{vvm}$ ou $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
$g$	Aceleração da gravidade	$\text{m.s}^{-2}$
$\dot{\gamma}$	Velocidade de cisalhamento	$\text{s}^{-1}$
$\dot{\gamma}_m$	Velocidade de cisalhamento média	$\text{s}^{-1}$
$\dot{\gamma}_{\max}$	Velocidade de cisalhamento máximo	$\text{s}^{-1}$
$p_{O_2,i}$	Pressão parcial de $O_2$ na interface gás-líquido	atm
$p_{O_2}$	Pressão parcial de $O_2$ na fase gasosa	atm
$p_{O_2}^*$	Pressão parcial de $O_2$ em equilíbrio com a concentração de $O_2$ dissolvido da fase líquida	atm
$\tau$	Tensão de cisalhamento	$\text{Pa}=\text{N.m}^{-2}=\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-2}$
$\mu$	Viscosidade dinâmica	$\text{Pa.s}=\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$
$\mu_{ap}$	Viscosidade aparente	Pa.s
$\tau_e$	Tempo de resposta do eletrodo	s
$\eta_K$	Microescala de Kolmogorov ou comprimento do micro- turbilhão	$\mu\text{m}$



$\sigma$	Tensão superficial do médio	$\text{N.m}^{-1}$
$\sigma_w$	Tensão superficial da água	$\text{N.m}^{-1}$
$v_s$	Velocidade superficial do gás	$\text{m.s}^{-1}$
$v_{ap}$	Viscosidade cinemática aparente ( $v_{ap} = \mu_{ap}/\rho$ )	$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
$\nu$	Viscosidade cinemática do fluido	$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
$\omega$	Velocidade angular	$\text{rad.s}^{-1}$

# SUMÁRIO

---

---

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Abordagem da pesquisa.....	3
1.2. Objetivos.....	4
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
2.1. Biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado .....	7
2.2. Impelidores .....	10
2.2.1. Turbina Rushton - TR.....	13
2.2.2. Orelha de elefante ou <i>Elephant Ear</i> - ( <i>EE</i> ).....	15
2.3. Demanda e transferência de oxigênio em bioprocessos.....	17
2.4. Métodos para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio – ( $k_L a$ ).....	22
2.4.1. Método de oxidação do sulfito de sódio (MS) .....	22
2.4.2. Método dinâmico – (MD).....	23
2.4.3. Método do degrau da pressão – (MP).....	23
2.5. Correlações para a determinação do $k_L a$ .....	24

2.5.1.	Coefficiente de transferência de massa – ( $k_L$ ) .....	26
2.5.1.1.	Modelo da teoria de duas películas .....	28
2.5.1.2.	Modelo da teoria de penetração de Higbie .....	30
2.5.1.3.	Teoria da renovação de superfície .....	31
2.6.	Tamanho de bolha e área interfacial em biorreatores.....	32
2.6.1.	Retenção gasosa ( <i>hold-up</i> ) .....	32
2.7.	Cisalhamento em biorreatores .....	33
2.7.1.	Cisalhamento hidrodinâmico gerado pelo impelidor.....	36
2.7.2.	Cisalhamento por borbulhamento de gás .....	37
2.8.	Correlações para cálculo de velocidade de cisalhamento .....	40
2.9.	Potência dissipada.....	43
2.10.	Hidrodinâmica em biorreatores .....	45
2.11.	Dissipação de energia .....	46
2.12.	Influência das condições de cultivo na morfologia de microrganismos filamentosos .....	49
2.13.	Análises de imagem.....	53
2.14.	<i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	54
2.15.	Produção de ácido clavulânico por <i>S. clavuligerus</i> .....	55
2.16.	Considerações finais.....	57
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>58</b>
3.1.	Avaliação da transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento em biorreator convencional com diferentes impelidores.....	58
3.1.1.	Materiais .....	58
3.1.1.1.	Biorreator .....	58
3.1.1.2.	Impelidores.....	60
3.1.1.3.	Fluidos.....	62
3.1.1.4.	Fluxômetro .....	63
3.1.1.5.	Antiespumante.....	63
3.1.1.6.	Analizador de oxigênio dissolvido .....	63
3.1.1.7.	Medidor de pressão .....	64

3.1.1.8.	Eletrodo de O <sub>2</sub> dissolvido .....	64
3.1.1.9.	Banho térmico .....	64
3.1.1.10.	Equipamento para medida da potência.....	64
3.1.1.11.	Câmera digital .....	64
3.1.1.12.	Software para análise de imagem.....	64
3.1.2.	Métodos .....	65
3.1.2.1.	Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k <sub>L</sub> a) pelo método da pressão .....	65
3.1.2.2.	Determinação da velocidade de cisalhamento média ( $\gamma_m$ ) .....	66
3.1.2.3.	Medidas da retenção gasosa .....	68
3.1.2.4.	Medidas de consumo de potência.....	69
3.2.	Avaliação de transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento em cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	70
3.2.1.	Materiais .....	70
3.2.1.1.	Microrganismo .....	70
3.2.1.2.	Médios de cultura .....	70
3.2.1.3.	Mesa incubadora .....	71
3.2.1.4.	Autoclaves.....	71
3.2.1.5.	Câmera asséptica.....	71
3.2.1.6.	Ultrafreezer.....	72
3.2.1.7.	Espectrofotômetro UV/Vis.....	72
3.2.1.8.	Solução de coloração.....	72
3.2.1.9.	Microscópio ótico e câmera digital .....	72
3.2.2.	Métodos .....	72
3.2.2.1.	Avaliação da velocidade cisalhamento media ( $\gamma_m$ ) em cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	72
3.2.2.2.	Crescimento celular.....	73
3.2.2.3.	Análise de imagens.....	73
3.2.2.4.	Análise de ácido clavulânico (AC).....	73
3.2.2.5.	Análise de glicerol (AG) .....	73
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>74</b>
4.1.	Transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento com diferentes impelidores.....	74

4.1.1.	Teste preliminar localização do impelidores TR no biorreator .....	74
4.1.2.	Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) pelo Método da Pressão.....	75
4.1.3.	Software para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio .....	77
4.1.4.	Consumo de potência .....	78
4.1.5.	Dissipação de Energia e Microescala de turbulência de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) .....	80
4.1.6.	Aquisição de imagens para determinação do tamanho médio das bolhas.....	80
4.2.	Avaliação de transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento em cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	81
4.2.1.	Influência das condições de cisalhamento em cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	81
4.2.2.	Cultivos em biorreator tipo tanque agitado e aerado.....	82
4.2.3.	Análise morfológica .....	84
4.2.4.	Análises de imagem.....	84

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 87**

5.1.	Transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento em biorreator convencional com diferentes impelidores.....	87
5.1.1.	Correlações de $k_{La}$ para fluidos Newtonianos.....	87
5.1.1.1.	Impelidor TR.....	87
5.1.1.2.	Impelidor EEDP .....	90
5.1.1.3.	Impelidor EEUP .....	93
5.1.2.	Correlações de $k_{La}$ para fluidos não-Newtonianos.....	96
5.1.2.1.	Impelidor TR.....	96
5.1.2.2.	Impelidor EEDP .....	99
5.1.2.3.	Impelidor EEUP .....	101
5.1.3.	Correlações de velocidade de cisalhamento média ( $\gamma_m$ ).....	106
5.1.3.1.	Viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) e regime de agitação.....	115
5.1.4.	Comparação entre os valores da velocidade de cisalhamento média ( $\gamma_m$ ) com a literatura.....	116
5.1.5.	Potência dissipada .....	118
5.1.6.	Dissipação de energia e microescala de turbulência de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) .....	123

5.1.7.	Retenção gasosa global ( $\epsilon_G$ ) .....	131
5.1.8.	Avaliação do diâmetro de bolha ( $D_B$ ) por análise de imagem.....	143
5.2.	Avaliação das condições de cisalhamento em cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> com diferentes impelidores .....	153
5.2.1.	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ) e velocidade de cisalhamento média ( $\gamma_m$ ) em biorreator nos cultivos com diferentes impelidores .....	155
5.2.2.	Análise da morfologia celular durante cultivos com diferentes impelidores ...	159
5.2.3.	Dissipação de energia $\epsilon T_g$ e escala de Kolmogorov $\eta_K$ nos cultivos com diferentes impelidores .....	173
5.2.4.	Influência das condições de operação de biorreator na produção de ácido clavulânico nos cultivos com diferentes impelidores .....	176
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>183</b>
<b>7.</b>	<b>SUGESTÕES</b> .....	<b>187</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>188</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A era dos antibióticos se iniciou com o descobrimento da penicilina por Alexander Fleming em 1928, revolucionando a medicina moderna, permitindo tratar muitas doenças que até o início do século XX eram consideradas incuráveis, aumentando a esperança de maior longevidade para o ser humano no mundo. Desde essa época até a atualidade, se desenvolveram tecnologias de produção de grande quantidade de compostos  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, ácido clavulânico, etc.), onde a venda desses compostos atingiram mais de 20 bilhões de dólares por ano, conforme reportado por Ozcengiz e Demain (2013).

Vários processos biotecnológicos utilizam microrganismos filamentosos estritamente aeróbios que geram caldos de cultivo viscosos com comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, para a produção de diferentes metabólitos secundários dentre os quais se destacam os antibióticos. Para tais fins são empregados biorreatores convencionais agitados e aerados (JÜSTEN et al., 1996; BADINO e SCHMIDELL, 2001; ROSA et al., 2005). Esses processos biotecnológicos apresentam dificuldades em termos de transferência de quantidade de movimento, calor e massa, devido à reologia dos caldos, produto do crescimento e da morfologia. O maior impacto está na redução da transferência de oxigênio da fase gasosa para a líquida, diminuindo o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ), afetando o crescimento celular e a biossíntese de produto e, portanto, o desempenho do processo (BADINO e SCHMIDELL, 2001).

O crescente interesse da indústria farmacêutica na produção desses compostos tem exigido o aperfeiçoamento dos métodos de produção através da modificação das características destes processos, sendo estudadas diferentes condições de operação de biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado, avaliando as condições hidrodinâmicas e de transferência de oxigênio, a fim de promover uma adequada mistura, transferência de calor e massa (oxigênio) (GARCÍA-OCHOA e GOMEZ, 1998; JUNKER et al., 1998).

Diferentes tipos de impelidores podem ser utilizados nesses bioprocessos, sendo que os biorreatores providos do impelidor tipo turbina de Rushton para a dispersão de gás são os mais tradicionalmente utilizados (BADINO e SCHMIDELL, 2001; ROSA et al., 2005). No

entanto, tal impelidor apresenta grandes desvantagens, entre elas a de impor elevado cisalhamento ao caldo, especialmente nas regiões próximas das pás (BOWEN 1986; CAMPESI et al., 2009).

Pelo exposto, para obter-se uma adequada transferência de oxigênio ( $O_2$ ) da fase gasosa para a fase líquida, deve-se evitar a geração de regiões com alto cisalhamento, já que essas afetam as células, produzindo mudanças morfológicas irreversíveis ao microrganismo. Por tal motivo, o efeito da agitação sobre a morfologia dos cultivos submersos deve ser mais cuidadosamente avaliado, tornando-se indispensável uma boa escolha do tipo de impelidor que determinará as forças hidrodinâmicas que irão afetar a morfologia do microrganismo, além do consumo de potência do sistema (OH et al., 1991; JÜSTEN et al., 1996; CHISTI, 2001). Portanto, a correta escolha do tipo de impelidor pode melhorar significativamente o desempenho do cultivo em termos de crescimento e morfologia celular e biossíntese do produto de interesse (MIRRO e VOLL, 2009).

Na literatura, o impelidor tipo “orelha de Elefante” ou “*Elephant Ear*” (EE), é apresentado como um impelidor de baixo cisalhamento. Alguns autores anunciam esse impelidor como o mais adequado para o cultivo de células sensíveis ao cisalhamento, tais como as células de tecido animal e fungos e bactérias filamentosas (ZHU et al., 2009; MIRRO e VOLL, 2009; COLLIGNON et al., 2010). Embora o EE seja indicado como o melhor impelidor para os cultivos de células sensíveis ao cisalhamento em comparação à turbina de Rushton, não existem na literatura estudos que demonstrem quantitativamente e comparem as condições de cisalhamento impostas por esses impelidores em relação aos convencionais, principalmente em cultivos utilizando fungos ou bactérias filamentosas.

Devido à importância da velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) no projeto, operação e aumento de escala de biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado, diversos trabalhos propõem equações de previsão da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ). Essas correlações relacionam  $\dot{\gamma}_m$  com as condições de operação, como a frequência de agitação do impelidor (N) e com propriedades físicas e reológicas do fluido, como o índice de consistência e o índice de comportamento de escoamento (K e n), sendo indispensável a busca por correlações mais completas a fim de ter uma melhor estimativa de  $\dot{\gamma}_m$  no sistema em estudo.

Ainda, os efeitos do cisalhamento na morfologia do microrganismo precisam ser cuidadosamente avaliados. Joshi et al. (1996) classificam esses efeitos como danos letais e sub-letais, sendo estes danos parte de um mecanismo baseado na resposta das células ao cisalhamento, onde um dano letal provoca a morte e um dano sub-letal se manifesta em



alterações metabólicas. A resposta do microrganismo exposto a esse ambiente hostil no interior de um biorreator devido aos efeitos da agitação e aeração pode ser monitorada. Tendo em conta que microrganismos filamentosos em cultivos submersos apresentam uma morfologia complexa exibindo diferentes estruturas morfológicas sendo dispersas ou altamente densas. Embora mudanças na morfologia pode ser resultado do consumo de nutrientes e de oxigênio, alterando a formação de produto.

Na área de pesquisa em Engenharia Bioquímica do Departamento da Engenharia Química da UFSCar vem-se desenvolvendo desde 1998 uma linha de pesquisa baseada no estudo do processo de produção de ácido clavulânico (AC) pela bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus*. Logo, é de grande interesse a avaliação e comparação das influências da transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento no crescimento, na morfologia celular e na produção de AC. Operando biorreatores convencionais equipados com diferentes impelidores, como o impelidor convencional turbina de Rushton (duas unidades) e impelidores “orelha de Elefante” ou “*Elephant Ear*” (EEs), nos modos de escoamento descendente (EEDP) e ascendente (EEUP).

## 1.1. Abordagem da pesquisa

O estudo teórico-experimental foi dividido em duas etapas, a saber:

- I. Avaliação da transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento dos sistemas na ausência de microrganismos

Nesta etapa, três diferentes sistemas, ou seja, um biorreator tipo tanque agitado e aerado provido com três diferentes impelidores, TR, EEDP e EEUP, foram avaliados em relação à transferência de oxigênio e às condições de cisalhamento. Os sistemas foram operados em diferentes condições de frequência de agitação do impelidor ( $N$ ) e vazões de ar ( $\phi_{ar}$ ) utilizando diferentes fluidos Newtonianos (água e soluções de glicerol) e não-Newtonianos (soluções de goma xantana). Aonde diferentes parâmetros foram medidos, calculados ou determinados e inter-relacionados qualitativa e quantitativamente a partir de correlações. São eles:

- a. Viscosidade dinâmica ( $\mu$ ) de fluidos Newtonianos (água e soluções de glicerol).
- b. Propriedades reológicas ( $K$  e  $n$ ) e viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) de fluidos não-Newtonianos (soluções de goma xantana).

- c. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ).
- d. Velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ).
- e. Retenção gasosa (*hold-up*).
- f. Diâmetro de bolha.
- g. Consumo de potência.
- h. Número de Reynolds (Re).
- i. Dissipação de energia.
- j. Microescala de Kolmogorov.

II. Avaliação da transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento na morfologia e no crescimento celular e na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

Nesta etapa foram realizados cultivos de *S. clavuligerus* nos diferentes sistemas caracterizados na etapa anterior sob as mesmas condições de operação ( $N=800$  rpm e  $\phi_{ar}=0,50$  vvm). Ao longo dos cultivos foram obtidas informações reológicas dos caldos, de crescimento e morfologia do microrganismo e de produção de ácido clavulânico. Esses parâmetros foram relacionados de formas qualitativa e quantitativa com as condições de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) e de cisalhamento impostas às células.

## 1.2. Objetivos

A presente tese de doutorado teve como objetivo o estudo da transferência de oxigênio, consumo de potência e das condições de cisalhamento em biorreator convencional de bancada tipo tanque agitado com três diferentes impelidores TR e EEs.

De modo a alcançar os objetivos pretendidos, inicialmente foram obtidas equações de previsão para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) e para a velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) para os diferentes sistemas em função da frequência de rotação do impelidor ( $N$ ), vazão específica de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ) e das propriedades reológicas de fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos ( $K$  e  $n$ ). Posteriormente foi avaliada a influência da transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento na morfologia e no crescimento celular e na produção durante cultivos de *S. clavuligerus* visando para produção de ácido clavulânico em condições de agitação e aeração fixa nos diferentes sistemas estudados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Um biorreator pode ser definido como um dispositivo no qual os processos bioquímicos (biológicos ou enzimáticos) se desenvolvem em determinadas condições ambientais, onde o funcionamento deste é monitorado e controlado rigorosamente. No caso de processos biológicos, estes podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, dependendo do organismo cultivado. Nesses processos alguns parâmetros são importantes como concentração de nutrientes (substratos, sais e oxigênio dissolvido), pH, temperatura, pressão, modo de fornecimento de nutrientes e remoção de resíduos tóxicos aos organismos, em alguns casos (MARTIN; WENDT; HERBERER, 2004).

Diferentes sistemas de biorreatores que correspondem a esta definição estão atualmente sendo utilizada numa vasta gama de aplicações biotecnológicas, incluindo fermentações industriais, tratamento de águas residuais, fabricação de alimentos, produção de biofármacos e de proteínas recombinantes para a obtenção de anticorpos, vacinas e antibióticos. Para cada aplicação deverá ser utilizado um desenho específico de biorreator, isto é, o propósito de utilização deste depende diretamente do tipo de bioprocessos e do catalisador (microrganismo, enzima, célula animal ou vegetal) e definirá o modo de operação do mesmo. Nesse sentido, as condições de agitação e mistura utilizado têm frequentemente um grande impacto no custo da produção e na qualidade do produto.

Os primeiros biorreatores derivaram dos equipamentos denominados fermentadores, os quais foram, há muitas décadas, desenvolvidos para cultivo de fungos e bactérias para fins industriais. No entanto, na definição mais estrita, um fermentador é um sistema que fornece um ambiente anaeróbio como, por exemplo, para a produção de álcool a partir do açúcar (REGULY, 2000).

A escolha e construção de um biorreator implicam nos seguintes requisitos:

- 1) Dimensões e relações geométricas entre as diferentes estruturas/componentes que o caracterizam.
- 2) Os materiais utilizados na construção e os cuidados construtivos (natureza dos materiais, tipos de solda, vedação, acabamento), devem ser tais que não alterem ou afetem negativamente a atividade microbiana desejada, seja por interação com o meio de fermentação ou abrigando microrganismos indesejados. Portanto, os materiais

devem ser resistentes à corrosão devido à presença de nutrientes ou outros produtos, assim como também aos efeitos de temperaturas de esterilização. Deve-se ter em conta na operação do biorreator, as pressões impostas pela pressurização e o peso do conteúdo do recipiente.

- 3) Sistema de fornecimento de aeração (aeradores-dispersores, filtros de ar).
- 4) Sistema de agitação (motor, redutor, mancais, eixo e sua vedação, impelidores escolhidas, turbinas ou hélices).
- 5) Sistema de alimentação do meio em combinação com os nutrientes.
- 6) Inoculação e amostragem.
- 7) O controle da temperatura.
- 8) Controle do pH e outros parâmetros que envolvam a presença de íons específicos.
- 9) Controle de espuma.
- 10) Manutenção de assepsia e esterilização.

Em conjunto, todos esses requisitos constituem um campo de aplicação cooperativa de conhecimentos de microbiologistas, bioquímicos, engenheiros químicos e mecânicos, que permitem definir as condições ótimas para o crescimento controlado de um cultivo puro ou uma mistura definida de células (BLAKCBROUGH, 1972, REGULY, 2000).

Por outro lado, o desenho e seleção de cada biorreator são únicos, porém, existem alguns princípios básicos ou critérios para o projeto de biorreatores que vão depender do tipo de organismo (microrganismos, células animais ou plantas). Assim, deve-se considerar a transferência adequada de oxigênio, adequada tensão de cisalhamento e uma boa mistura dentro do biorreator. Por exemplo, em cultivos submersos envolvendo organismos aeróbicos, o biorreator convencional é o mais utilizado. Estes são equipados com impelidores para agitação mecânica dos caldos. Essa agitação mecânica fragmenta as bolhas de ar e intensifica a turbulência do meio líquido. Ainda, existem outros tipos importantes de biorreatores nomeados biorreatores pneumáticos onde a agitação é realizada por borbulhamento de ar (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1973).

## **2.1. Biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado**

O biorreator convencional tipo tanque agitado é o mais versátil e importante biorreator empregado em todas as escalas de produção, seja em laboratórios de pesquisa ou na indústria de bioprocessos.

Como comentado anteriormente, esses biorreatores são utilizados em cultivos aeróbicos onde a aeração e agitação são essenciais para suprir de oxigênio os diferentes tipos de cultivos, tais como microrganismos, célula animal ou vegetal. Sendo esses biorreatores altamente eficazes, já que eles mantem uma suspensão uniforme em todo o tanque, evitando a formação de agregados. Especialmente em cultivos com geração de caldos com características reológicas complexas e em processos que exigem altas velocidades de transferência de calor e massa. Como por exemplo, em caldos de cultivo não-Newtonianos, onde é difícil atingir uma mistura perfeita o qual gera problemas de aeração. (REGULY, 2000; MACNEIL, 2008; CERRI, 2009; KUMAR et al. 2011).

O desenho e o princípio de funcionamento do biorreator tipo tanque agitado são relativamente simples:

- a) O recipiente pode apresentar diferentes geometrias: cilíndrica vertical, de seção transversal quadrada e retangular, ou cilindros horizontais, sendo geralmente mais utilizado o tanque de cilíndrico vertical, onde normalmente a altura do líquido é próxima ao diâmetro do tanque.
- b) O tanque apresenta um motor acoplado ao eixo sendo as bolhas produzidas pelo suprimento do ar fornecidas pelo aspensor que são fragmentadas pelo(s) impelidor (es) à medida que vão ascendendo. Ou seja, o agitador é constituído de motor, eixo e impelidor (es).
- c) A fim de atingir uma mistura adequada, evita a formação de vórtices na agitação de líquidos de viscosidade reduzida (como são os caldos principalmente em início de cultivo) e zonas estagnadas junto à periferia. Esse biorreator conta com um sistema de hastes defletoras ou chicanas, instaladas verticalmente duas a duas em posição oposta e fixadas na parede cilíndrica interna do biorreator, que ajudam a evitar estes efeitos. O número de chicanas geralmente varia de quatro a oito, apresentando uma largura igual a 1/10 ou 1/12 do diâmetro do equipamento (BLAKCBROUGH, 1972).

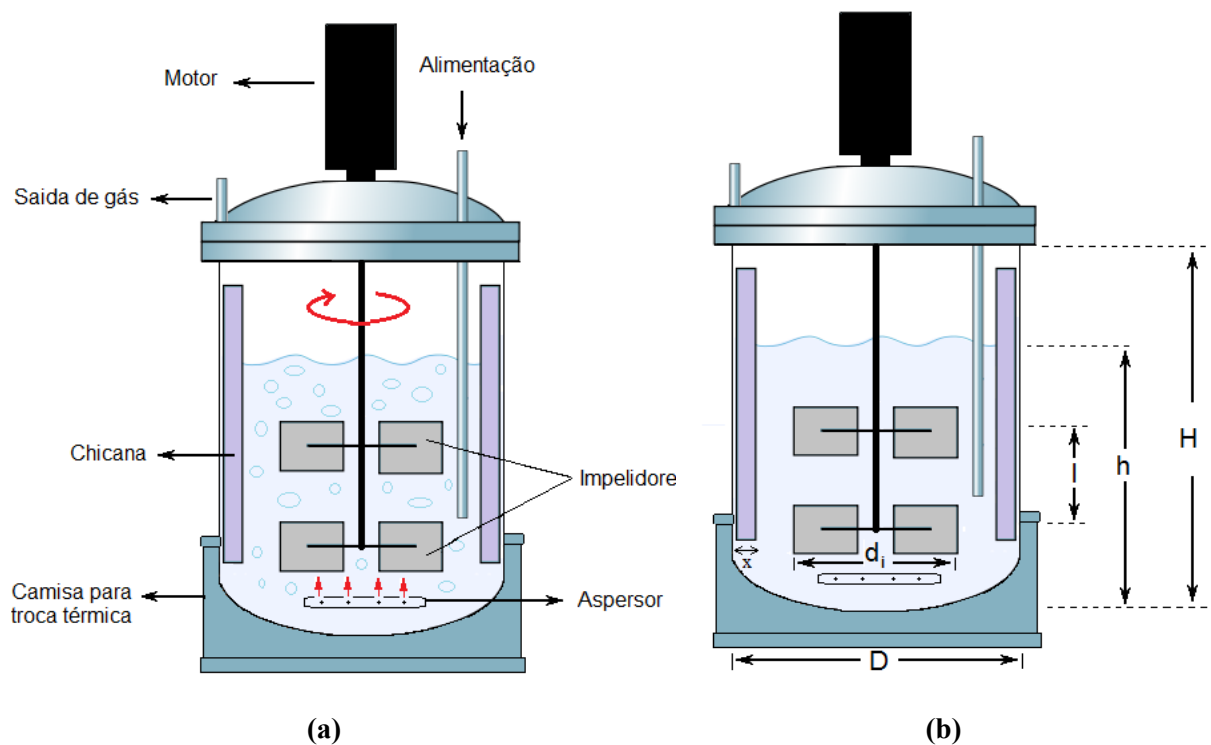
Nesse sentido, podemos dizer que a importância das chicanas reside na introdução de mistura e turbulência no líquido, isto é:

- i. O movimento do líquido sob a ação do agitador na ausência de chicanas seguiria linhas de corrente circulares em torno do eixo de agitação.
- ii. O grau de mistura entre as diferentes camadas do líquido seria reduzido e geraria um vórtice forçado que introduziria ar no líquido e reduziria a potência transmitida ao mesmo.

De fato, ao introduzir essas chicanas as linhas de corrente são interrompidas, gerando-se uma intensa turbulência e os vórtices e redemoinhos (turbilhões) de maior tamanho são destruídos.

O biorreator tipo tanque agitado e suas principais dimensões geométricas são apresentados na Figura 2.1. Na Tabela 2.1 são indicados os valores das relações entre os parâmetros geométricos, no entanto, essas relações podem variar em função dos distintos cultivos (REGULY, 2000).

**Figura 2.1. (a) Biorreator aeróbio convencional tipo tanque agitado. (b) Dimensões geométricas.**



Fonte: Desenho adaptado de [http://en.wikipedia.org/wiki/Continuous\\_stirred-tank\\_reactor](http://en.wikipedia.org/wiki/Continuous_stirred-tank_reactor)

**Tabela 2.1. Relações geométricas num biorreator tipo tanque agitado.**

Descrição	Razão	Valores típicos
Altura do reator / diâmetro do tanque	$H/D$	2,0 - 5,0
Diâmetro do impelidor / diâmetro do tanque	$d_i/D$	0,3 - 0,5
Distancia entre impelidores / diâmetro do impelidor	$l/d_i$	1,0 - 1,2
Altura do líquido do reator / diâmetro do tanque	$h/D$	1,0 - 2,0
Largura da chicana / diâmetro do tanque	$x/D$	0,08 - 0,12

A potência de agitação necessária depende das relações geométricas citadas. Do ponto de vista econômico, é evidente que o volume útil deve ser o maior possível, mas deve ser observada a necessidade de um espaço livre destinado à formação de espuma. O biorreator industrial mais usado em culturas submersas é do tipo cilíndrico vertical com agitador e aspersor de ar, equipado com dispositivos de aquecimento e resfriamento. Sua capacidade varia desde 5 a 500 m<sup>3</sup>, o que depende para obtenção de produto ou para pesquisa na coleta de dados (REGULY, 2000, SCHIMIDELL, 2001). Como ilustração, a Figura 2.2 mostra o ambiente interno de biorreatores em escala industrial.

**Figura 2.2. Ambiente interno de biorreatores industriais. a) Inspeção periódica de um biorreator tipo tanque agitado (foto Yuri Raysper, 2005). b) Instalação de um impelidor de grandes lâminas *hydrofoil* (Nienow, 2012).**



(a)



(b)

## 2.2. Impelidores

A fim de aumentar a eficiência da agitação do caldo de cultivo são empregados diferentes impelidores. O tipo, o desenho e a velocidade de agitação do impelidor têm um pronunciado efeito sob o cultivo, onde se procura manter as condições hidrodinâmicas apropriadas para adequadas transferência de massa, dispersão gás-líquido e dispersão gás-sólido (GOGATE, BEENACKERS e PANDIT, 2000). Esse efeito é obtido quando o impelidor quebra as bolhas de gás gerando bolhas de menor tamanho resultando em um incremento da área superficial no contato gás-líquido, levando a uma maior transferência de massa do gás para o meio líquido.

Em cultivos submersos, a agitação atingida pelo uso de impelidores é requerida para executar diferentes funções, alcançando um ambiente uniforme no interior do tanque. Por outro lado, visando uma adequada mistura do cultivo e, portanto, adequada transferência de quantidade de movimento, calor e massa, a escolha do tipo de impelidor é indispensável. Por exemplo, em cultivos de microrganismos ou células animais, a escolha correta do impelidor pode incrementar consideravelmente a produtividade nesses cultivos (WHANG e ZHONG 1997; GARCÍA-OCHOA e GOMEZ, 1998; MIRRO e VOLL, 2009).

Existe uma grande variedade de impelidores, alguns deles são ilustrados na Figura 2.3.

**Figura 2.3. Diferentes tipos de impelidores oferecidos pela ASEPCO PollyMixer.**





Diferentes tipos de impelidores com diferentes geometrias podem ser utilizados em bioprocessos no intuito de melhorar o desempenho dos sistemas em termos do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$  em  $h^{-1}$ ), tempo de mistura, retenção gasosa e consumo de potência em cultivos (GURA e RAU, 1993; JUNKER et al., 1998). Assim mesmo, as diferenças no escoamento padrão nesses impelidores podem causar variações na distribuição da velocidade de cisalhamento e na taxa de dissipação de energia. Dependendo desses dois parâmetros e do processo requerido, escolhe-se o tipo de impelidor mais adequado, aonde o escoamento padrão de um impelidor pode ser alterado por parâmetros como diâmetro do impelidor, viscosidade do fluido e emprego de vários impelidores (KRESTA e BRODKEY, 2003).

### **Classificação**

Dewan et al. (2006) e Mirro e Voll (2009), classificam os impelidores utilizados em biorreatores tipo tanque agitado em duas categorias, de acordo com o padrão de escoamento ou tipo de movimento que imprimem ao fluido durante a agitação. Dependendo do tipo de impelidor, o escoamento e a mistura são conduzidos de acordo com a orientação das lâminas, apresentando diferentes comportamentos no escoamento radial, axial ou combinação de ambas as orientações.

#### **a) Escoamento ou fluxo radial**

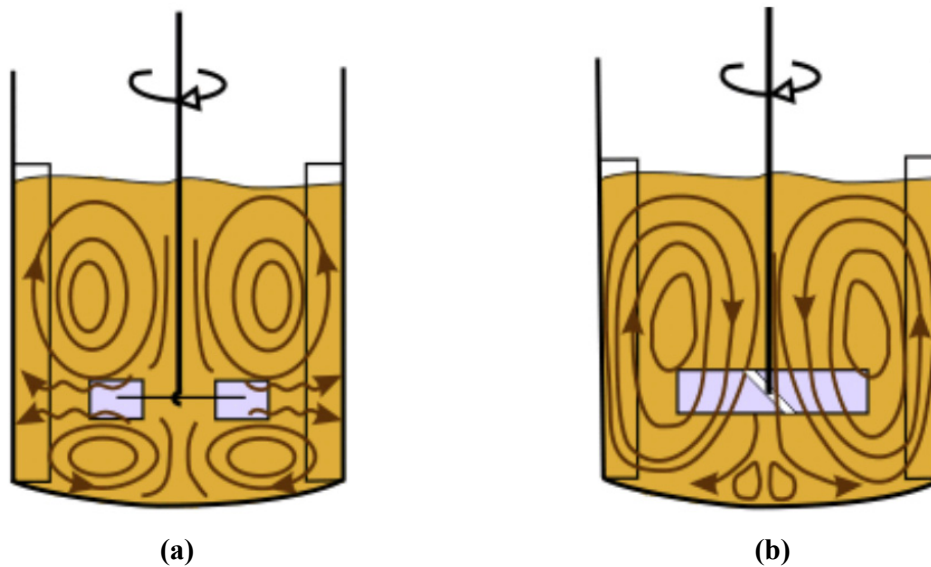
Este tipo de escoamento se dá quando o líquido é dirigido do eixo do agitador em direção à parede do reator, ou seja, ao longo do raio do tanque conforme mostrado na Figura 2.4 (a). Podemos ver que as características das lâminas são responsáveis por gerar regiões de alta turbulência para a quebra das bolhas, sendo muito utilizados em dispersão gás-líquido (KRESTA e BRODKEY 2003). Esta alta turbulência em vários processos industriais pode danificar materiais como fungos filamentosos, células animais e como também cristais e precipitados. Os impelidores de escoamento radiais mais comuns são: impelidores de palhetas planas simples e turbinas (ou discos).

#### **b) Escoamento ou fluxo axial**

Ocorre quando o fluido é dirigido para cima ou para a base do reator, ou seja, paralelo ao eixo do agitador (Figura 2.4 (b)). A orientação das pás do impelidor determina se a direção

do escoamento é para cima (ascendente) ou para baixo (descendente) assim como a direção de agitação (giro do rotor, horário ou anti-horário).

**Figura 2.4.** Tipos de escoamento de acordo à orientação das pás do impelidor; fluxo radial em (a) e fluxo axial em (b), em biorreatores providos de *baffles* (SMITH, 2011).



Fonte online: <http://www.thermopedia.com/content/549/>.

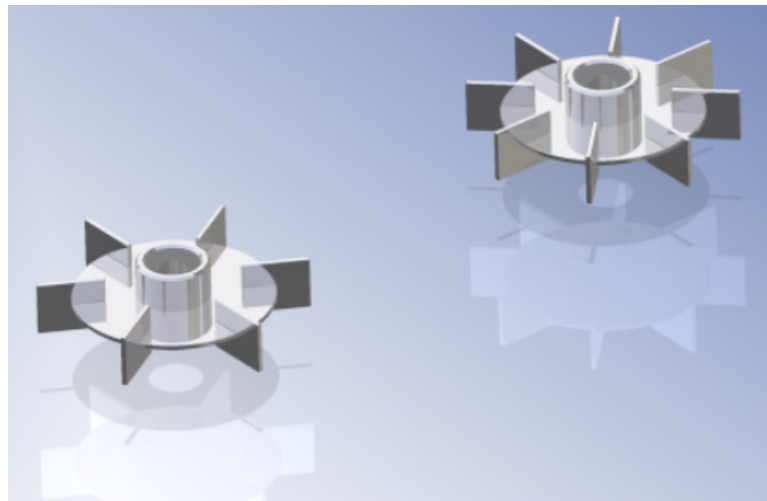
Os impelidores de escoamento axial são os mais eficientes para a mistura de líquidos e suspensão de sólidos. São também utilizados vastamente em culturas de células animais e em processos sensíveis ao cisalhamento como cristalização e precipitação (KRESTA e BRODKEY, 2003; MACNEIL, 2008; MIRRO e VOLL, 2009).

Entre outros, a turbina de lâminas inclinadas, tanto simples como disco, produzem um escoamento axial. Os ângulos das lâminas podem variar como no caso das turbinas *pitched blade*, onde se podem encontrar variações entre 10 até 90° desde a horizontal, sendo o mais comum o ângulo de 45°. Segundo Kresta e Brodkey (2003), a descarga de fluido a partir de um impelidor *pitched blade* é considerado de escoamento misto por gerar dois componentes da velocidade (axial e radial) para baixas e médias viscosidades do fluido. Impelidores que apresentam escoamento axial ascendente mostram-se mais eficazes trabalhando próximo da base do reator em comparação com impelidores de escoamento radial. No entanto os impelidores de escoamento axial descendente são bem mais efetivos quando apresentam maior afastamento ou maior distância da base do biorreator “*clearance*” ( $C_i$ ), ou seja, maiores valores de  $C/T$  (KRESTA e BRODKEY 2003).

### 2.2.1. Turbina Rushton - TR

Projetada por J.H. Rushton, originalmente foi chamada de turbina disco de lâminas planas ou turbina *flat-bladed*, conforme mostrado na Figura 2.5. É o tipo de impelidor mais comum e utilizado, com seis ou oito lâminas planas montadas radialmente sobre um disco, posicionadas verticalmente ao longo do eixo de agitação, sendo que esta disposição das lâminas origina um escoamento radial unidirecional.

**Figura 2.5. Impelidor tipo turbina Rushton ou *flat-bladed turbine*. Utilizado para gerar dispersão e elevados valores de cisalhamento.**



Fonte: [http://www.agimix.pl/agitators\\_imp.php](http://www.agimix.pl/agitators_imp.php)

Tipicamente o impelidor turbina Rushton (TR) apresenta um diâmetro igual a 1/3 do diâmetro do tanque e podem ser utilizados um ou mais impelidores num mesmo eixo quando for utilizado biorreatores maiores.

Comumente utilizado em cultivos que não são sensíveis ao cisalhamento, como bactéria e fungos unicelulares (leveduras). Além disso, são usados em fermentações bacterianas, especialmente em cultivos que geram caldos altamente não-Newtonianos (MITSUYASU, KUWAJIMA e SATOH, 1992; BADINO e SCHMIDELL, 2001; MIRRO e VOLL, 2009). É preferido por fornecer elevados níveis de turbulência (ver Figura 2.6 (a)), ou seja, altos valores de cisalhamento produzindo uma quebra efetiva das bolhas de ar, incrementando a transferência de massa em dispersão gás no líquido e em sistemas gás-líquido-sólido (WHANG e ZHONG, 1997; KRESTA e BRODKEY, 2003). Nesse sentido, grandes companhias fabricantes de equipamentos como a New Brunswick Scientific Co, Inc.,

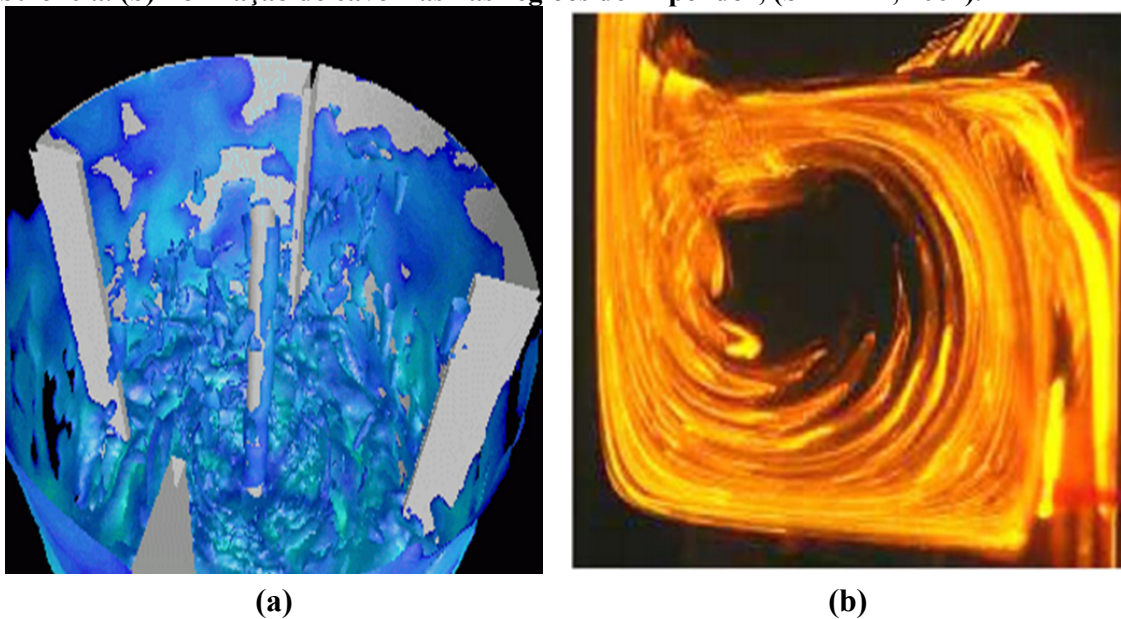
Applikon® Biotechnology e Sartorius BBI Systems, Inc. oferecem modernos biorreatores implementados com este tipo de turbina.

Embora tenha seu uso muito difundido, o uso deste tipo de impelidor apresenta desvantagens como:

a) Exibem alta demanda de número de potência quando não é aerado gerando um alto consumo de energia.

b) Mostra uma queda significativa de consumo de potência quando o sistema é aerado, sendo esta pronunciada em fluidos viscosos. Sendo o  $k_L a$  dependente da vazão de ar e da potência aplicada por unidade de volume, esta queda de potência implica numa redução na transferência de massa.

**Figura 2.6. Vantagens e desvantagens no uso do impelidor turbina Rushton. (a) Alta turbulência. (b) Formação de cavernas nas regiões do impelidor, (SZALAI, 2004).**



Fonte: Fig.(a) <http://www.bakker.org/cfm/webdoc18.htm>

c) Formação de “cavernas” em regiões próximas as pás. Por exemplo, a Figura 2.6 (b), mostra a formação desta estrutura gerada pelo impelidor Ekato Intermig®. A imagem foi obtida pela técnica de indução da fluorescência mediante uso de um laser (LIF), utilizando Rhodamina em um fluido Newtoniano (SZLAI, 2004).

d) Formação de regiões estagnadas em zonas distantes do impelidor quando é operado em cultivos não-Newtonianos.

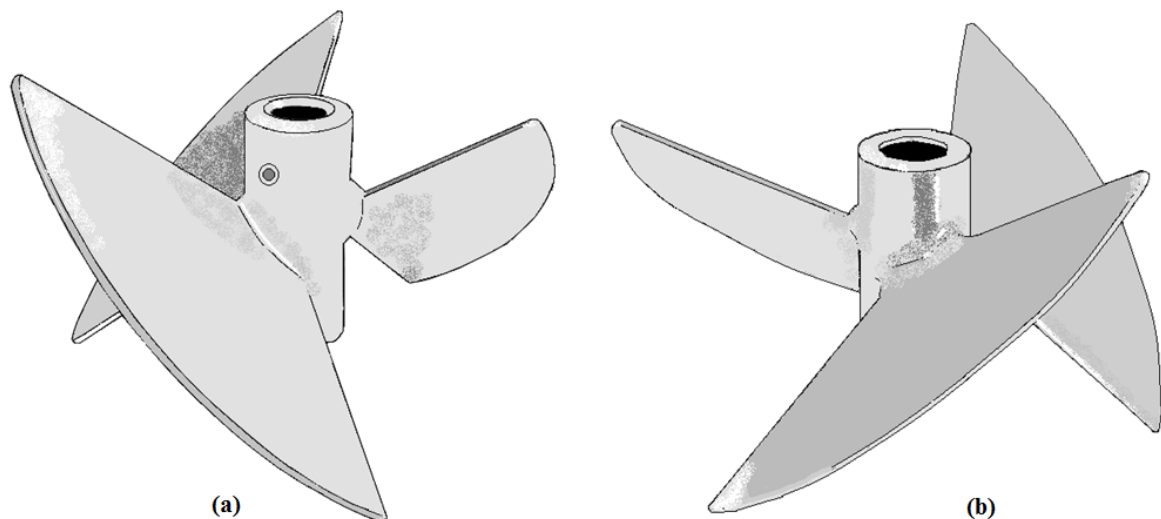
e) Apresentam alta dissipação de energia não uniforme (MCFARLANE e NIENOW, 1995; JÜSTEN et al., 1996).

f) A mais importante desvantagem é gerar alto cisalhamento, especialmente em regiões próximas das pás como indicado por Bowen (1986), Robertson e Ulbrecht (1987) e Campesi et al. (2009).

### 2.2.2. Orelha de elefante ou *Elephant Ear- (EE)*

Esse impelidor, também denominado de impelidor axial *pitched blade* por Mirro e Voll (2009), possui três pás planas de formato triangular e inclinadas por um ângulo de 45° (vide Figura 2.7). São geralmente utilizados com 3 pás, ocorrendo em alguns casos variações neste número. Dependendo do posicionamento das pás, sua configuração é denominada de escoamento ou fluxo ascendente (*up-pumping*) (EEUP) ou de escoamento ou fluxo descendente (*down-pumping*) (EEDP).

**Figura 2.7. Impelidor orelha de elefante ou *Elephant Ear* (EE): (a) configuração de escoamento descendente (*down-pumping*) e (b) configuração de escoamento ascendente (*up-pumping*).**



Fonte: Arquivo próprio

Devido à sua geometria, o padrão de escoamento produzido é simultaneamente radial e axial. Esta combinação provê uma melhor mistura e cria uma elevada transferência de massa de oxigênio ( $k_L a$ ) comparada a dos impelidores unidirecionais. Os quais são amplamente utilizados em processos de fermentação que envolve cultivos altamente viscosos, como

bactérias filamentosas (estreptomicetos) e fungos filamentosos. (MENISHER et al., 2000; SIMMONS et al., 2007; MIRRO e VOLL 2009, COLLIGNON et al., 2010).

Venkat e Chalmers (1996) realizaram estudos do padrão de escoamento gerado pelo impelidor EE na configuração de escoamento ascendente ou do inglês “*up-pumping*” (EEUP) utilizando a técnica de medida da velocidade por rastreamento de partículas 3D (3-D PTV). Os estudos foram realizados empregando marcadores de escoamento em reatores típicos de cultivos de células, considerando condições típicas de operação em cultivos de células animais ancoradas em microcarregadores.

Menisher et al. (2000) estudaram o tempo de mistura em sistema agitado com um impelidor similar ao EEUP, tendo como uma variante a borda dos ângulos das lâminas mostrando-se mais curvos, sendo designado “*Dumbo Ear*”, devido às suas três grandes lâminas. Foram obtidos baixos tempos de mistura, mas o consumo de potência foi maior devido ao tamanho das pás em comparação ao impelidor A310 (impelidor axial de três lâminas estreitas) nas mesmas frequências de rotação.

Simmons et al. (2007) compararam o desempenho do EEUP com outros impelidores, a partir de estudos de campos de velocidade, tempo de mistura, consumo de potência e distribuição da energia cinética, sem obter indícios do baixo cisalhamento imposto por este impelidor.

Zhu et al. (2009), fizeram uma análise dos impelidores EE em suas duas configurações, EEUP e EEDP sob condições com e sem aeração, considerando condições típicas de cultivos de célula animal. Considerou-se vazões específicas de ar ( $\phi_{ar}$ ) muito baixas, típicas nesses cultivos, bem como baixos níveis de agitação, como também um valor de  $\phi_{ar}=0,5$  vvm, valor típico em cultivo de bactérias. Foram avaliados parâmetros como a potência dissipada, número de potência, retenção gasosa, utilizando a técnica de medida da velocidade por análise de imagens de partículas (do inglês *PIV*), mostrando vantagens significativas do impelidor EEUP sobre o EEDP.

Collington et al. (2010) estudaram o desempenho do impelidor *Elephant Ear* no modo *down-pumping*, demonstrando o mesmo ser o mais indicado para cultivos envolvendo célula animal ancoradas em microcarregadores, quando é utilizada a mínima frequência de agitação, para se obter uma completa suspensão e homogeneização dos microcarregadores.

### 2.3. Demanda e transferência de oxigênio em bioprocessos

A solubilidade do oxigênio é baixa quando comparada à de outros nutrientes presentes nos meios de cultivo. Devido à presença de microrganismos aeróbios existe uma demanda crescente de oxigênio em bioprocessos em batelada e em batelada alimentada, devido ao crescimento e à respiração celular. Alguns dos principais fatores que influenciam a demanda de oxigênio (DO) são do tipo de microrganismo ou célula, a fase do crescimento, a velocidade de crescimento celular, assim como a concentração celular.

A DO em cultivos aeróbios é dada pelo produto entre a velocidade específica de respiração ( $Q_{O_2}$ ) e a concentração de células respirando ( $C_x$ ). O primeiro termo é qualitativo e depende do tipo do microrganismo e de seu estado metabólico, da composição do meio e das condições do cultivo (pH, temperatura, etc.). O segundo termo é quantitativo, ou seja, quanto maior a população, maior o consumo de oxigênio. A DO é expressa como:

$$DO = Q_{O_2} C_x \quad (2.1)$$

onde DO é a demanda de oxigênio ( $g_{O_2} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ),  $Q_{O_2}$  é a velocidade específica de respiração microbiana ( $g_{O_2} \cdot g_X^{-1} \cdot h^{-1}$ ),  $C_x$  é a concentração celular ( $g_X \cdot L^{-1}$ ).

O balanço de massa para o oxigênio tomando como volume de controle o caldo de cultivo é dado pela Equação (2.2):

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = N_{O_2} - Q_{O_2} C_x \quad (2.2)$$

onde  $N_{O_2}$  é a velocidade de transferência de oxigênio dada em  $g_{O_2} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ , definida como:

$$N_{O_2} = k_L a (C_s - C) \quad (2.3)$$

Onde  $C_s$  é a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial de oxigênio da fase gasosa ( $g_{O_2} \cdot L^{-1}$ ),  $C$  é a concentração do oxigênio na fase líquida ( $g_{O_2} \cdot L^{-1}$ ) e,  $k_L a$  é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $s^{-1}$ ).

Substituindo (2.3) em (2.2), tem-se que:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_s - C) - Q_{O_2} C_x \quad (2.4)$$

No caso de sistemas sem microrganismos é possível determinar o valor de  $k_L a$  sendo admitido que o valor de  $Q_{O_2} = 0$ , ou seja, sem microrganismos não se tem consumo de  $O_2$ . Pode-se, então, reescrever a Equação (2.4) da forma que segue:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_s - C) \quad (2.5)$$

Deve-se mencionar que o  $k_L a$  é definido como o produto de dois termos: o coeficiente convectivo de transferência de massa ( $k_L$ ) e a área interfacial de troca de massa ( $a$ ), dada pela relação entre a área total de troca de massa ou área total das bolhas ( $A_{bolhas}$ ) e o volume útil do biorreator ( $V$ ),  $a = A_{bolhas}/V$ . Ambos dependem de uma série de variáveis que podem ser agrupadas nas seguintes categorias:

- i. Propriedades físicas do líquido como a densidade, viscosidade dinâmica (parâmetros reológicos) e tensão superficial.
- ii. Difusividade da molécula de  $O_2$  no líquido.
- iii. Intensidade de agitação e vazão de alimentação de ar.

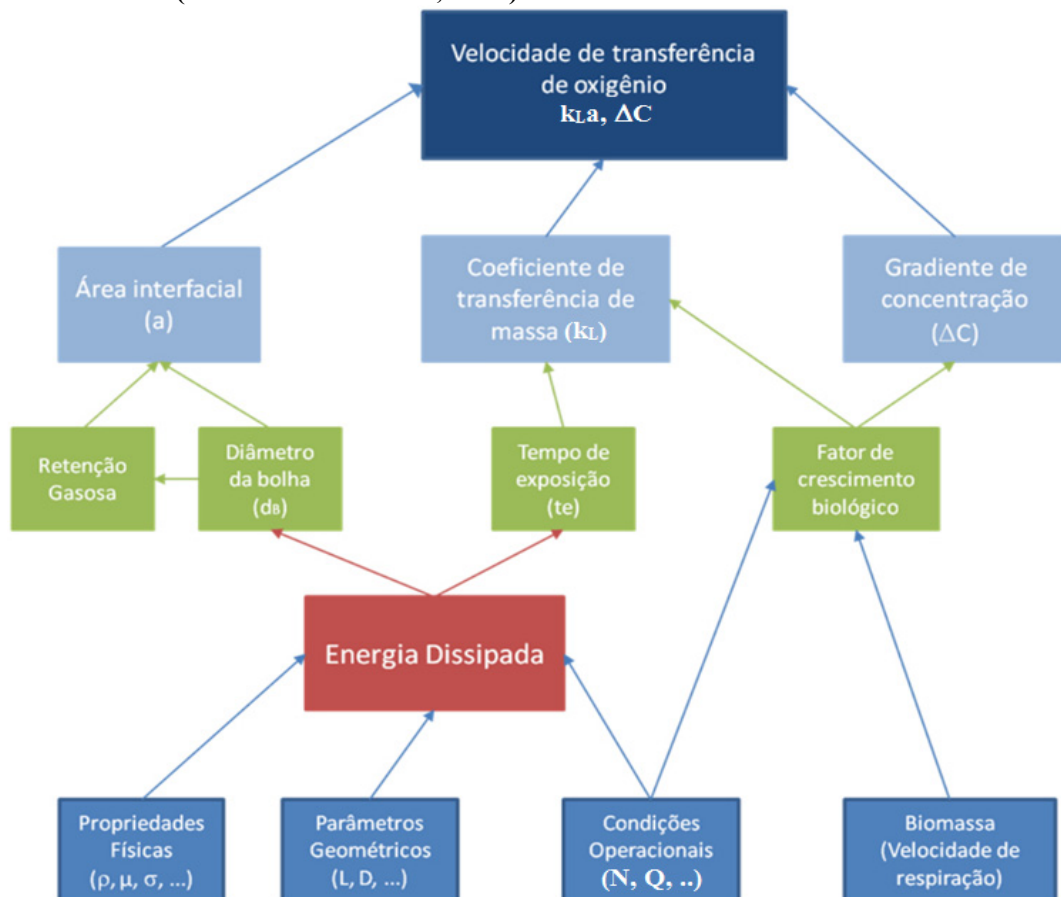
Em geral, as variáveis do grupo i) não afetam tanto o  $k_L a$ , quanto as variáveis dos grupos ii) e iii) (GARCIA OCHOA 2009). A Figura 2.8 ilustra a inter-relação entre parâmetros de transferência de oxigênio e hidrodinâmicos em cultivos (OCHOA e GOMEZ, 2009).

Desse modo, a fim de avaliar a transferência de oxigênio em biorreatores recorre-se a determinação do  $k_L a$ , sob as diferentes condições de operação e geometrias do sistema. Um aspecto crítico a ser considerado é o desenho do reator para alcançar altos valores de  $k_L a$ , o qual pode ser afetado por muitos fatores incluindo as características geométricas e operacionais do processo como a frequência de agitação, vazão de aeração, hidrodinâmica das fases líquida e gasosa, composição do meio de cultivo, tipo de célula e morfologia celular.



Manter uma adequada concentração de  $O_2$  no caldo de cultivo é de vital importância em bioprocessos aeróbios, assim a homogeneização e aeração do caldo de cultivo são alcançadas modificando os parâmetros de operação, tais como a frequência de rotação do agitador ( $N$ ), vazão específica da alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ) ou enriquecimento do ar com  $O_2$  puro (ROLLINS et al., 1988; GAVRILESCU, ROMAN e EFIMOV, 1993). Por exemplo, Zhu et al. (2001) foram capazes de aumentar a velocidade de transferência de  $O_2$  da fase gasosa para a líquida em até 17% com a troca do impelidor da configuração axial para radial. Puthli et al. (2005) verificaram que valores do  $k_L a$  são afetados pela configuração do impelidor, além da frequência de rotação, vazão de aeração, viscosidade do fluido num meio de fermentação simulado. Estes autores utilizaram em biorreator de 2 L com impelidores TR e *pitched blade* e como fluidos, água, soluções com diferentes concentrações de carboximetilcelulose e um meio de fermentação simulado. Os autores observaram que a utilização de três impelidores assegurou uma distribuição do gás mais uniforme aumentando os valores de  $k_L a$ .

**Figura 2.8. Relações entre parâmetros de transferência de oxigênio e hidrodinâmicos em cultivos em diversos níveis (OCHOA e GOMEZ, 2009).**



(fonte: adaptado de Cerri, 2009)

A agitação e a aeração em caldos fermentativos influenciam sob o produto  $k_L a$  de duas formas. Primeiramente, o  $k_L$  pode ser escrito como:

$$k_L \propto \frac{D_{O_2}}{\delta} \quad (2.6)$$

Onde  $D_{O_2}$  é a difusividade do oxigênio ( $m^2.s^{-1}$ ) através da película estagnada da fase líquida e  $\delta$  é a espessura da película estagnada da fase líquida.

Logo, a agitação e aeração atuam diminuindo a  $\delta$  e, de acordo com a Equação (2.6), aumentando o valor de  $k_L$ . A segunda forma é a fragmentação das bolhas de gás, resultando em um número maior de bolhas de menor diâmetro, ou seja, um considerável incremento na área interfacial de transferência de oxigênio (a) e, por consequência, no produto  $k_L a$ .

Em processos fermentativos que envolvem alta demanda de oxigênio, o  $k_L a$  se apresenta como um parâmetro de extrema importância no projeto, monitoração e aumento da escala dos fermentadores. Logo, faz-se necessário a utilização de métodos consistentes na determinação deste parâmetro (BADINO e SCHMIDELL, 2001). Por exemplo, o valor de  $k_L a$  pode ser incrementado quando se aumenta a concentração de íons na solução. Segundo Van Riet (1979), o  $k_L a$  em soluções iônicas é mais dependente da vazão de ar e da potência imposta por unidade de volume ( $P.V^{-1}$ ) que em água pura. Os valores de  $k_L a$  decrescem com o aumento da viscosidade do líquido, e incrementam com a temperatura e apresentam grandes decréscimos com a adição de substâncias surfactantes ou antiespumantes (GOGATE, BEENACKERS e PANDIT, 2000; GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2004). O surfactante pode formar uma camada na interface da bolha oferecendo resistência à passagem das moléculas do gás para o líquido (LINEK et al., 2005).

Em processos aeróbios convencionais, nos quais se podem incluir a produção de diversos antibióticos, vitaminas e enzimas, o suprimento de  $O_2$  é realizado por agitação e aeração contínua do caldo, onde os biorreatores estão providos de aspensor e impelidores. Onde a oxigenação é decisiva em cultivos envolvendo organismos aeróbios, já que o oxigênio se apresenta como um substrato essencial para o crescimento, manutenção e outras rotas metabólicas. Como a reoxidação de coenzimas que participam das reações de desidrogenação ao longo da glicólise, no ciclo de Krebs e no processo de produção de energia química, transformando as moléculas de ADP em moléculas de ATP, fundamental para o crescimento celular, síntese de produtos, transporte e outras atividades celulares (SCHMIDELL, 2001).

Devido à sua baixa solubilidade do oxigênio nesses caldos (normalmente soluções aquosas), o O<sub>2</sub> torna-se um nutriente limitante em cultivos com alta densidade celular quando comparado a outros nutrientes presentes em meios fermentativos. Esta limitação está associada em alguns casos à grande demanda de oxigênio (DO) provocada por altas velocidades globais de respiração celular. No caso de limitação por O<sub>2</sub>, o crescimento celular e a formação do produto serão afetados severamente. Por exemplo, concentrações de O<sub>2</sub> dissolvido em torno de 10 mg.L<sup>-1</sup>, comuns nos meios de cultivo, chegam a ser de 1000 a 10000 vezes menores que as concentrações de outros componentes do meio como a glicose (BAILEY e OLLIS, 1986).

A DO é um parâmetro comumente empregado para quantificar o estado fisiológico de uma cultura aeróbica, devido ao fato que a maioria das atividades metabólicas depende do consumo de O<sub>2</sub>. Nesse sentido, a concentração de O<sub>2</sub> dissolvido em caldos de cultivo depende da velocidade de transferência de O<sub>2</sub> do gás para a fase líquida (N<sub>O<sub>2</sub></sub>) e da sua demanda pelas células durante o desenvolvimento de bioprocessos, tal como expressa a Equação (2.1). N<sub>O<sub>2</sub></sub> é influenciada por vários parâmetros como propriedades físicas do gás e do líquido, condições operacionais, parâmetros geométricos do biorreator e a concentração ideal de O<sub>2</sub> dissolvido (PAVLOV, 2005). Portanto, nesses processos é indispensável o conhecimento da velocidade de transferência de oxigênio (N<sub>O<sub>2</sub></sub>) para projeto e aumento de escala de biorreatores.

Rollins et al. (1988) relatam que alta transferência de oxigênio durante a fase de crescimento exponencial em cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, pode melhorar a produção da cefamicina C, um antibiótico β-lactâmico de grande importância comercial. A velocidade de formação de produto está relacionada com a quantidade de cada enzima presente na rota biossintética. Posteriormente Rollins et al. (1990.), observaram maiores expressões das enzimas isopenicilina N sintase (IPNS) e a deacetoxicefalosporina sintase (DAOCS) atuantes na rota metabólica desse composto β-lactâmico, em condição de saturação de oxigênio.

Rollins, Jensen e Westlake (1991) observaram que em cultivos de *S. clavuligerus*, a atividade da aminoadipil-cisteinil-valina sintetase (ACVS) surge durante a fase inicial de rápido crescimento celular. No mesmo período, o conteúdo do oxigênio dissolvido (OD) do meio foi totalmente consumido. Em níveis elevados de OD, os níveis intracelulares do tripeptídeo aminoadipil- cisteinil-valina (ACV) diminuem devido à perda de atividade de ACVS durante a fase de não crescimento, devido principalmente à melhoria da conversão do tripeptídeo ACV ao intermediário penicilina N, isto é, à condensação do anel de cinco

membros e posteriormente à expansão desse anel para um anel de seis membros favorecendo a produção de cefamicina C.

## **2.4. Métodos para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio – ( $k_L a$ )**

Os métodos para determinação de  $k_L a$  em biorreatores são basicamente três, podendo-se apresentar adaptações em caso de serem medidas em cultivos de células.

### **2.4.1. Método de oxidação do sulfito de sódio (MS)**

Metodologia clássica proposta por Cooper, Fernstrom e Miller (1944), este método baseia-se na rápida reação de sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), considerado um agente redutor, com o oxigênio dissolvido no meio formando sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), na presença de um catalisador (usualmente um cátion bivalente de cobre  $\text{Cu}^{++}$  ou cobalto  $\text{Co}^{++}$ ).

A concentração de oxigênio dissolvido é medida por um eletrodo acoplado ao analisador de  $\text{O}_2$  e é registrada até que todo o sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) seja oxidado a sulfato ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Conhecendo-se o tempo de reação e a quantidade de sulfito adicionado pode-se calcular a velocidade média de transferência de oxigênio para a fase líquida e, portanto, o  $k_L a$ . A estequiometria da reação entre o sulfito de sódio e o oxigênio é mostrada a seguir:



No entanto, este método apresenta uma limitação devido ao fato das propriedades físico-químicas da solução são muito diferentes nos caldos de fermentação, alterando a hidrodinâmica da solução e outras propriedades como o tamanho da bolha (meio não coalescente). Essas mudanças podem resultar em altos valores de  $k_L a$ , bem diferentes daqueles obtidos em caldos de fermentação (meio não coalescente) (GARCIA-OCHOA e GOMES, 1998).

### 2.4.2. Método dinâmico – (MD)

É um método baseado nas medidas da concentração do oxigênio dissolvido no meio durante um ensaio degrau. Inicialmente, o oxigênio é desorvido da fase líquida no biorreator através do borbulhamento de nitrogênio no meio líquido. Após atingir concentração de  $O_2$  igual à zero, a vazão de nitrogênio é interrompida e imediatamente inicia-se aeração do meio líquido com uma vazão conhecida de ar ou de oxigênio. O valor de  $k_La$  é obtido pelo ajuste da Equação (2.8) aos dados experimentais de concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, considerando o atraso da resposta do eletrodo de oxigênio dissolvido.

$$C_e = C_{e_0} \cdot e^{-k_e \cdot (t-t_0)} + C_{e_s} \cdot (1 - e^{-k_e \cdot (t-t_0)}) + \frac{k_e \cdot (C_{e_s} - C_{e_0})}{k_e - k_La} \cdot (e^{-k_e \cdot (t-t_0)} - e^{-k_La \cdot (t-t_0)}) \quad (2.8)$$

### 2.4.3. Método do degrau da pressão – (MP)

Nesse método também dinâmico, a mudança na concentração de oxigênio é induzida através de mudança (pequeno degrau) na pressão no biorreator, sendo o valor de  $k_La$  obtido da mesma forma que no MD. Linek et al. (1989), propuseram originalmente esse método para medir o  $k_La$  em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 18,2 L. A confiabilidade do método proposto foi testada comparando-se os resultados com aqueles gerados pelo método dinâmico tradicional (MD) e pelo método da oxidação do sulfito de sódio (MS). Os autores verificaram que valores de  $k_La$  medidos pelo MD e o MS se mostraram semelhantes, utilizando água como fluido coalescente. Entretanto, o mesmo não foi determinado para fluidos não coalescentes (solução 0,5 M de  $Na_2SO_4$ ), com e sem adição de 1% m/v de CMC. Estas observações demonstraram que o MP é confiável para valores de  $k_La \leq 0,4s^{-1}$ . Para valores maiores de  $k_La$ , o MP foi comparado ao MS e verificou-se uma boa concordância entre os valores encontrados pelos dois métodos. Além disso, Linek et al. (1989) verificaram que o MP é apropriado para reatores em larga escala desde que a variação de pressão fosse suficientemente pequena. Por outro lado, segundo Carbajal (2003), os valores de  $k_La$  utilizando o MD foram menores em comparação com os valores obtidos pelo MP, onde o MP mostrou-se mais sensível às condições hidrodinâmicas no interior do biorreator.

## 2.5. Correlações para a determinação do $k_La$

Em biorreatores tipo tanque agitado, o agitador é a principal ferramenta na dispersão gasosa. Assim como a velocidade de agitação e o desenho têm um pronunciado efeito sobre a transferência de massa. Desta maneira, vários autores desenvolveram correlações empíricas tanto dimensionais como adimensionais para correlacionar o  $k_La$ .

O  $k_La$  se relaciona com diferentes parâmetros, tais como:

- Parâmetros geométricos: tipo e tamanho de biorreator, tipo, dimensões e número de impelidores e volume do caldo ( $V$ ).
- Propriedades físico-químicas de soluções Newtonianas e não-Newtonianas: densidade ( $\rho$ ), viscosidade ( $\mu$ ) do líquido, comportamento reológico e características coalescentes do sistema.
- Variáveis de operação: consumo de potência ( $P$ ), velocidade superficial do gás ( $v_s$ ), frequência de rotação do impelidor ( $N$ ) (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 1998; GOGATE, BEENACKERS e PANDIT, 2000; CAMPESI et al., 2009).

Algumas dessas correlações são apresentadas a seguir.

A primeira correlação para o cálculo de  $k_La$  proposta por Cooper, Fernstrom e Miller (1944) não considera as dimensões do sistema. O modelo relaciona o  $k_La$  com o consumo de potência, assim para o sistema gaseificado por unidade de volume do meio ( $Pg.V^{-1}$ ) e com a velocidade superficial do gás ( $v_s$ ) da forma que segue:

$$k_La = K_1 \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^{a_1} \cdot v_s^{b_1} \quad (2.9)$$

A velocidade superficial ( $v_s$ ) é dada pela razão entre a vazão específica de ar ( $\phi_{ar}$ ) e a área de seção do tanque ( $a$ ),  $v_s = \phi_{ar}/A$ . As constantes  $K_1$ ,  $a_1$  e  $b_1$  variam com a geometria do sistema e com as características reológicas do fluido e com faixa das variáveis de operação empregada. Embora essa correlação tenha sido desenvolvida para fluidos diferentes de caldos de fermentação, este tipo de correlação tem sido empregado com sucesso em sistemas fermentativos (BADINO e SCHMIDELL, 2001).

Ryu e Humphrey (1972), trabalhando com caldos de fermentação para a produção de penicilina, observaram que a viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) influenciava o  $k_La$  e propuseram a seguinte correlação:

$$k_La = K_2 \cdot \left(\frac{P_g}{V}\right)^{a_2} \cdot v_s^{b_2} \cdot \mu_{ap}^{c_2} \quad (2.10)$$

Da mesma forma que na correlação proposta por Cooper, Fernstrom e Miller (1944), as constantes  $K_2$ ,  $a_2$ ,  $b_2$  e  $c_2$  dependem da geometria do sistema e da faixa das variáveis de operação. Embora de natureza simples, a correlação proposta por Ryu e Humphrey (1972) apresenta uma capacidade de ajuste da mesma ordem que outras correlações de natureza bem mais complexa como as baseadas na técnica de análise dimensional.

Zlokarnik (1978) sugere uma correlação que prevê a dependência do  $k_La$  com os parâmetros geométricos do sistema, propriedades físico-químicas do fluido e das condições de operação. Sua proposta se baseia na análise dimensional. A correlação proposta é dada pela seguinte equação:

$$k_La \cdot \left(\frac{Q}{V_m}\right)^{-1} = 0,30 \cdot \left[\left(\frac{P_{gm}}{Q}\right)^*\right]^{0,35} \cdot Sc^{-0,30} \cdot \left(\frac{\sigma}{\sigma_w}\right)^{-0,50} \quad (2.11)$$

onde:

$$\left(\frac{P_{gm}}{Q}\right)^* = \left[\frac{\left(\frac{P_{gm}}{Q}\right)}{\left(\rho \cdot (g \cdot \mu_{ap})^{2/3}\right)}\right] \quad (2.12)$$

onde  $V_m$  é o volume de líquido dividido pelo número de impelidores,  $P_{gm}$  é a potência transmitida por cada impelidor (W),  $Sc$  é o número de Schmidt (adimensional),  $Q$  é a vazão de alimentação de ar ( $m^3 \cdot s^{-1}$ ),  $\sigma$  é a tensão superficial do meio ( $N \cdot m^{-1}$ ) e  $\sigma_w$  é a tensão superficial da água ( $N \cdot m^{-1}$ ),  $\rho$  é a densidade do meio ( $kg \cdot m^{-3}$ ) e  $g$  é a aceleração da gravidade ( $m \cdot s^{-2}$ ).

O número de Schmidt ( $Sc$ ) é definido como:

$$Sc = \frac{v_{ap}}{D_{O_2}} \quad (2.13)$$

Onde  $v_{ap} = \mu_{ap} / \rho$  é a viscosidade cinemática aparente ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ).

A correlação proposta por Zlokarnik (1978) apresenta uma particularidade que a difere das outras correlações até aqui comentadas. O fato de a variável  $P_{gm}$  representar o consumo de potência por impelidor possibilita o uso desta correlação em sistemas com múltiplos impelidores e, portanto, com diferentes geometrias.

Campesi, (2009) propões correlações para determinar valores de  $k_L a$  para soluções Newtonianas (água e glicerol), que foram correlacionadas com a frequência de rotação do impelidor (N) e com a viscosidade dinâmica ( $\mu$ ) para vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ) de 0,50 e 1,0 vvm.

Para  $\phi_{ar} = 0,50$  vvm:

$$k_L a = 5,60 \times 10^{-4} \cdot N^{0,818} \cdot \mu^{-0,348} \quad (R^2 = 0,996) \quad (2.14)$$

Para  $\phi_{ar} = 1,00$  vvm:

$$k_L a = 4,50 \times 10^{-4} \cdot N^{0,823} \cdot \mu^{-0,404} \quad (R^2 = 0,993) \quad (2.15)$$

Valores de  $k_L a$  também foram também correlacionados com N e com o índice de consistência K de fluidos não-Newtonianos (soluções de goma xantana) da forma que segue para  $\phi_{ar}$  de 0,50 e 1,0 vvm, respectivamente:

$$k_L a = 8,82 \times 10^{-4} \cdot N^{1,285} \cdot K^{-0,136} \quad (R^2 = 0,995) \quad (2.16)$$

$$k_L a = 7,71 \times 10^{-4} \cdot N^{1,372} \cdot K^{-0,158} \quad (R^2 = 0,992) \quad (2.17)$$

Tais correlações foram utilizadas para calcular a velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ).

### 2.5.1. Coeficiente de transferência de massa – ( $k_L$ )

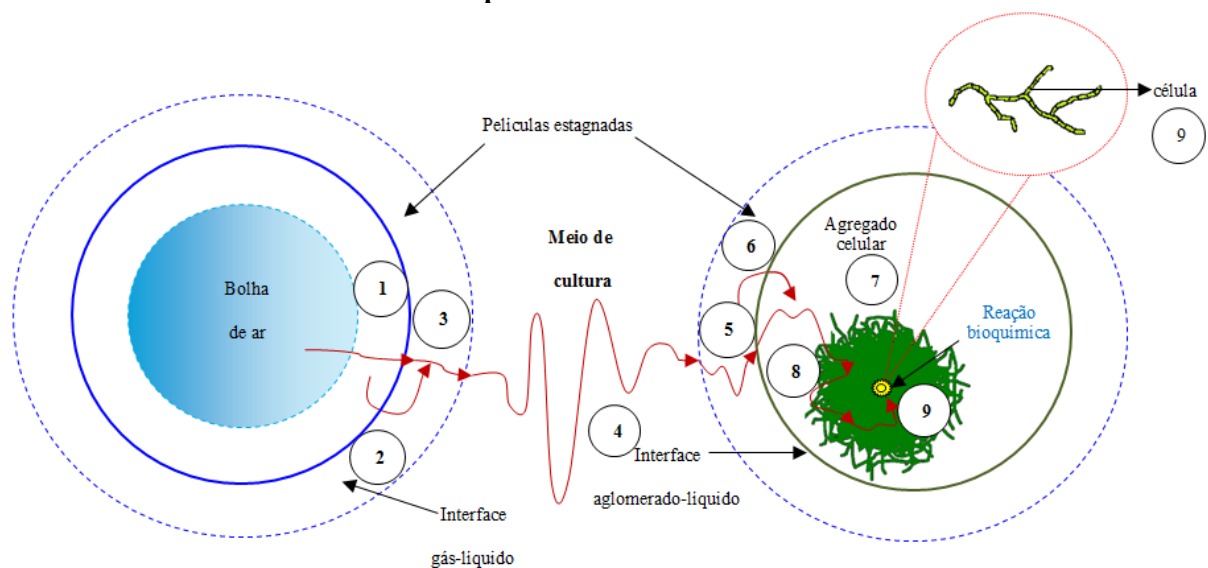
Durante os bioprocessos aeróbicos o  $O_2$  é transferido desde o seio da bolha de gás para a fase líquida chegando ao interior da célula onde é utilizado na fosforilação oxidativa para a



geração de ATP. De acordo com Moo Young (1985), a resistência global desta transferência de  $O_2$  e igual à soma das resistências individuais e suas magnitudes dependem das hidrodinâmicas das bolhas e da fase líquida, da composição e reologia do caldo fermentativo, da concentração e da atividade celular. Isto pode ser representado por uma série de resistências conforme detalhado em Bailey e Ollis (1986), esquematizado na Figura 2.9, sendo conhecido que resistência da película do líquido em torno da bolha é a que controla a velocidade de transferência de oxigênio.

No caso de cultivos de bactérias ou fungos filamentosos, a transferência de  $O_2$  enfrenta resistências físicas, devido à geração de caldos cada vez mais viscosos no transcórre do cultivo.

**Figura 2.9. Representação esquemática de resistências associadas à transferência de oxigênio desde o seio da bolha até seu consumo pela célula.**



(fonte: adaptado de BAILEY e OLLIS, 1986)

Na película de líquido a resistência à transferência de  $O_2$  é dada pelo inverso do coeficiente convectivo de transferência de  $O_2$  ( $k_L$ ), sendo que este parâmetro pode ser estimado por diferentes equações, muitas destas empíricas (CALDERBANK e MOO-YOUNG, 1961) e outras baseadas em fundamentos teóricos com diferentes abordagens (KAWASE et al., 1987; ZHANG e THOMAS, 1996).

Na literatura há três teorias clássicas que procuram explicar como ocorre a transferência de massa da fase gasosa para a fase líquida, representadas pelos seguintes modelos:

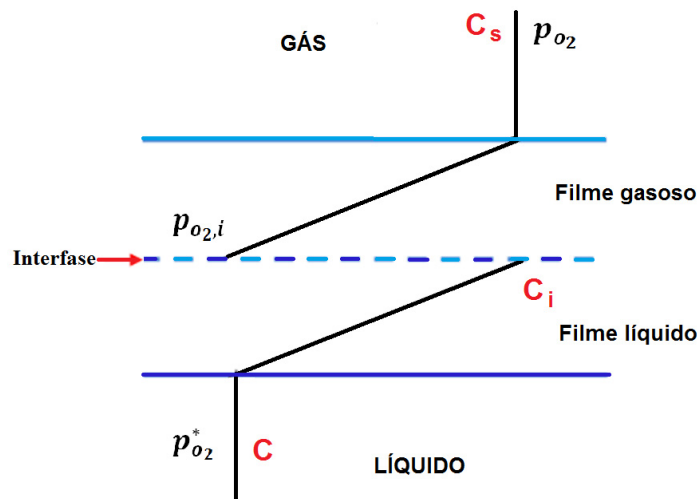
### 2.5.1.1. Modelo da teoria de duas películas

O modelo mais simples e mais antigo de transferência de massa gás-líquido, proposto por Lewis e Whitman (1924), baseia-se no conceito de uma interface rígida e dois filmes estagnados. Um filme gasoso e outro líquido, junto criam a interface gás-líquido e considera-se que a transferência de massa ocorra apenas por difusão (Figura 2.9).

Nesse processo são consideradas três etapas:

- O transporte do  $O_2$  do seio da bolha de ar até a interface.
- A difusão do  $O_2$  através da interface gás – líquido.
- O transporte do  $O_2$  da interface até o seio do líquido.

**Figura 2.9.** Representação esquemática da interface gás-líquido na transferência de  $O_2$  para oxigenação de um meio líquido.



A maneira mais simples para definir estas relações é pela lei de Henry para concentração de oxigênio dissolvido em soluções saturadas:

$$C_i = H_e p_{O_2,i} \quad (2.18)$$

$$C = H_e p_{O_2}^* \quad (2.19)$$

$$C_s = H_e p_{O_2} \quad (2.20)$$

Onde  $C_i$  é a concentração do oxigênio dissolvido em equilíbrio na interface gás-líquido (em  $g_{O_2}.m^{-3}$ ),  $C$  é a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida (em  $g_{O_2}.m^{-3}$ ),  $C_s$  é a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida (em  $g_{O_2}.m^{-3}$ ) em equilíbrio com a

pressão parcial de oxigênio da fase gasosa ( $p_{O_2}$ ),  $p_{O_2,i}$  é a pressão parcial do oxigênio na interface gás-líquido (em atm),  $p_{O_2}^*$  é a pressão parcial de oxigênio em equilíbrio com a concentração de oxigênio dissolvido da fase líquida ( $C$ ) segundo a lei de Henry dada (em atm),  $p_{O_2}$  é a pressão parcial de oxigênio na fase gasosa (em atm) e  $H_e$  é a constante de Henry dada em ( $g_{O_2} \cdot m^{-3} \cdot atm^{-1}$ ).

O fluxo de oxigênio ( $n_{O_2}$ ) em  $g_{O_2} \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$  desde o seio da bolha de ar até o meio líquido é definido como:

$$n_{O_2} = \frac{\textit{gradiente}}{\textit{resistência}} \quad (2.21)$$

onde o gradiente é a força motriz que provoca a transferência de massa ( $O_2$ ) no filme líquido e a resistência é o inverso do coeficiente convectivo de transferência de massa. Os fatores que afetam este gradiente incluem a solubilidade e a atividade metabólica. A solubilidade do gás ( $C_s$ ), em soluções eletrolíticas é usualmente menor que a solubilidade em água pura. É dependente da temperatura, da pressão, da concentração, dos tipos de sais presentes e das reações químicas.

No estado estacionário, o fluxo de oxigênio (em unidade de massa ou mol por unidade de área por unidade de tempo,  $g_{O_2} \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ ) é constante e igual, na película estagnada de gás e na película estagnada de líquido. Logo, pode-se escrever que:

$$n_{O_2} = k_G \cdot H_e \cdot (p_{O_2} - p_{O_2,i}) = k_L \cdot (C_i - C) \quad (2.22)$$

Onde  $k_G$  é o coeficiente convectivo de transferência de massa da película gasosa ( $m \cdot h^{-1}$ ).

No entanto, não é possível quantificar o fluxo de oxigênio pela Equação (2.22), pois não é possível realizar as medidas de pressão parcial e de concentração de oxigênio dissolvido na interface ( $p_{O_2,i}$  e  $C_i$ ). Portanto, é mais conveniente definir o  $n_{O_2}$  com base nos coeficientes globais de transferência de massa e nas forças motrizes globais para a fase gasosa e líquida. Logo se tem que:

$$n_{O_2} = K_G \cdot H_e \cdot (p_{O_2} - p_{O_2,i}^*) = K_L \cdot (C_s - C) \quad (2.23)$$

Em virtude da intensa movimentação das moléculas de gás, a resistência à transferência de massa na fase gasosa pode ser considerada desprezível e, portanto, toda a resistência à transferência de oxigênio se deve à película estagnada da fase líquida (BADINO e SCHMIDELL, 2001), ou seja,  $K_G \gg K_L$  e  $K_L \cong k_L$ . Logo, pode-se escrever que:

$$n_{O_2} = k_L \cdot (C_s - C) \quad (2.24)$$

Multiplicando-se o  $n_{O_2}$  pela área interfacial de troca de massa ( $a$  em  $m^{-1}$ ), dada pela área superficial das bolhas por unidade de volume de líquido, define-se a velocidade de transferência de oxigênio ( $N_{O_2}$  em  $g_{O_2}.m^{-3}.h^{-1}$ ). Assim obteremos a seguinte expressão:

$$n_{O_2} \cdot a = N_{O_2} = k_L \cdot a(C_s - C) \quad (2.25)$$

onde o produto  $n_{O_2} \cdot a$  é a velocidade de transferência de oxigênio ( $N_{O_2}$ ).

Devido à dificuldade de medir “ $k_L$ ” e “ $a$ ” separadamente, usualmente determina-se o produto  $k_L a$  e este parâmetro é o chamado coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, caracterizando o transporte do  $O_2$  do gás para o líquido, com dimensão expressa como o inverso do tempo.

### **2.5.1.2. Modelo da teoria de penetração de Higbie**

Modelo baseado numa interface onde a renovação da superfície ocorre através do deslocamento do líquido nessa interface o qual é comumente aceito na descrição da transferência gás-líquido (KAWASE et al., 1987; GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2004). Quando uma bolha de gás se movimenta através de um líquido, ela cria continuamente uma nova área interfacial em seu avanço. No intervalo de fixação, a ponta de avanço pode criar um redemoinho (turbilhão) de líquido na interface gás-líquido nesse instante existe uma transferência de soluto pela difusão molecular. Pode-se assumir que essa difusão é não estacionária na interface gás-líquido durante o tempo de contato ou de exposição para a transferência de massa ( $t_c$ ). A Equação 2.26 é escrita, baseada no modelo proposto:

$$k_L = 2 \cdot \sqrt{\frac{D_L}{\pi \cdot t_e}} \quad (2.26)$$

onde  $D_L$  é o coeficiente de difusão na camada. É bem conhecido que  $k_L$  depende da intensidade da turbulência expressa em função da energia dissipada (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2004).

### 2.5.1.3. Teoria da renovação de superfície

Utiliza uma combinação de conceitos do modelo da teoria de duas películas e do modelo da teoria de penetração de Higbie, apresentadas previamente. A velocidade de renovação da superfície é consideravelmente alta em comparação às bolhas livres sob o fluxo potencial (FIGUEREDO e CALDERBANK, 1979). Como consequência, o resultado experimental mostra que o tempo de exposição é afetado pelo micro-redemoinho (micro-turbilhão) ou pela turbulência na escala microscópica. Assim a taxa dissipação de energia no líquido por unidade de massa ( $\varepsilon$ ) é a magnitude mais adequada para caracterizar a escala de tempo. O tempo de exposição ( $t_e$ ) que caracteriza o tempo de residência dos micro-turbilhões na interface é geralmente desconhecido, mas pode ser estimado por um modelo adequado. A avaliação deste tempo pode ser realizada de acordo com a teoria de Kolmogorov da turbulência isotrópica, como a taxa entre dois parâmetros característicos de turbilhões, ou seja, o comprimento do micro-turbilhão ( $\eta$ ) e a flutuação de velocidade ( $u$ ). Ambos os parâmetros dependem da velocidade de dissipação de energia ( $\varepsilon$ ) e da viscosidade cinemática do líquido ( $\nu$ ) de acordo com a equação que segue:

$$\eta = \left( \frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (2.27)$$

$$u = (\nu \cdot \varepsilon)^{\frac{1}{4}} \quad (2.28)$$

O tempo de exposição é geralmente considerado como o tempo em que as bolhas levam para percorrer um comprimento igual ao seu diâmetro e é estimado usando a razão entre o comprimento do micro-turbilhão e a flutuação da velocidade de Kolmogorov.

## 2.6. Tamanho de bolha e área interfacial em biorreatores

A partir do tamanho médio das bolhas ( $D_B$ ) e da retenção gasosa ou *hold-up* ( $\varepsilon_G$ ) pode ser calculada a área interfacial (OCHOA e GOMEZ, 2009). Assumindo que as bolhas são perfeitamente esféricas, pode-se escrever que como a Equação 2.29:

$$a = 6 \cdot \varepsilon_G / d_B \quad (2.29)$$

Por outro lado, a área interfacial pode ser aumentada pela formação de pequenas bolhas ou pelo incremento do número de bolhas. Para um dado volume do gás, uma maior área interfacial ( $a$ ) é obtida se o gás é disperso em pequenas ao invés de grandes bolhas. A área interfacial específica está fortemente relacionada com o desenho geométrico e hidrodinâmica no biorreator. As propriedades do meio também afetam significativamente o tamanho das bolhas e a coalescência e, portanto, a área interfacial (OCHOA e GOMEZ, 2009; OBENG e KRESTA, 2003). A presença de solutos na fase líquida pode afetar a transferência de massa, alterando as propriedades físico-químicas da fase líquida, perturbando o comportamento da coalescência e o tamanho das bolhas. Em líquidos coalescentes (água e líquidos viscosos), a colisão entre as bolhas conduz à formação de bolhas grandes, reduzindo a área interfacial. Com o incremento da viscosidade, só os micro-turbilhões com energia suficiente podem penetrar através da camada limite e a resistência à transferência de massa aumenta.

A velocidade de agitação e a intensidade da mistura desempenham um papel importante na quebra das bolhas. Como mencionado, o desenho mecânico do biorreator afeta a dispersão dos gases, o *hold-up* e o tempo de residência das bolhas. Como foi mencionado, são utilizadas hastes defletoras ou chicanas (*baffles*) para criar turbulência e cisalhamento que podem quebrar as bolhas (OBENG e KRESTA, 2003).

### 2.6.1. Retenção gasosa (*hold-up*)

Retenção gasosa é definida como a fração volumétrica do gás, no volume total da dispersão gás-líquido presente no biorreator e é chamado de retenção gasosa global ( $\varepsilon_G$ ) (CHISTI, 1989):

$$\varepsilon_G = \frac{V_G}{V_G + V_L} \quad (2.30)$$

Onde  $V_G$  é o volume do gás e  $V_L$  é o volume do líquido. A retenção gasosa determina o tempo de residência do gás no líquido e, em combinação com o  $d_B$ , controla a área interfacial específica gás-líquido por onde ocorre o transporte de massa.

A adição de eletrólitos incrementa a retenção gasosa (*hold-up*), devido ao decréscimo do tamanho da bolha e o efeito da coalescência a baixas ou altas pressões (GOGATE, BEENACKERS e PANDIT, 2000; PUTHLI et al., 2005).

## 2.7. Cisalhamento em biorreatores

O cisalhamento, também denominado gradiente de deformação ou esforço cortante, é o esforço interno resultante das tensões paralelas à secção transversal de um objeto mecânico.

Analisando a deformação mecânica existem três tipos de forças de deformação conhecidas:

- Forças compressivas: que apertam e encurtam um corpo.
- Forças extensionais: que provocam o estiramento, ou seja, tendem a romper um corpo.
- Forças de cisalhamento: empurram cada um dos lados do corpo em direções opostas.

De acordo com “lei de Newton da viscosidade” dada pela Equação (2.31), a viscosidade dinâmica é o coeficiente de proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) e a gradiente de velocidade ( $\dot{\gamma}$ ):

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (2.31)$$

ou

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (2.32)$$

onde  $\tau$  é a tensão de cisalhamento (*shear stress*) (em  $\text{N.m}^{-2}=\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-2}$ ),  $\mu$  é a viscosidade dinâmica do líquido em (em  $\text{Pa.s}=\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) e  $\dot{\gamma}$  é o gradiente da velocidade, taxa ou

velocidade de cisalhamento (*shear rate*), dada a soma das variações das velocidades do fluido com as direções axial, radial e angular.

A viscosidade de um fluido Newtoniano é independente da velocidade de cisalhamento e da tensão de cisalhamento, no entanto, ambas dependem da temperatura, composição, pH e outros parâmetros físico-químicos (CHARLES e WILSON, 1994). No caso de fluidos não-Newtonianos, a relação entre a  $\tau$  e  $\dot{\gamma}$  não é linear.

No caso de fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos e dilatantes, o modelo matemático que descreve seus comportamentos é dado pela equação da Lei de Potência:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (2.33)$$

Sendo que “n” pode variar da seguinte maneira:

$n < 1$ : para fluido pseudoplásticos.

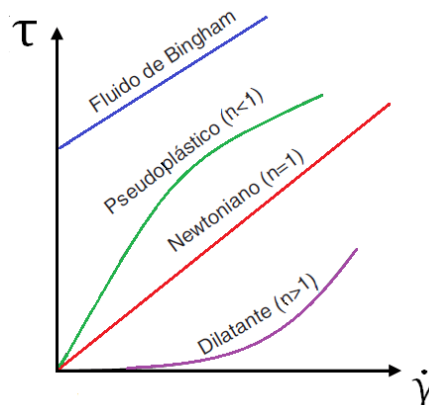
$n > 1$ : para fluido dilatante.

No caso de  $n = 1$ , a Equação (2.33) é a própria equação da Lei de Newton, sendo nesse caso  $K = \mu$ .

Porém, não são todos os fluidos que apresentam esse tipo de comportamento quando expostos as mesmas condições de cisalhamento. Durante um procedimento fermentativo é possível ocorrerem alterações muito significativas no caldo, podendo este passar à condição de fluido não-Newtoniano. Um bom exemplo para esse caso são os processos que envolvem o cultivo de bactérias e fungos filamentosos (SCHMIDELL, 2001).

A Figura 2.10 ilustra alguns reogramas ( $\tau$  em função de  $\dot{\gamma}$ ) para diferentes fluidos, incluindo os Newtonianos.

**Figura 2.10. Reogramas de fluidos**

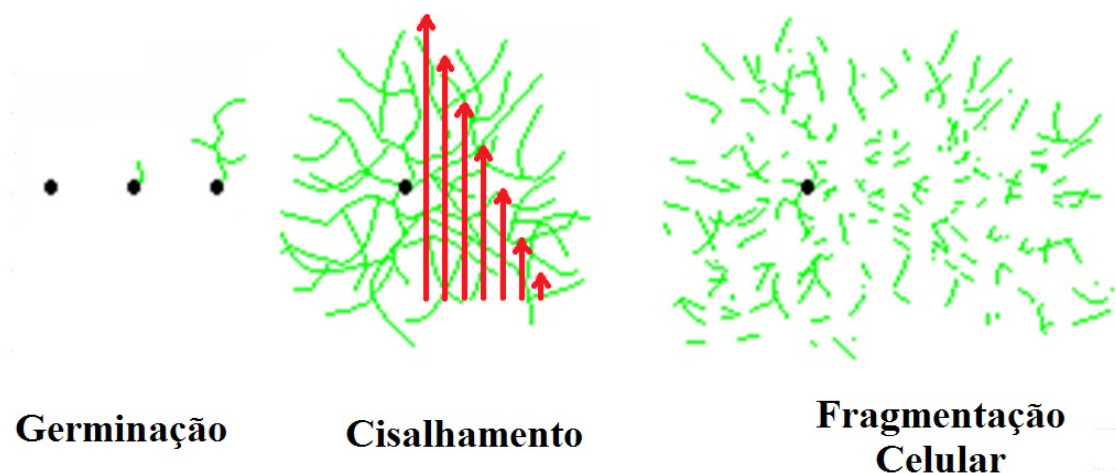




Em processos bioquímicos, a velocidade de cisalhamento imposta ao meio reacional é um importante parâmetro no projeto e operação de biorreatores. O cisalhamento é considerado na literatura como um elemento destrutivo que, em excesso pode resultar em danos às células, levando à perda de viabilidade, gerando mudanças morfológicas, fisiológicas e metabólicas irreversíveis às células, até mesmo a ruptura e induzindo a morte celular.

Este dano por cisalhamento para microrganismos filamentosos é ilustrado na Figura 2.11, considerando-se regime laminar de escoamento, pode ser observado que a diferença dos módulos dos vetores de velocidade pode gerar a fragmentação dos micélios. A reologia do cultivo pode também ser alterada pela alta velocidade de cisalhamento (OH et al., 1991, MEIJER et al., 1993; JÜSTEN et al., 1996; CONTRERAS et al., 1999, CHISTI, 2001).

**Figura 2.11. Consequência da exposição de um microrganismo filamentososo ao alto cisalhamento.**



Durante cultivos, algumas bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem ser relativamente tolerantes a um ambiente exposto a altas condições de cisalhamento em comparação a cultivos de células de tecidos animal vegetal que são delicadas e requerem geralmente ambientes com condições de cisalhamento bem mais brandas. Segundo Engler e Robinson (1981) são consideradas as células mais sensíveis à fragmentação pelo cisalhamento na seguinte ordem:

**NÍVEL DE CISALHAMENTO**

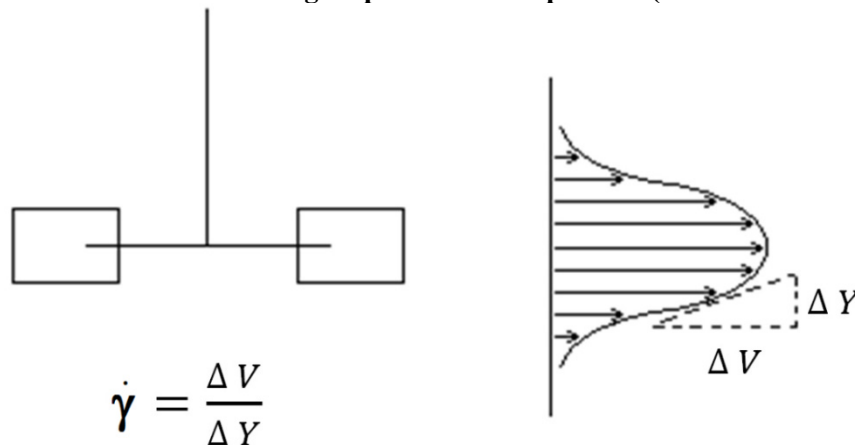
*MO Gram-negativos* > *MO Gram-positivos* > *fungos (levedura)*

A elevada sensibilidade do microrganismo (MO) ou da célula ao cisalhamento é devido a dois fatores: cisalhamento hidrodinâmico gerado pelo impelidor e às condições de cisalhamento por borbulhamento de ar. Isto implica em certos cuidados quanto à forma de fornecimento de O<sub>2</sub>, assim como ao tipo e grau de agitação que serão utilizados no cultivo. Deve ser considerada uma regulação do ambiente hidrodinâmico que forneça as melhores condições de agitação e aeração e, que, no entanto, não provoquem danos significativos para às células (MEIJER et al., 1993).

### 2.7.1. Cisalhamento hidrodinâmico gerado pelo impelidor

Em biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado, a velocidade de cisalhamento varia com a frequência de rotação do agitador (N) (CHISTI, 2001). Para o impelidor tipo turbina com pás planas, a velocidade de cisalhamento (considerando regime laminar) é máxima próxima à ponta do impelidor, diminuindo à medida que se distancia deste, conforme é observado na Figura 2.12 (HO e OLDSHUE, 1987).

**Figura 2.12. Perfil de velocidade na região próxima ao impelidor. (HO e OLDSHUE, 1987).**



Para células sensíveis ao cisalhamento, reduzir a velocidade de agitação do impelidor para minimizar a velocidade de cisalhamento seria uma solução. No entanto, uma baixa velocidade de cisalhamento implica uma baixa transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, notadamente em fermentações aeróbicas cujo crescimento celular eleva a demanda de oxigênio do processo e simultaneamente a viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) do caldo. Com uma baixa transferência de oxigênio, o crescimento será limitado, assim como a própria

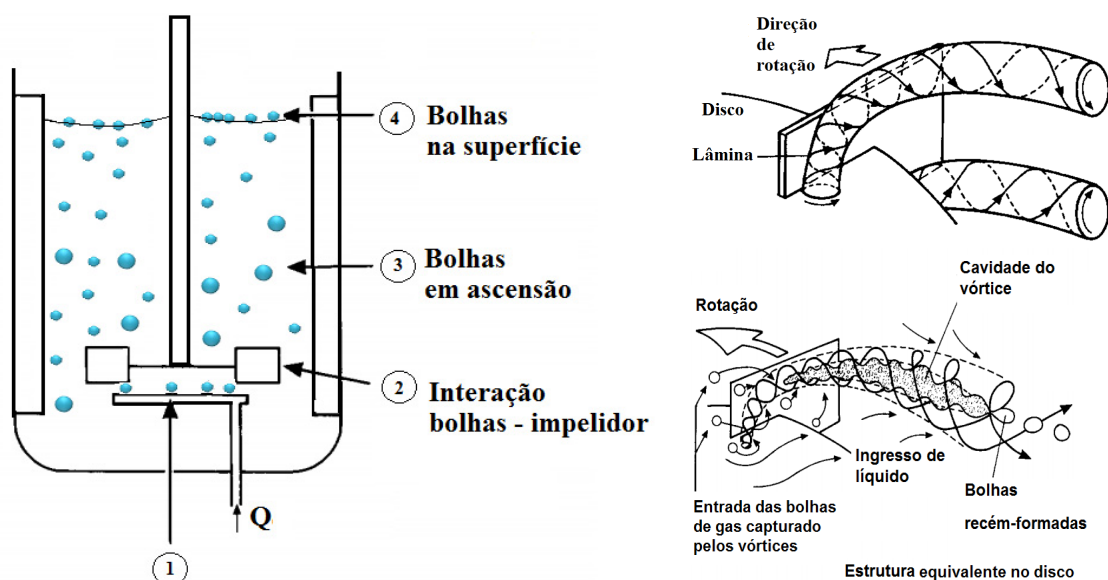
biossíntese do produto esperado (BADINO e SCHMIDELL, 2001). Além disso, a biomassa concentrada poderia gerar aglomerados celulares quando é aplicada velocidades baixas de agitação (OH et al., 1991).

Portanto, o dano provocado pela condição de cisalhamento por agitação pode ser minimizado pelo apropriado desenho do equipamento e controle da agitação e aeração no biorreator. Por esse motivo, o efeito da agitação sobre a morfologia em cultivos submersos precisa ser cuidadosamente avaliado, sendo indispensável a escolha da geometria do impelidor que determinará as forças hidrodinâmicas que irão afetá-la, além da alimentação de ar e da potência fornecida ao sistema (OH et al., 1991; JÜSTEN et al., 1996; CHISTI 2001).

### 2.7.2. Cisalhamento por borbulhamento de gás

O borbulhamento de gás também pode causar danos às células por cisalhamento e pode ocorrer em diferentes regiões do biorreator: 1) na região do aspersor onde as bolhas são geradas, 2) durante a coalescência das bolhas e quebra das bolhas durante o arrasto no vórtice gerado pelo movimento do impelidor, 3) na região de ascensão das bolhas no biorreator e 4) na eclosão da bolha na interface líquido-gás na superfície do fluido. A Figura 2.13 ilustra essas regiões (OH et al., 1992; CHISTI, 2000).

**Figura 2.13. Regiões do potencial interação bolha-célula, que pode causar dano celular e regiões de alto cisalhamento em um biorreator agitado com turbina Rushton.**



Fonte: adaptação de Oh et al., 1992

O tamanho e a quantidade de bolhas de gás em sistemas gaseificados são importantes fatores na morte celular por cisalhamento, pois o maior dano ocorre nas células aderidas à superfície da bolha quando esta eclode na superfície do líquido. As rupturas de bolhas pequenas na superfície do líquido são mais violentas que das bolhas grandes, sendo que as bolhas com diâmetro maior que 5,5 mm são menos prejudiciais para as células e bolhas pequenas podem produzir dano instantâneo. O dano celular por borbulhamento ocorre quase totalmente na superfície do líquido (CHISTI, 1990). Segundo Chisti (2000), a lesão celular induzida por estouro ou eclosão de bolhas em biorreatores de menor escala será maior em comparação ao estouro de bolhas em biorreator a escala industrial, indicando que o tamanho das bolhas deve ser superior a 7 mm, preferencialmente entre 10 e 20 mm.

Oh et al. (1989) observaram que ao se utilizar baixa velocidade de agitação e baixas vazões de alimentação de ar, o número de células foi reduzido drasticamente em cultivos de célula animal utilizando o impelidor Rushton, mostrando que o dano às células foi devido à aspersão de ar, mas não indicaram como aconteceu ou onde.

Nos cultivos em suspensão, devido à baixa agitação, os danos celulares por forças hidrodinâmicas não são muito significativos e estes danos podem ser atribuídos principalmente à introdução, quebra, coalescência e eclosão na superfície do líquido das bolhas de gás (OH et al., 1992)

Para conseguir um ambiente hidrodinâmico favorável para o processo, diversas pesquisas vêm sendo realizadas para minimizar o cisalhamento em células sensíveis, como no trabalho de Whang e Shong (1997), no qual foi projetado com sucesso um novo tipo de biorreator com rotor centrífugo para cultivos de células sensíveis ao cisalhamento, como células de plantas. Outra forma de minimizar o dano por cisalhamento por estouro de bolhas é utilizar agentes protetores em cultivos, como o surfactante não iônico Pluronic<sup>®</sup> F68, mediante pesquisas utilizando célula animal. O efeito do Pluronic<sup>®</sup> F68 é comumente relacionado com sua capacidade de evitar a ligação das células com as bolhas, evitando que uma maior quantidade de células seja transportada à superfície (OH et al., 1992; CHISTI, 2000). Por outro lado, os efeitos negativos e positivos referentes ao estresse hidrodinâmico foram expostos com detalhe por Meijer et al. (1993) em cultivos de células de plantas. Até o momento, os efeitos do cisalhamento na fisiologia dos fungos ainda não são bem compreendidos (KRESTA e BRODKEY 2003).

Sassi et al. (1991) avaliaram o efeito do impelidor Rushton na produção de ácido cítrico utilizando *A. niger*, observando que o impelidor não afetou a produção da biomassa, mas sim a biossíntese de produto.

O efeito do cisalhamento também foi avaliado em cultivos de *S. clavuligerus* visando a produção de ácido clavulânico. Observou-se que o microrganismo se mostrou sensível ao cisalhamento apresentando lise celular quando a agitação foi incrementada para manter o nível de oxigênio dissolvido (ROUBOS et al., 2001). Nos trabalhos realizados por Rosa et al. (2005) e Thomasi et al. (2011), observou-se que quanto maior a velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ), menor foi o crescimento celular em cultivos com *S. clavuligerus*. O aumento nas condições de cisalhamento pode trazer melhorias na produção de metabólitos de interesse como na produção de composto  $\beta$ -lactâmico ácido clavulânico (ROSA et al., 2005; CERRI e BADINO, 2012). Este efeito já tinha sido mencionado por Meijer et al. (1993), indicando que o cisalhamento pode mostrar efeitos positivo e negativo em cultivos.

Para contornar o efeito negativo do cisalhamento em cultivos envolvendo microrganismos filamentosos, além de reduzir o consumo de potência e modificar o padrão de escoamento, recentes trabalhos tem abordado o estudo da influência da geometria de impelidores. São propostas modificações geométricas nos impelidores, a fim de melhorar seu desempenho, sendo estudado minuciosamente o impacto destas modificações em impelidores de escoamento axial *pitched blade* e *hydrofoil* (lâminas largas e estreitas) por Kumaresan e Joshi (2006).

Sandadi et al. (2011), realizaram estudos utilizando impelidores com diferentes comportamentos de escoamento, como a turbina Rushton (radial) e o a hélice marina (axial), em cultivos de célula animal (células de ovário de hamster chins) para caracterizar o rendimento, transferência de massa, crescimento celular e produção de anticorpos. No entanto, os autores não conseguiram demonstrar se a qualidade do anticorpo produzido foi alterada com a mudança na geometria do impelidor. Recentemente, um novo modelo de impelidor, o tipo “orelha de elefante” ou *Elephant Ear* (EE), tem sido estudado por apresentar “baixo cisalhamento” (KRESTA e BRODKEY, 2003). Nienow (2006), indica que esta característica se deve ao fato de apresentar um grande volume de arrasto devido ao tamanho das pás. Pelo que tem sido indicado por muitos autores, esse impelidor é adequado para o cultivo dos microrganismos sensíveis ao cisalhamento como células animais e alguns fungos filamentosos (ZHU et al., 2009; COLLIGNON et al., 2010; MIRRO e VOLL 2009).

## 2.8. Correlações para cálculo de velocidade de cisalhamento

Diversos trabalhos na literatura propõem equações de previsão referentes à quantificação da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ), assim como da velocidade de cisalhamento máxima ( $\dot{\gamma}_{max}$ ). Esses trabalhos fornecem correlações obtidas em função das condições de operação e das propriedades físicas (densidade) e reológicas do fluido, como o índice de consistência e o índice de comportamento de escoamento ( $n$ ). A Tabela 2.2 apresenta um resumo das correlações relacionados com estimativas de velocidades de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) e máxima ( $\dot{\gamma}_{max}$ ), a fim de se ter uma fácil comparação entre eles.

**Tabela 2.2. Correlações para a  $\dot{\gamma}_m$  e  $\dot{\gamma}_{max}$  em biorreatores mecanicamente agitados (adaptado de Chisti, (2001)).**

Referência	Correlação	Observações
Metzner e Otto (1957)	$\dot{\gamma}_m = k \cdot N$	Regime laminar Fluido não-Newtoniano
Calderbank e Moo-Young (1959)	$\dot{\gamma}_m = k \cdot \left(\frac{4n}{3n+1}\right)^{\frac{n}{n-1}} \cdot N$	Regime laminar Fluido não-Newtoniano
Kelly e Gigas (2003)	$\dot{\gamma}_m = 64,3 \cdot N$	Regime de transição Fluidos Newtoniano e não-Newtoniano
Pérez et al. (2006)	$\dot{\gamma}_m = 33,1 \cdot N^{1,4}$	Regime de transição Fluidos Newtoniano e não-Newtoniano
Camposi et al. (2009)	$\dot{\gamma}_m = K^{\frac{0,6092}{1-n}} \cdot (1,571 \cdot N^{0,4665})^{\frac{2,876}{1-n}}$ $\dot{\gamma}_m = K^{\frac{0,610}{1-n}} \cdot (1,71 \cdot N^{0,549})^{\frac{2,48}{1-n}}$	Regime turbulento Fluido não-Newtoniano
Witcherle et al. (1984)	$\dot{\gamma}_{max} = N \cdot (1 + 5,3n)^{1/n} \cdot \left(\frac{N^{2-n} \cdot d_i^2 \cdot \rho_L}{K}\right)^{1/(1+n)}$	Regime turbulento Fluidos Newtoniano e não-Newtoniano
Robertson e Ulbrecht (1987)	$\dot{\gamma}_{max} = 3.3 \cdot N^{1.5} \cdot D_i \cdot \left(\frac{\rho_L}{\mu}\right)^{0,5}$	$10^2 < Re < 2.9 \times 10^4$ Fluidos Newtoniano e não-Newtoniano

A correlação clássica proposta por Metzner e Otto (1957), mostra que  $\dot{\gamma}_m$  é proporcional a N:

$$\gamma = k \cdot N \tag{2.34}$$

Onde  $k$  é uma constante adimensional, dependente do tipo de impelidor (por exemplo,  $k=11,5$  para a turbina Rushton), da geometria do sistema e N é a frequência de rotação do eixo do agitador (rpm). Esse conceito tem sido amplamente aceito e utilizado para fluidos não-Newtonianos (SCHMIDELL, 2001).

A Equação (2.35) proposta por Calderbank e Moo-Young (1959) é uma forma modificada da Equação (2.34). Nela a constante  $k$  é corrigida por um termo que é função dos parâmetros reológicos K e n. Essa equação foi modificada, pois os autores observaram que para fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos ( $n<1$ ) agitados por diferentes tipos de impelidores, é possível definir uma relação entre a viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) e as propriedades reológicas do fluido, índice de consistência (K) e índice de comportamento de escoamento (n), obtendo uma equação mais completa que a correlação proposta por Metzner e Otto (1957). A abordagem é comumente utilizada para estimativas de  $\dot{\gamma}_m$  em regime turbulento:

$$\dot{\gamma}_m = K \cdot \left( \frac{4 \cdot n}{3 \cdot n + 1} \right)^{\frac{n}{n-1}} \cdot N \tag{2.35}$$

Kelly e Gigas (2003) utilizaram a modelagem matemática por fluidodinâmica computacional (CFD) para determinar a velocidade de cisalhamento média em regime de transição em função da frequência de rotação do impelidor. Utilizando biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado de 70 L provido de chicanas ou hastes defletoras (*baffles*) com impelidor *hydrofoil* A315 de escoamento axial, operado em regime de escoamento de transição, a partir de simulações observaram que  $\dot{\gamma}_m$  aumentou com aumentos de N e de n (METZNER e OTTO, 1957). Eles modificaram o valor da constante de proporcionalidade de forma que a correlação se ajustou melhor aos dados experimentais, obtendo-se um coeficiente de regressão  $R^2=0,96$ . Modelo é dado pela Equação (2.36):

$$\dot{\gamma}_m = 64,3 \cdot N \quad (2.36)$$

Pérez et al. (2006), utilizaram os dados simulados de Kelly e Gigas (2003) para ajustar uma correlação modificada, desenvolvida para um impelidor de escoamento axial *hydrofoil* A315, a partir de raciocínio teórico e análise empírica.

$$\dot{\gamma}_m = 33,1 \cdot N^{1,4} \quad (2.37)$$

No ajuste foi obtido um coeficiente de regressão  $R^2=0,9990$ , consideravelmente melhor que o da Equação (2.36). Esta Equação 2.37 foi validada em regime de transição por um impelidor A315.

Campesi (2009), propôs uma metodologia para correlacionar a velocidade de cisalhamento média com a frequência de rotação do impelidor e com os parâmetros reológicos  $K$  e  $n$ , para o biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado, adaptando a metodologia proposta por Cerri et al. (2008) para biorreatores pneumáticos. As Equações (2.38) e (2.39) mostram essas relações, para vazões específicas de alimentação de ar de 0,50 e 1,00 vvm, respectivamente:

$$\dot{\gamma}_m = K^{\frac{0,6092}{1-n}} \cdot (1,571 \cdot N^{0,4665})^{\frac{2,876}{1-n}} \quad (2.38)$$

$$\dot{\gamma}_m = K^{\frac{0,6092}{1-n}} \cdot (1,711 \cdot N^{0,5487})^{\frac{2,476}{1-n}} \quad (2.39)$$

Este método foi avaliado em cultivos submersos de *S. clavuligerus*, onde se conclui que elevados valores de velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) geram caldos fermentativos menos viscosos.

Na literatura são também encontrados trabalhos que propuseram correlações para estimativa da velocidade de cisalhamento máxima ( $\dot{\gamma}_{max}$ ).

Witcherle et al. (1984) propuseram uma correlação para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos para determinar  $\dot{\gamma}_{max}$  na ponta de um impelidor tipo turbina com pás planas. Sendo um dos únicos trabalhos na literatura que tenta quantificar  $\dot{\gamma}_{max}$  em sistemas com impelidor tipo turbina com lâminas planas.



$$\dot{\gamma}_{\max} = N \cdot (1 + 5,3n)^{1/n} \cdot \left( \frac{N^{2-n} \cdot d_i^2 \cdot \rho_L}{K} \right)^{1/(1+n)} \quad (2.40)$$

onde  $\rho_L$  é a densidade do líquido ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ) e  $d_i$  é o diâmetro do impelidor (m).

Robertson e Ulbrech (1987) também propuseram uma correlação para determinar  $\dot{\gamma}_{\max}$  utilizando fluidos Newtonianos e não-Newtonianos. Eles observaram que nos tanques com impelidor tipo turbina com pás planas, a velocidade de cisalhamento é máxima próxima à ponta do impelidor e diminui quando se distancia da ponta, como pode ser observado na correlação dada pela Equação (2.41),

$$\dot{\gamma}_{\max} = 3.3 \cdot N^{1.5} \cdot d_i \cdot \left( \frac{\rho_L}{\mu} \right)^{0,5} \quad (2.41)$$

onde  $\mu$  é a viscosidade dinâmica do líquido dada em Pa.s.

## 2.9. Potência dissipada

A potência dissipada ou consumo de potência é uma variável importante na operação do biorreator em bioprocessos. Em biorreatores mecanicamente agitados, a potência mecânica transmitida ao fluido é geralmente fornecida por um ou vários impelidores e, portanto, o consumo de potência durante a agitação deve-se à resistência que o caldo exerce sobre as pás dos impelidores. A potência transmitida ao fluido tem forte influência nos processos de transferência de quantidade de movimento, calor e massa do processo. Uma maneira de se avaliar o consumo de potência é a utilização de diagramas e correlações disponíveis na literatura, para sistemas não gaseificados ( $P_0$ ) e gaseificados ( $P_g$ ). Cabe ressaltar que grande parte das correlações e diagramas propostos pela literatura são obtidos para fluidos com características diferentes das apresentadas por caldos de fermentação. Portanto, o uso de diagramas e correlações propostas pela literatura, embora úteis, apresentam limitações nas estimativas de consumo de potência durante a agitação e aeração de caldos de fermentação.

O requerimento de potência em tanques agitados  $P_0$  foi objeto de estudo de Rushton et al. (1950a, 1950b), que desenvolveram o conceito de número de potência ( $N_p$ ). Os autores mediram as exigências de potência na agitação de fluidos Newtonianos em tanques com e sem chicanas, utilizando diferentes impelidores e relacionaram os resultados experimentais

baseando-se na relação entre o  $N_p$  e número de Reynolds modificado ( $Re$ ), ambas as grandezas adimensionais (vide Tabela 2.3).

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot d_i^2}{\mu} \quad (2.42)$$

$$N_p = \frac{P_0}{\rho_L \cdot N^3 \cdot d_i^5} \quad (2.43)$$

**Tabela 2.3. Regime de escoamento de fluidos em tanques agitados em função do Número de Reynolds ( $Re$ ) (OBENG e KRESTA, 2003).**

Número de Reynolds ( $Re$ )	Regime
$Re \leq 10$	laminar
$10 \leq Re \leq 10^4$	transição
$Re \geq 10^4$	turbulento

Quando se impõe um regime turbulento de agitação de um fluido, a potência dissipada sem aspersão de gás ( $P_0$ ) é obtida a partir de um valor constante de número de potência ( $N_p$ ), característica deste regime de agitação:

$$P_0 = N_p \cdot \rho_L \cdot N^3 \cdot d_i^5 \quad (2.44)$$

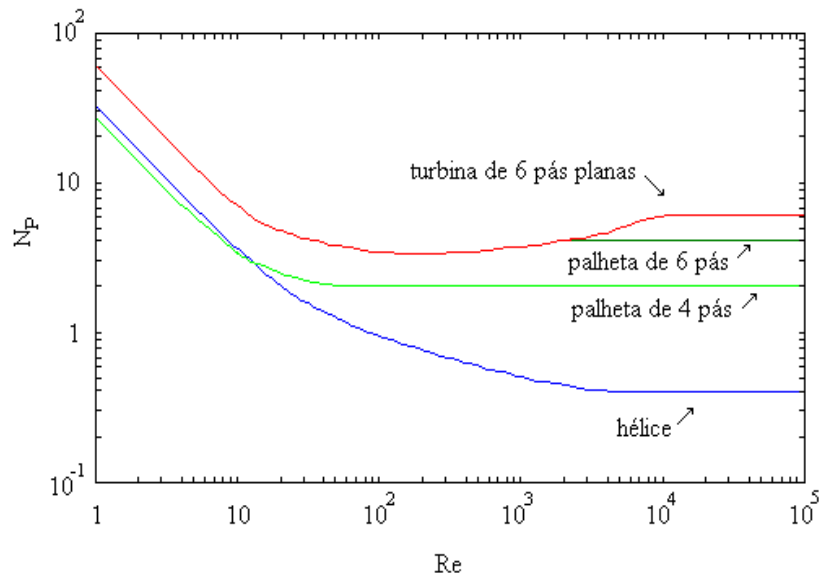
Onde  $\rho_L$  é a densidade do líquido e  $d_i$  é o diâmetro do impelidor.

A potência transferida ao fluido sem aeração ( $P_0$ ) pode, portanto, ser estimada através de diagramas como o de Rushton et al. (1950a, 1950b), ilustrado na

Figura 2.14, que relaciona  $N_p$  com  $Re$  para diferentes impelidores. Sua utilização pode ser generalizada para sistemas de diferentes tamanhos, desde que esses apresentem dimensões que respeitem as relações geométricas apresentadas na Tabela 2.4

Onde  $D$  é o diâmetro do tanque,  $H_L$  é a altura de líquido,  $C_l$  (*clearance*) é a distância entre a base do tanque e o impelidor,  $L$  é a altura da pá do impelidor,  $L_p$  é a largura da pá do impelidor e  $X$  é a largura da chicana.

Figura 2.14. Diagrama do número de potência ( $N_p$ ) em função número de Reynolds ( $Re$ ) para sistemas com diferentes impelidores (RUSHTON et al., 1950a, 1950b).



Fonte: adaptação de Badino et al., 1997

Tabela 2.4. Relações geométricas dos sistemas utilizadas na Figura 2.11 (Badino, 1997).

Impelidor	$D/d_i$	$H_L/d_i$	$C_l/d_i$	$L/d_i$	$L_P/d_i$	$X/d_i$
Turbina de 6 pás planas	3	3	1	0,25	0,20	0,10
Hélice (passo = $d_i$ )	3	3	1	-	-	0,10

\* tanque com 4 chicanas

## 2.10. Hidrodinâmica em biorreatores

Na literatura “tensão” é o termo mais utilizado para mencionar qualquer efeito hidrodinâmico em um material biológico, mas se esse elemento biológico sofre uma mudança com o incremento da velocidade de agitação, não significa que esse material está sendo deformado (THOMAS e ZHANG, 1998). Deve ter-se claro que o  $\tau$  (tensão de cisalhamento ou *shear stress*) é diretamente proporcional  $\dot{\gamma}$  (velocidade de cisalhamento ou *shear rate*).

No transcurso dos cultivos, a composição do meio é alterada durante as fases de crescimento e produção, gerando muitas vezes fluidos não-Newtonianos, como no caso de caldos de cultivos envolvendo microrganismos filamentosos, comumente utilizados em processos de produção nas áreas farmacêutica e alimentícia. Neste sentido, para se melhorar a

transferência de O<sub>2</sub> em sistemas convencionais é necessário incrementar variáveis manipuláveis como a frequência de rotação do agitador (N), que altera significativamente a potência fornecida, e a vazão específica de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ) (ROLLINS et al., 1988; MITSUYASU, KUWAJIMA e SATOH, 1992; GAVRILESCU, ROMAN e EFIMOV, 1993).

Pelo exposto, para obter-se uma transferência adequada de O<sub>2</sub> da fase gasosa para a fase líquida, as células podem ser fortemente afetadas por alterações no ambiente hidrodinâmico no interior do biorreator, pela geração de regiões com elevado cisalhamento.

Nos biorreatores convencional tipo tanque agitado, o tanque pode ser dividido em duas regiões:

***Regiões de alta dissipação de energia:*** são as regiões próximas do impelidor e representam zonas com elevada dissipação de energia e, por conseguinte, uma boa transferência de calor e massa. A exposição a estas zonas de alta velocidade de cisalhamento pode causar danos instantâneos às células, mas o dano também pode ocorrer gradualmente por tensão hidrodinâmica. Isto implica que as células têm a habilidade de se adaptar a certos níveis de tensão mecânica.

***Regiões de baixa dissipação de energia:*** só existem em zonas próximas às paredes do tanque e em regiões estagnadas, onde há pouca transferência de potência e uma oferta insuficiente de O<sub>2</sub> por efeito de um baixo grau de mistura. Estes gradientes de transferência de massa são significativos e podem afetar o crescimento dos micélios e formação do produto (PAPAGIANNI, 2004).

Portanto, a velocidade de cisalhamento ou a gradiente de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) que determina o estresse hidrodinâmico e que atua sob as partículas biológicas não é constante em todo o tanque, devido às variações irregulares do escoamento padrão em todas as coordenadas (radial, axial e angular) em função do tempo. O estudo da tensão hidrodinâmica em reatores mecanicamente agitados tende a focar os efeitos letais e sub-letais, através de um elevado número de indicadores de resposta das células (KIERAN, MALONE e MACLOUGHLIN, 2006).

## **2.11. Dissipação de energia**

A taxa de dissipação de energia média  $(\bar{\epsilon}_T)_1$  ou taxa de dissipação de energia global (dada em W.kg<sup>-1</sup> ou m<sup>2</sup>.s<sup>-3</sup>) pode ser obtida a partir da potência dissipada:

$$(\bar{\varepsilon}_T)_I = \frac{P}{\rho_L \cdot V} \quad (2.45)$$

onde  $V$  é o volume do meio no reator ( $m^3$ ).

A taxa de dissipação de energia local ou máxima  $(\bar{\varepsilon}_T)_{I_{max}}$  próxima ao impelidor é superior a  $(\bar{\varepsilon}_T)_I$  e depende do tipo de impelidor.

A microescala de turbulência de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) é frequentemente considerada como um indicador potencial do dano celular e é dada por:

$$\eta_K = \left( \frac{\nu^3}{(\varepsilon_T)_I} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (2.46)$$

Onde a  $\nu$  é a viscosidade cinemática do fluido, dada por:

$$\nu = \frac{\mu}{\rho_L} \quad (2.47)$$

Considerando a água como meio da suspensão celular, tem-se que  $\nu \approx 10^{-6} m^2 \cdot s^{-1}$  e  $(\varepsilon_T)_I$  é a taxa de dissipação de energia.

Segundo a teoria da microescala de turbulência de Kolmogorov (1941a, 1941b), a turbulência pode ser representada em forma de pequenos redemoinhos ou turbilhões (*eddies*) de diferentes tamanhos onde a quantidade de energia é diretamente proporcional a seu tamanho. A literatura indica que o dano celular pela dissipação de energia devido aos redemoinhos ocorre quando o diâmetro da célula em suspensão ou o diâmetro do agregado celular apresenta tamanho igual ou maior que o diâmetro do turbilhão de Kolmogorov. Devido ao fato que estes turbilhões têm energia suficiente para atuar sobre as células impondo a elas um estresse, apenas as espécies biológicas que apresentam tamanho menor ao menor turbilhão da microescala de Kolmogorov não são afetadas pelo estresse hidrodinâmico. Isso significa que apenas os turbilhões de maior tamanho conduzem às partículas biológicas a um movimento convectivo em um sistema agitado sem danos às células (THOMAS e ZHANG, 1990). Por exemplo, quando se tem dissipação de energia média em fermentação bacteriana em escala industrial igual a  $1,0 W \cdot kg^{-1}$  em um meio de cultivo com características similares da água, o tamanho do turbilhão é de aproximadamente  $30 \mu m$ .

Makagiansar et al. (1993) propõem que a velocidade de agitação na ponta do impelidor não é um bom parâmetro de cálculo da dissipação de energia em biorreatores na escala de bancada, planta piloto ou na escala industrial, sendo melhor ter em conta os parâmetros como a energia total e a dissipação de energia máxima, considerando também o tipo de cultivo.

Alguns autores utilizam os valores do  $k_{La}$  como um indicador empírico para quantificar a tensão hidrodinâmica em que as células se encontram expostas, podendo ser correlacionado com as forças geradas pela dissipação de energia dos micro-turbilhões. Como mencionado anteriormente, a demanda global de  $O_2$  pelas células é crescente e, portanto, a transferência de  $O_2$  deve ser incrementada durante os cultivos, principalmente pelo aumento das condições de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) e, por consequência, do  $k_{La}$  que depende unicamente de dois parâmetros, como apresentado na Equação (2.48):

$$k_{La} = A \cdot (\bar{\epsilon}_T)_g^\alpha \cdot (v_s)^\beta \quad (2.48)$$

O primeiro está relacionado diretamente com a taxa de dissipação de energia específica  $((\bar{\epsilon}_T)_g)$ , composta por duas parcelas, dada por:

$$(\bar{\epsilon}_T)_g = (\bar{\epsilon}_T)_S + (\bar{\epsilon}_T)_{Ig} \quad (2.49)$$

onde  $(\bar{\epsilon}_T)_S$  é a dissipação de energia devido ao borbulhamento de ar, dada por:

$$(\bar{\epsilon}_T)_S \approx v_s \cdot g \quad (2.50)$$

onde  $g$  é a aceleração da gravidade ( $9,81 \text{ m.s}^{-2}$ ) e  $v_s$  é a velocidade superficial do gás dada (em  $\text{m.s}^{-1}$ ).

O segundo termo da Equação (2.49)  $(\bar{\epsilon}_T)_{Ig}$  refere-se à dissipação de energia gerada pelo impelidor num sistema gaseificado, definida como:

$$(\bar{\epsilon}_T)_{Ig} = \frac{N_{Pg} \cdot N^3 \cdot d_i^5}{V} \quad (2.51)$$

Onde  $P_g$  é o número de potência em condições gaseificadas.

$P_g$  é geralmente menor que  $P_0$  e muitas vezes significativa para condições de aeração utilizadas em cultivos de bactérias e fungos. No entanto, para menores vazões de alimentação de ar em cultivos de células animais,  $P_g \approx P_0$ .

De acordo com a Equação (2.48), o  $k_L a$  depende também de da velocidade superficial de gás ( $v_s$ ), dada por:

$$v_s = \frac{Q \cdot V}{A_T} \quad (2.52)$$

Onde:

$$A_T = \frac{\pi \cdot D^2}{4} \quad (2.53)$$

Onde  $A_T$  é a área da seção transversal do biorreator. A variável  $v_s$  muitas vezes pode ser desprezada por apresentar valores muito pequenos. Isso poderia ser possível para processos pouco aerados.

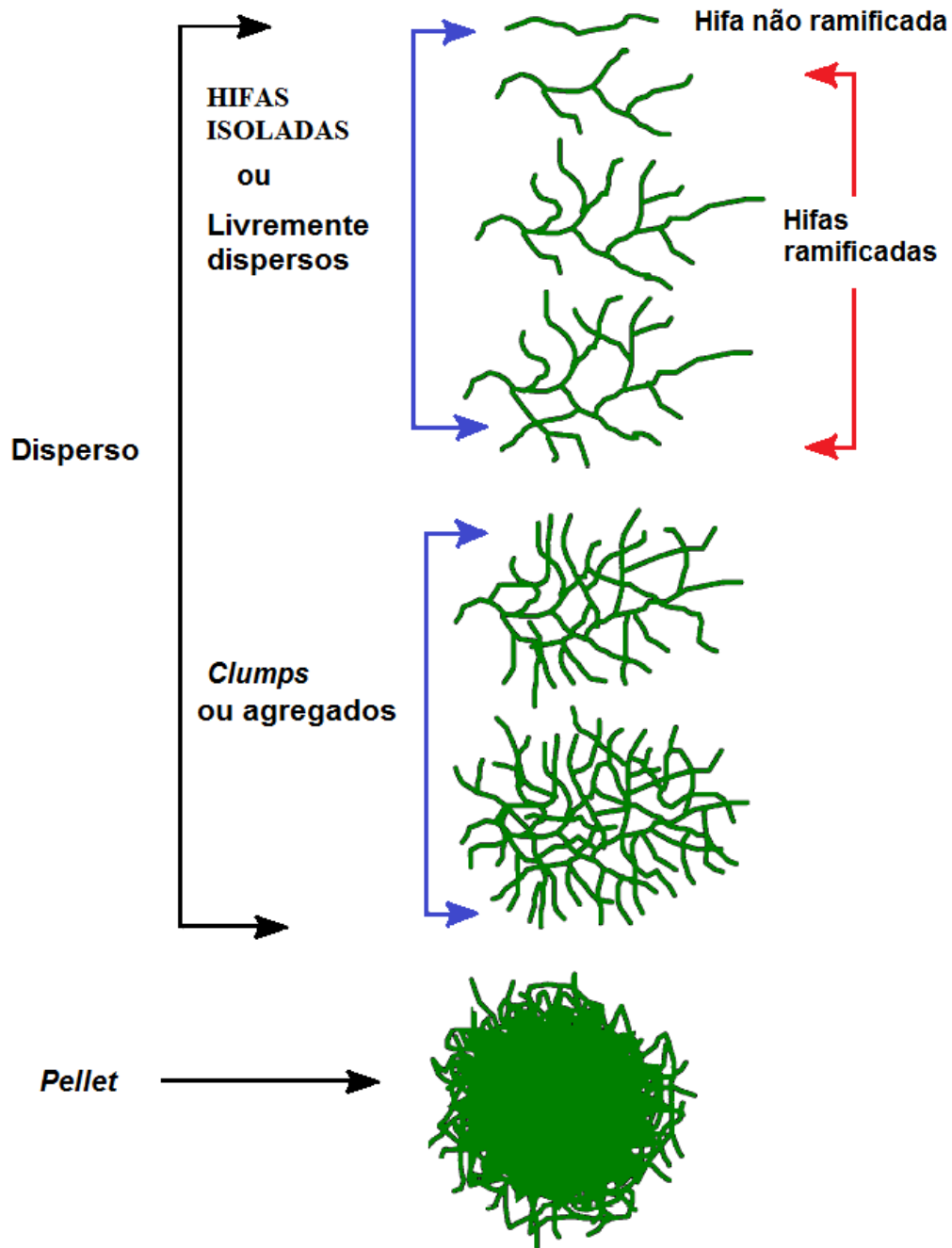
Essa Equação (2.48) é independente do tipo de impelidor e os valores de  $\alpha$  e  $\beta$  são usualmente entre  $0,5 \pm 1$  seja qual for o líquido. Por outro lado, o coeficiente  $A$  é altamente sensível à concentração (NIENOW, 2006); (NIENOW, 2012).

## **2.12. Influência das condições de cultivo na morfologia de microrganismos filamentosos**

Um dos primeiros trabalhos que relaciona o estresse mecânico com a morfologia do micélio de *Penicillium chrysogenum*, Makagiansar (1993) mostra que a obtenção de um adequado grau de mistura, de modo a favorecer a transferência calor e massa em cultivos, é essencial para um bom crescimento celular, assim como para manutenção morfologia celular, condições necessárias para atingir altas produtividades nos bioprocessos.

Na literatura, são descritos diferentes tipos de morfologia em microrganismos filamentosos que vão desde hifas livremente dispersas até *pellets* (altas densidades ou emaranhados de hifas) conforme mostrado na Figura 2.15.

Figura 2.15. Estruturas morfológicas encontrada em cultivos típicos de fungos filamentosos e actinomicetos.



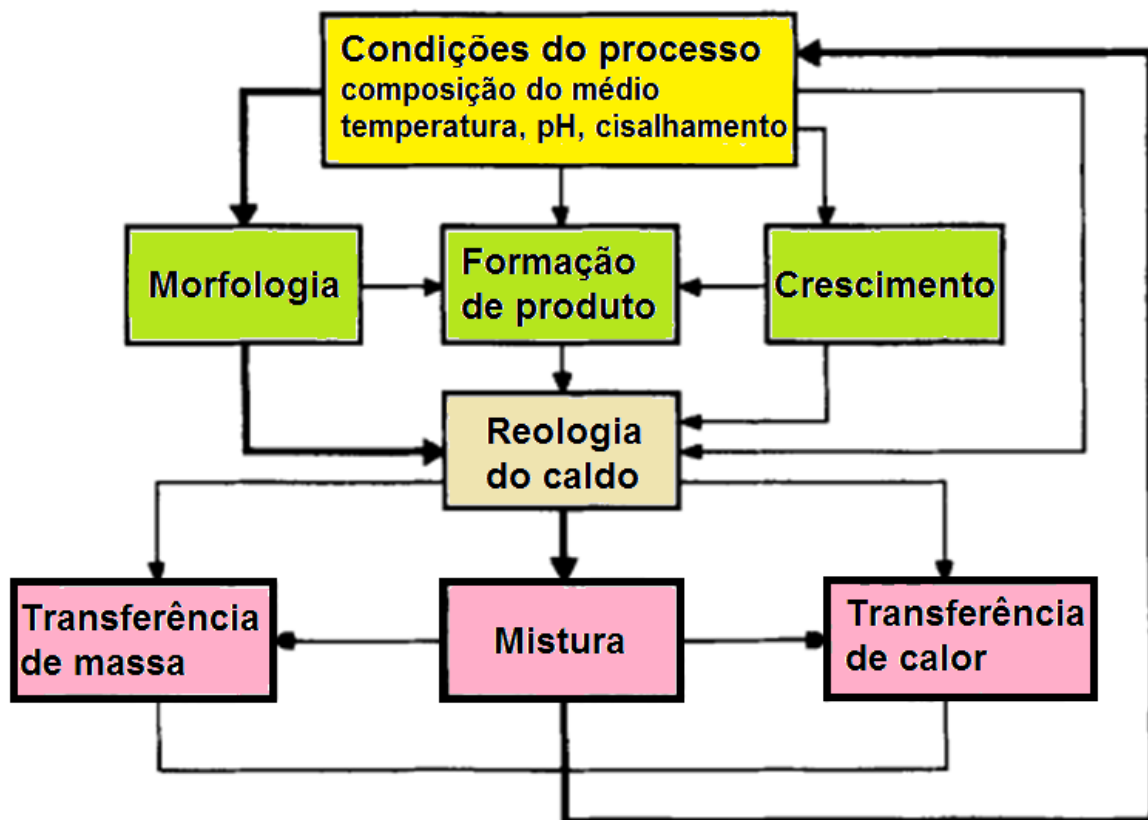
Adaptado de Cox et al., 1998 .

A morfologia dispersa observada na Figura 2.15 é típica de muitos microrganismos filamentosos, crescendo em meio de cultivo submerso e em meio sólido. As formas dispersas dividem-se em hifas isoladas ou livremente dispersas (hifas não ramificadas e hifas ramificadas) e a grande quantidade de hifas formando agregados ou *clumps* (COX; PAUL; THOMAS, 1998), (PAMBOUKIAN; GUIMARÃES; FACCIOTTI, 2002).



A Figura 2.16 mostra a complexa interação entre a morfologia, produtividade e as condições de cultivo de microrganismos filamentosos. Portanto, pode-se dizer que a morfologia desempenha um papel central nos cultivos e, consideráveis esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de métodos quantitativos de caracterização da morfologia como a análise de imagem. A variação morfológica afeta as propriedades reológicas do caldo de fermentação e podem afetar os fenômenos de transporte no interior do biorreator e a eficiência e produtividade do processo inteiro (PAPAGIANNY, 2004).

Figura 2.16. Complexa interação entre morfologia, produtividade e condições de cultivo de microrganismos filamentosos (PAPAGIANNY, 2004).

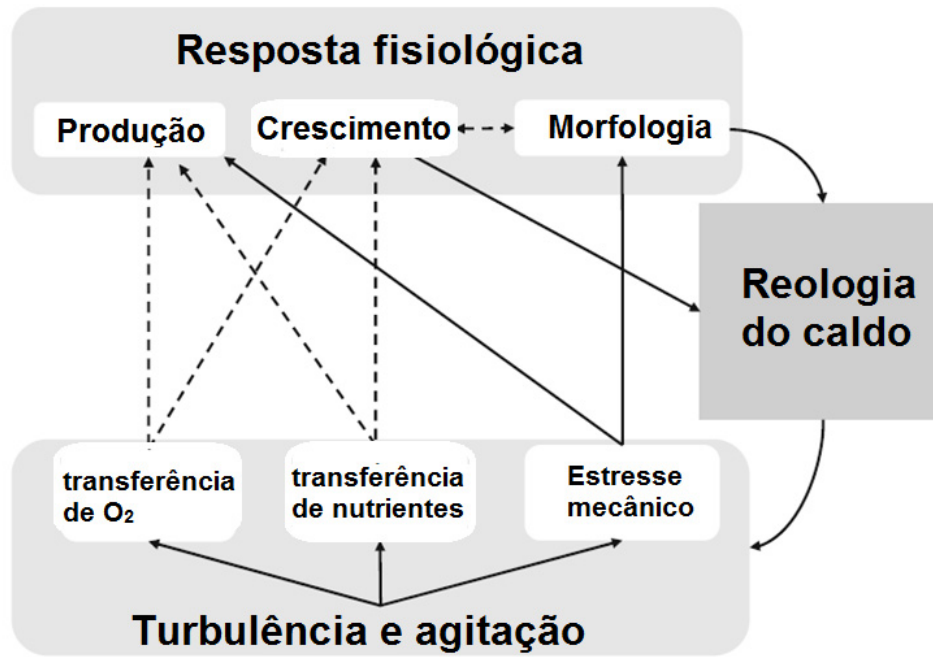


Em cultivos de estreptomicetos, a intensidade da agitação aplicada tem impacto sobre a velocidade de crescimento celular, sínteses de produto, metabolismo através do transporte de nutrientes e atividades enzimáticas, dano celular, morfologia e sobre a reologia do caldo não-Newtoniano. O acoplamento destes parâmetros é esquematizado na Figura 2.17.

A produção de metabólitos secundários produzido por estreptomicetos pode ser afetada pela frequência de agitação e pela potência dissipada. Para a produção de metabólitos

parece existir um nível de agitação ideal, mas na literatura a resposta fisiológica frente às condições de mistura permanece ambígua (OLMOS et al., 2013).

Figura 2.17. Acoplamento entre fenômenos relacionados ao biorreator. Em linhas contínuas e pontilhadas referem-se ao acoplamento físico e bioquímico (OLMOS et al., 2013).



Finalmente, a caracterização da morfologia das hifas ramificadas (HR) está relacionada diretamente com o grau de alongamento (CHR: comprimento de hifa ramificada) e de ramificação das hifas ou número de pontas.

A chamada unidade de crescimento de uma hifa ramificada ( $UCH_{HR}$ ) em  $\mu m$ , definida como a razão entre o comprimento total e o número de extremidades de hifa ramificada ( $NE_{HR}$ ) ou número de pontas, dá uma medida da importância relativa do alongamento face à ramificação ao longo da fermentação (PROSSER e TOUGH, 1991), (PINTO et al., 2004). Para monitoramento da UCH (unidade de crescimento hifal) durante um cultivo é a seguinte:

$$UCH = \frac{CHR}{NE_{HR}} \quad (2.54)$$

### **2.13. Análises de imagem**

A análise de imagem é uma técnica poderosa que permite a análise qualitativa e quantitativa das estruturas a partir das imagens obtidas por elementos eletrônicos (tais como máquinas fotográfica e câmeras de vídeo), proporcionando resultados precisos e estatisticamente significativos, além de facilitar a compreensão da análise das diferentes amostras, devido a sua capacidade para caracterizar grande variabilidade de tamanhos e formas (COX; PAUL; THOMAS, 1998), (PAMBOUKIAN, 2003).

Com o contínuo desenvolvimento tecnológico na área de microscopia óptica, a análise de imagens tem avançado cada vez mais, tornando-se um procedimento mais sistematizado e automático e resultando numa valiosa ferramenta para caracterizar a morfologia de micélios complexos, estados fisiológicos, assim como relações entre morfologia e produtividade. Por exemplo, variações da morfologia em processos fermentativos interferem consideravelmente na produção de metabólitos primários e secundários (PAMBOUKIAN; GUIMARÃES; FACCIOTTI, 2002, PAPAGIANNY, 2004). A análise de imagem também tem sido utilizada para relacionar a reologia de um caldo de cultivo com a morfologia, para estudar a fragmentação dos micélios por impelidores e para investigar a diferenciação estrutural e a bioquímica de hifas tanto em cultivos submersos como em cultivos em meio sólido (COX; PAUL; THOMAS, 1998).

Nesse sentido, especificamente em cultivos de estreptomicetos, muitos trabalhos têm sido publicados sobre a morfologia de crescimento, quantificada por análises de imagens como no trabalho de Belmar-Beinry e Thomas (1991), onde os autores mostraram que o aumento da frequência de rotação aumentou a fragmentação de hifas, em cultivos para a produção de ácido clavulânico por *S. clavuligerus*. Por outro lado, Jüsten et al. (1996) utilizaram a análises de imagens e mostraram que a fragmentação das hifas num biorreator tanque agitado pode ser relacionada com a dissipação de energia em várias escalas de operação, utilizando diferentes tipos de impelidores. Amanullah et al., (2000) estudaram a fragmentação de hifas durante cultivos de *Aspergillus oryzae* e *Penicillium chrysogenum*, mostrando que o aumento da agitação provocou uma diminuição na área de *clumps*. Pinto et al. (2001) estudaram a viabilidade celular em cultivos de *S. clavuligerus*, concluindo que a porcentagem de células viáveis foi bastante elevada e que a morfologia desse microrganismo foi significativamente influenciada pelo estado do inóculo utilizado (inóculo transferido em

fase exponencial e inóculo transferido em fase estacionária). Pamboukian, Guimarães e Facciotti (2002), mediante estudos com cultivos de *Streptomyces olindensis*, estabeleceram alguns critérios para a classificação automática do microrganismo em quatro classes morfológicas distintas (*pellets*, *clumps*, hifas ramificadas e hifas não ramificadas), de acordo com suas dimensões, aplicando técnicas de análise de imagens. Observaram durante cultivos descontínuos, que o cisalhamento no reator levou ao rompimento de *pellets* e à formação de *clumps* e hifas livres.

Por outro lado, o uso de corantes tem sido cada vez mais importante para a caracterização morfológica de microrganismos. A maioria dos trabalhos utiliza corante apenas para melhorar o contraste das imagens que serão analisadas pelo *software* no computador. No entanto, é cada vez mais comum a utilização de corantes específicos, para a diferenciação entre células viáveis e não viáveis e para a caracterização do estudo fisiológico do microrganismo.

#### **2.14. *Streptomyces clavuligerus***

Grande parte dos bioprocessos aeróbios envolvem cultivos de microrganismos filamentosos como fungos e bactérias, como no caso o gênero de actinomicetos *Streptomyces*. Cultivos submersos geram caldos com elevada viscosidade aparente e comportamento não-Newtoniano, o que dificulta a transferência de oxigênio (SASSI et al., 1991; JÜSTEN et al., 1996; CERRI et al., 2009). Os actinomicetos do gênero *Streptomyces* produzem uma ampla gama de metabólitos secundários, incluindo agentes antimicrobianos, antifúngicos, anti-helmínticos, antitumorais, assim como herbicidas, pigmentos e outros, sendo responsáveis pela produção de mais de 80% dos antibióticos utilizados (CHALLIS e HOPWOOD, 2003).

A espécie *S. clavuligerus* pertence ao grupo de bactéria Gram-positiva, com forma de filamentos ramificados de cor cinza e altamente aeróbia, mas não é capaz de consumir glicose livre no meio de cultura, pois não possui um sistema de transporte de glicose (IVES e BUSHELL, 1997). Na Figura 2.18, pode-se observar este tipo de microrganismo com hifas com grande vitalidade, conforme mostra a técnica de fluorescência de viabilidade celular.

Uma importante característica desta espécie é o fato de produzir mais de 21 metabólitos secundários, incluindo antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Tais como o ácido clavulânico,

cefamicina C, deacetoxicefalosporina C, isopenicilina N, penicilina N entre outros (ROMERO, LIRAS, MARTIN, 1984).

Devido a sua característica fisiológica de forma filamentosa, a transferência de O<sub>2</sub> em cultivos destes microrganismos se faz dificultosa.

**Figura 2.18.** Bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus*, amostra correspondente a um meio de inóculo, pode ser observada a vitalidade do *clump*.

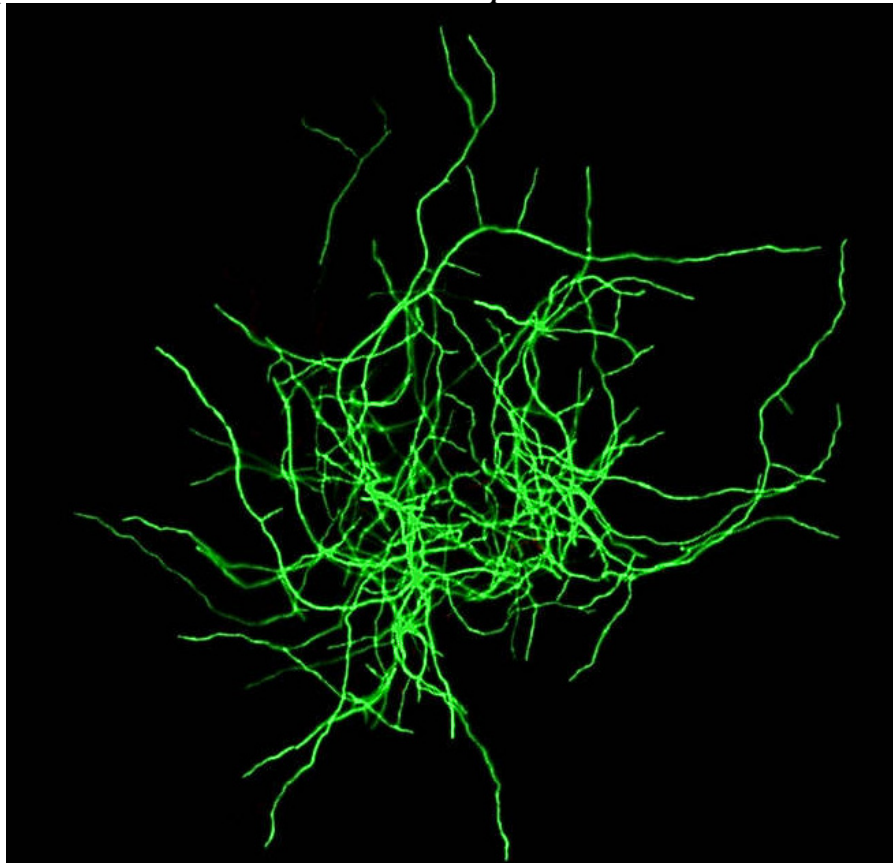


Foto com permissão Brittes (2012)

### **2.15. Produção de ácido clavulânico por *S. clavuligerus***

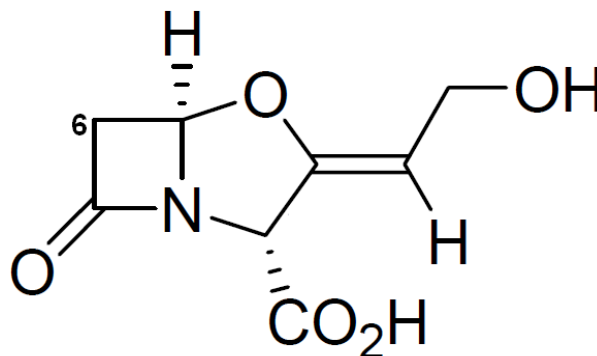
Ácido clavulânico é um composto de importância mundial, conhecido como um potente inibidor de  $\beta$ -lactamases, que protege os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos contra a hidrólise por união irreversível ao sítio ativo das  $\beta$ -lactamases. É utilizado em conjunto com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos como a amoxicilina ou ticarcilina, o que permitem que estes antibióticos recuperem sua eficácia e o seu espectro de ação (BAGGALEY; BROWN; SCHOFIELD, 1997).

A molécula do ácido clavulânico como outras clavamas apresentam dois anéis, o primeiro de quatro membros (anel  $\beta$ -lactâmico) e o segundo denominado anel oxazolidínico, que inclui um átomo de oxigênio em vez de um átomo do enxofre como ocorre na maioria de compostos  $\beta$ -lactâmicos clássicos, ver Figura 2.19.

O ácido clavulânico é tradicionalmente produzido em biorreator convencional tipo tanque agitado por *S. clavuligerus* em cultivos com glicerol e derivados de soja como fontes de carbono e nitrogênio (MAYER et al., 1996 e ROSA et al., 2005).

Rosa (2005) analisou a produção de ácido clavulânico em cultivos de *S. clavuligerus* em biorreator tanque agitado e aerado sob diferentes condições de agitação e aeração e verificou que a produção de ácido clavulânico foi afetada positivamente não apenas por altos valores de concentração de oxigênio dissolvido, mas também por altas frequências de rotação do impelidor, ou seja, a maior condição de cisalhamento favoreceu a produção desse composto  $\beta$ -lactâmico.

**Figura 2.19.** Estrutura química do ácido clavulânico pertencente à classe estrutural  $\beta$ -lactama apresentando uma potente atividade antibacteriana.



Existem vários trabalhos na literatura referentes à influência dos parâmetros nutricionais sobre a produção de antibióticos, assim como também poucos trabalhos que mostrem a relação entre parâmetros hidrodinâmicos e a produção de antibióticos (OLMOS et al., 2013).

Cerri e Badino (2012) estudaram o efeito da velocidade de cisalhamento na produção de ácido clavulânico em cultivos de *S. clavuligerus* em biorreator convencional tipo tanque agitado e em biorreator *airlift* de tubos concêntricos. Observaram que o maior cisalhamento favoreceu a produção de composto  $\beta$ -lactâmico, sendo obtidas maiores produções em biorreator não convencional *airlift* de cilindros concêntricos.

## **2.16. Considerações finais**

Embora existam muitos trabalhos com diferentes abordagens com relação aos efeitos do cisalhamento em cultivos submersos de células e microrganismos. Mas, não são encontrados trabalhos que quantifiquem e comparem especificamente a velocidade de cisalhamento em sistemas operados com diferentes impelidores, entre eles o orelha de elefante (*Elephant Ear*) nas configurações EEDP e EEUP em relação ao impelidor turbina Rushton, convencionalmente empregado em cultivos submersos. Muitos autores definem esses impelidores como sendo de baixo cisalhamento, mas nenhum trabalho quantifica o cisalhamento desses sistemas durante cultivos de microrganismos filamentosos que geram fluidos não-Newtonianos, avaliando seus efeitos no crescimento e na morfologia celular, bem como na produção do bioproduto de interesse.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

No presente trabalho propôs-se inicialmente uma metodologia para quantificar a  $\dot{\gamma}_m$  em um biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado de 4 L de capacidade útil operando com diferentes impelidores: TR, EEDP e EEUP. Utilizaram-se soluções de glicerol como fluidos Newtonianos e soluções de goma xantana como fluidos não-Newtonianos. Posteriormente numa segunda etapa foram realizados cultivos de *S. clavuligerus* para a produção de ácido clavulânico nos diferentes sistemas estudados (biorreator tipo tanque agitado e aerado com diferentes impelidores) sob mesmas condições de operação (800 rpm e 0,50 vvm) e avaliadas as influências da transferência de O<sub>2</sub> e das condições de cisalhamento no crescimento e na morfologia celular e na produção de ácido clavulânico.

#### **3.1. Avaliação da transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento em biorreator convencional com diferentes impelidores**

##### **3.1.1. Materiais**

###### **3.1.1.1. Biorreator**

Os experimentos foram realizados em um biorreator comercial tipo tanque agitado e aerado a escala de bancada, modelo Bioflo II C, New Brunswick Scientific, USA (Figura 3.1).

O biorreator dispõe de um vaso de vidro removível, com capacidade total de 5 L e volume útil de 4 L. O equipamento conta com um sistema de monitoramento e controle de temperatura, pH e agitação. O sistema é equipado com quatro chicanas opostas diametralmente e um aspersor tipo anel perfurado localizado na base do vaso. Na Figura 3.2 são mostradas as dimensões do sistema e no Quadro 1 são apresentados seus respectivos valores.

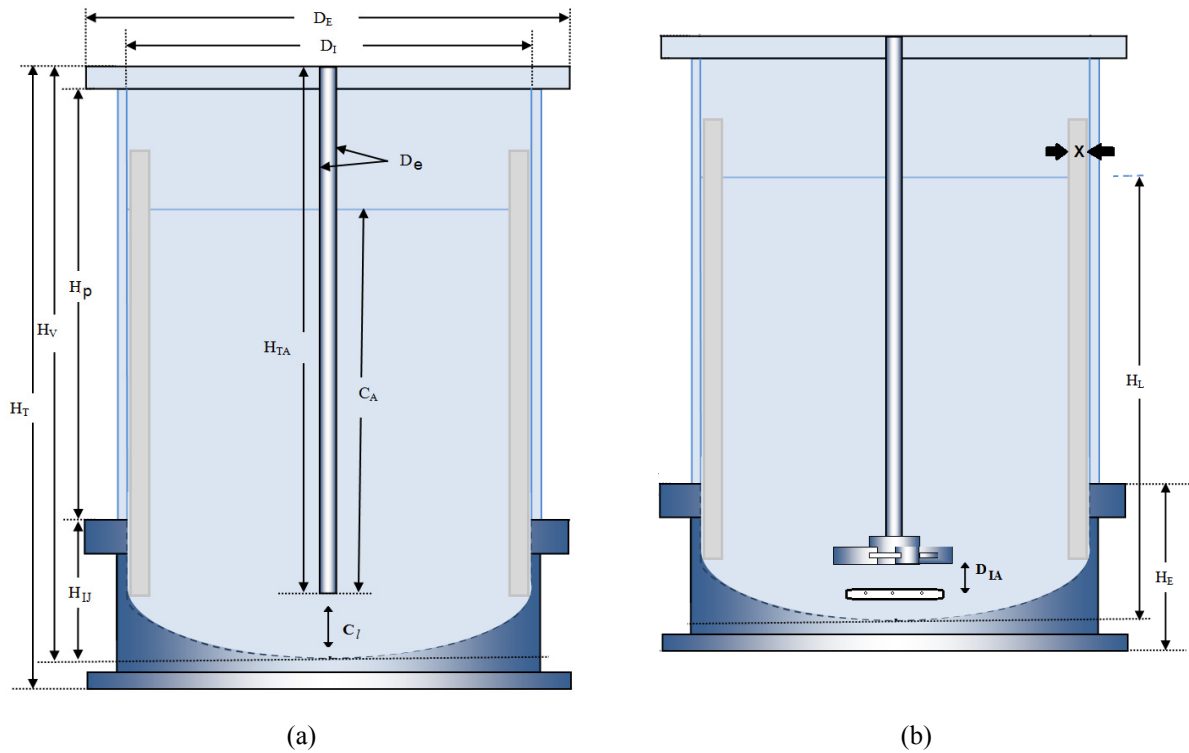


Figura 3.1. Biorreator Bioflo IIC (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Co., Inc.).



Fonte: arquivo próprio.

Figura 3.2. (a) Dimensões do biorreator utilizado e em (b) posição do aspersor em função ao impelidor.



Fonte: Arquivo próprio.

**Quadro 1. Apresentação das dimensões do biorreator Bioflo IIC da New Brunswick Scientific.**

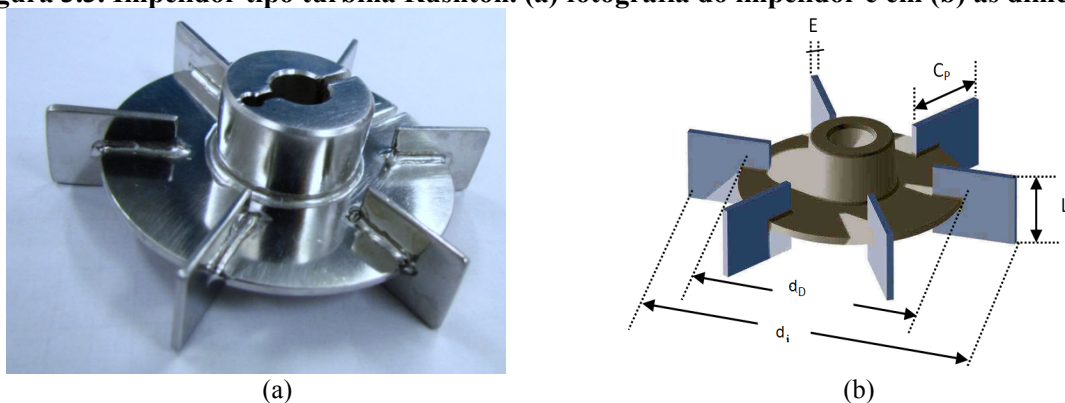
Parâmetro geométrico	Símbolo	Dimensão (m)
Diâmetro externo	$D_E$	0,200
Diâmetro interno	$D_I$	0,170
Largura da chicana	X	0,016
Altura total do reator	$H_T$	0,323
Altura da dorna	$H_V$	0,313
Altura plana do vaso (vidro parte reta)	$H_P$	0,218
Altura interna da camisa para troca térmica	$H_{IJ}$	0,089
Altura do fluido	$H_L$	0,192
Comprimento da base (camisa para troca térmica)	$H_E$	0,104
Altura total do agitador	$H_{TA}$	0,273
Comprimento do agitador no líquido	$C_A$	0,155
Diâmetro do eixo	$D_e$	0,010
Espaço livre do eixo até a base reator	$C_l$	0,037
Distância do aspensor	$D_{IA}$	0,019

### 3.1.1.2. Impelidores

Foram estudados três tipos de impelidores fornecidos pela firma New Brunswick Scientific (EUA).

- a) Duas turbinas Rushton (TR) ou com seis lâminas planas (*flat-blade*), conforme mostrado na Figura 3.3. No Quadro 2 são apresentadas as dimensões geométricas desse impelidor.

**Figura 3.3. Impelidor tipo turbina Rushton. (a) fotografia do impelidor e em (b) as dimensões.**



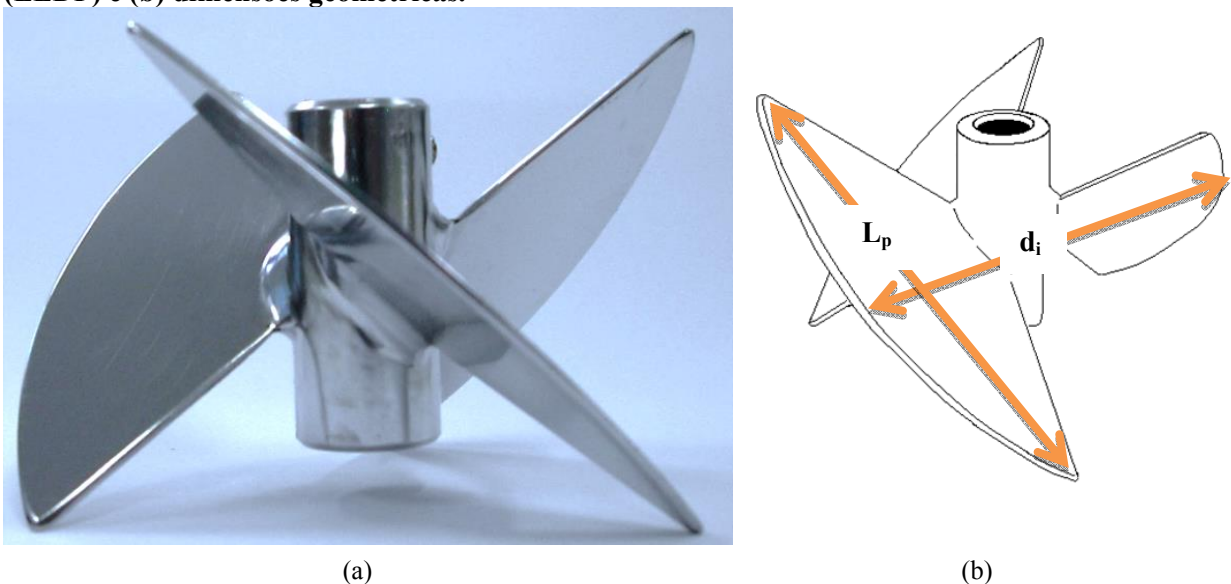
Fonte: Fig(a) Arquivo próprio.

Quadro 2. Dimensões do impelidor turbina Rushton.

Parâmetro geométrico	Símbolo	Dimensão (m)
Diâmetro do disco	$d_D$	0,063
Diâmetro do impelidor	$d_i$	0,076
Comprimento da pá	$C_P$	0,019
Largura da pá	$L_P$	0,016
Espessura da pá	$E$	$1,5 \times 10^{-3}$

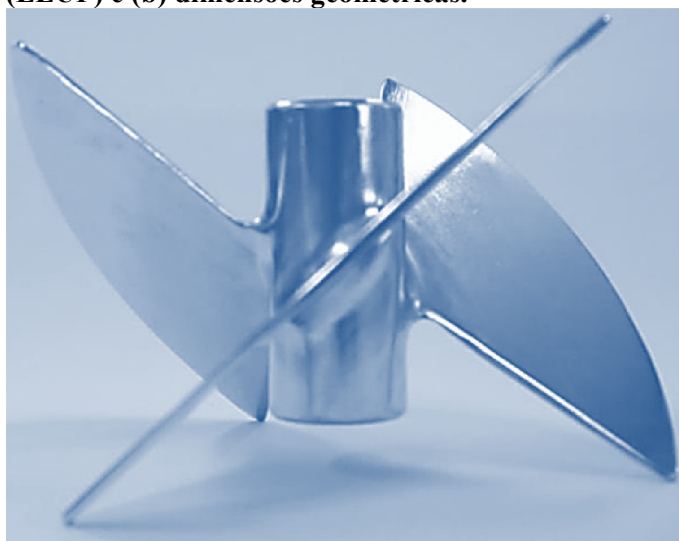
- b) Dois impelidores tipo orelha de elefante ou *Elephant Ear* (EE) com três lâminas foram empregados, um operando no modo de escoamento ascendente ou *up-pumping* (EEUP) e o outro no modo de escoamento descendente ou *down-pumping* (EEDP) com 0,08 m de diâmetro. Na Figura 3.4 e na Figura 3.5 podem ser observados esses impelidores e suas lâminas características que são fixas e planas inclinadas formando ângulo de  $45^\circ$ . No Quadro 3 são apresentadas suas dimensões.

Figura 3.4. Impelidor orelha de elefante (*Elephant Ear*): (a) modo de escoamento descendente (EEDP) e (b) dimensões geométricas.

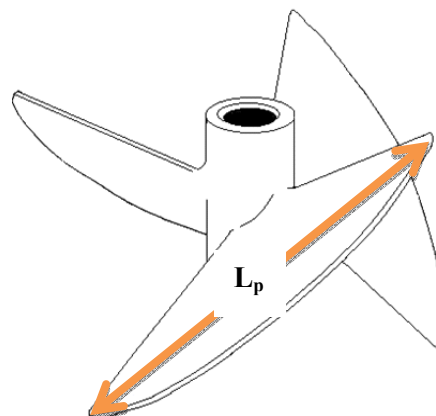


Fonte: Arquivo próprio.

Figura 3.5. Impelidor orelha de elefante (*Elephant Ear*): (a) modo de escoamento ascendente (EEUP) e (b) dimensões geométricas.



(a)



(b)

Fonte: Arquivo próprio.

Quadro 3. Dimensões geométricas dos impelidores *Elephant Ear*.

Parâmetro geométrico	Símbolo	Dimensão (m)
Diâmetro do impelidor	$d_i$	0,080
Largura da pá	$L_p$	0,073

### 3.1.1.3. Fluidos

Como fluidos Newtonianos foram utilizados cinco diferentes soluções de água-glicerol e, como fluidos não-Newtonianos foram empregados seis diferentes soluções aquosas de goma xantana. As viscosidades dinâmicas das soluções de solução de glicerol e os parâmetros reológicos ( $K$  e  $n$ ) das soluções de goma xantana foram obtidos em reômetro de cilindros concêntricos da Brookfield Engineering Labs, Inc. (USA), modelo LV-DVIII+. Todos os ensaios foram realizados em triplicata a 30 °C.

As soluções de glicerol foram adquiridas da LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda (Brasil), com pureza de 99,5% sendo foram utilizadas diferentes concentrações conforme mostrado na Tabela 3.1.

Foi utilizada a goma xantana Grinsted ULTRA 80, fornecida pela Danisco Brasil Ltda. Foram utilizadas seis diferentes soluções com características não-Newtonianas de fluido pseudoplástico, similar ao comportamento de caldos de cultivo, ditos valores de índice de consistência e ( $K$ ) e índice de comportamento de escoamento ( $n$ ) são apresentados na Tabela

3.2.

Tabela 3.1. Viscosidades dinâmicas das soluções aquosas de glicerol a 30 °C.

Soluções de glicerol	C (%v/v)	$\mu \times 10^3$ (Pa.s)	$\pm$
SG - 1	16	1,40	1,41421E-5
SG - 2	51	5,17	2,33345E-4
SG - 3	60	8,38	1,13137E-4
SG - 4	65	11,64	4,94975E-5
SG - 5	67	15,43	3,88909E-4

Tabela 3.2. Parâmetros reológicos das soluções da goma xantana a 30 °C.

Soluções de goma xantana	C (kg.m <sup>3</sup> )	K (Pa.s <sup>n</sup> )	$\pm$	n (-)	$\pm$
SGX - 1	1,0	0,15	0,00264	0,483	0,00312
SGX - 2	1,5	0,24	0,03025	0,436	0,02506
SGX - 3	2,0	0,51	0,00114	0,359	3,74477E-4
SGX - 4	2,5	1,01	0,0511	0,280	1,1131E-4
SGX - 5	3,0	1,47	0,01559	0,237	0,00192
SGX - 6	4,0	2,53	5,65803E-4	0,176	6,11991E-4

#### 3.1.1.4. Fluxômetro

Para o controle da vazão de alimentação de ar durante os ensaios foi utilizado um fluxômetro da COLE-PARMER, modelo 33116-22 na faixa de 0-5,0 L.min<sup>-1</sup>.

#### 3.1.1.5. Antiespumante

Para controle da espuma durante os ensaios *in vitro* e *in vivo* foi utilizado o antiespumante *Simethicone Emulsion* USP da Dow Corning Medical Antifoam C.

#### 3.1.1.6. Analisador de oxigênio dissolvido

A concentração de oxigênio dissolvido foi medida empregando um analisador de oxigênio dissolvido da Mettler-Toledo, modelo O<sub>2</sub> 4100e, conectado a sistema de aquisição de dados e computador o qual armazenava valores em intervalos regulares de tempo.

#### **3.1.1.7. Medidor de pressão**

Para medidas de pressão foi utilizado um medidor eletrônico de pressão eletrônico modelo SX990 da T&S Equipamentos eletrônicos.

#### **3.1.1.8. Eletrodo de O<sub>2</sub> dissolvido**

Foi utilizado um eletrodo de oxigênio dissolvido (InPro® 6800 da Mettler Toledo, com sensor de 12 mm), provido de membranas de silicone, para avaliação da transferência de oxigênio, e de teflon, durante cultivos de *S. clavuligerus*.

#### **3.1.1.9. Banho térmico**

As medidas de propriedades reológicas dos fluidos ( $\mu$ , K e n) e de consumo de potência foram realizadas mantendo a temperatura controlada a 30°C, fazendo o uso de um banho termostático com circulação da Fujitec, Brasil modelo 521-2D.

#### **3.1.1.10. Equipamento para medida da potência**

Nas medidas de potência foi utilizado um equipamento adaptado; empregando um motor de 0,4 kW da Ringcone modelo RXMV-400, com velocidade variável adquirido da Shimpo do Brasil Ltda. Para medidas do torque ( $T$ ) foi utilizado um dinamômetro digital da Kratos.

#### **3.1.1.11. Câmera digital**

Para estudo do padrão de escoamento e do diâmetro de bolhas foi utilizada uma câmera Canon PowerShot SX30IS (14.1 megapixels) fixada em tripé.

#### **3.1.1.12. Software para análise de imagem**

As imagens obtidas da câmera digital foram analisadas utilizando Image-Pro® Plus™ software (6.0 Media Cybernetics, USA). O método requer um procedimento preliminar de calibração espacial (escala em milímetros e/ou micrometros). As imagens foram tratadas em computador da Intel-Core i7-2670QM 2.2GHz.

### 3.1.2. Métodos

#### 3.1.2.1. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) pelo método da pressão

A determinação do  $k_L a$  baseou-se no balanço de massa para o oxigênio na fase líquida durante um ensaio degrau, dada pela Equação (3.1):

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \cdot (C_s - C) \quad (3.1)$$

Integrando a Equação (3.1) e tomando-se limite inferior de integração  $C = C_0$  e  $t = t_0$ , tem-se:

$$\ln\left(\frac{C_s - C}{C_s - C_0}\right) = -k_L a \cdot (t - t_0) \quad (3.2)$$

Rearranjando a Equação 3.2, obtém-se a Equação (3.3):

$$C = C_s = (C_s - C_0) \cdot e^{-k_L a \cdot (t - t_0)} \quad (3.3)$$

A estimativa de  $k_L a$  pela Equação (3.3) estaria correta se o eletrodo medisse a concentração real de oxigênio dissolvido. No entanto, deve-se levar em conta o atraso da resposta do eletrodo devido ao fato do oxigênio dissolvido no seio do líquido difundir através da membrana do eletrodo que isola o meio líquido, até da superfície do catodo, onde o oxigênio é reduzido gerando o fluxo de elétrons.

Aiba et al. (1973), propuseram um modelo de primeira ordem com o intuito de corrigir o atraso de resposta do eletrodo, como mostra a Equação (3.4):

$$\frac{dC_e}{dt} = k_e \cdot (C - C_e) \quad (3.4)$$

Sendo:

$$k_e = 1/\tau_e \quad (3.5)$$

onde  $k_e$  é a constante de atraso do eletrodo,  $\tau_e$  é o tempo de resposta do eletrodo, o qual é determinado como sendo igual ao tempo que o sinal do eletrodo ( $C_e$ ) leva para atingir 63,2 % de seu máximo valor. A constante de atraso do eletrodo ( $k_e$ ) foi calculada como sendo o inverso do tempo de resposta. O tempo de resposta obtido foi de 8,26 s (tempo obtido por triplicata) e a constante de atraso do eletrodo igual a 0,121 s<sup>-1</sup>.

A integração da equação resultante da substituição da Equação (3.4) na Equação (3.3) com a condição inicial  $C_e = C_{e_0}$  e  $t = t_0$ , leva à obtenção da Equação (3.6):

$$C_e = C_{e_0} \cdot e^{-k_e \cdot (t-t_0)} + C_{e_s} \cdot (1 - e^{-k_e \cdot (t-t_0)}) + \frac{k_e \cdot (C_{e_s} - C_{e_0})}{k_e - k_{L,a}} \cdot (e^{-k_e \cdot (t-t_0)} - e^{-k_{L,a} \cdot (t-t_0)}) \quad (3.6)$$

Assim, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ) é obtido através do ajuste da Equação (3.6) aos valores experimentais de concentração de oxigênio dissolvido adquirido pelo eletrodo ( $C_e$ ) ao longo do tempo, utilizando o método de mínimos quadrados não linear, baseado no algoritmo de Marquardt (1963) (com 95% de confiança) conhecendo previamente o valor de  $k_e$ .

As medidas  $k_{L,a}$  foram determinadas pelo método dinâmico da pressão (MDP) (BLAŽEJ et al., 2004). Neste método, a pressão no interior do biorreator foi abruptamente alterada de 100 para aproximadamente 115 kPa, sendo o sinal do eletrodo de oxigênio armazenado ao longo do tempo. Os autores indicam que uma variação simultânea na concentração de oxigênio em todas as bolhas presentes na dispersão foi originada independentemente do padrão de escoamento.

### **3.1.2.2. Determinação da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ )**

O vínculo de  $\dot{\gamma}_m$  como um parâmetro de transferência característico foi proposto originalmente por Nishikawa et al. (1977). Os autores analisaram sistemas de fluidos não-Newtonianos por analogia com soluções Newtonianas para determinar a relação linear entre a  $\dot{\gamma}_m$  e a velocidade superficial do gás ( $U_G$ ) num biorreator tipo coluna de bolhas. Os autores utilizaram o coeficiente convectivo de transferência de calor na parede externa da serpentina de refrigeração imersa numa coluna de bolhas encamisada. Recentemente esta teoria foi modificada por Cerri et al. (2008), que utilizou o  $k_{L,a}$  como parâmetro característico para



avaliar  $\dot{\gamma}_m$  em um biorreator *airlift* de tubos concêntricos e, posteriormente, o método foi adaptado por Campesi et al. (2009) para um biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado. O trabalho de Campesi et al. (2009) que correlacionou  $\dot{\gamma}_m$  com variáveis de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) e com propriedades reológicas do fluido ( $K$  e  $n$ ) através de uma análise baseada na analogia de sistemas Newtonianos e não-Newtonianos utilizando o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio como um parâmetro característico. A escolha do  $k_{La}$  como um parâmetro característico para avaliar a  $\dot{\gamma}_m$  foi baseada no fato que a transferência de oxigênio ocorre através da área interfacial das bolhas de ar e é distribuído uniformemente no biorreator.

A velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) pode ser obtida a partir da tensão de cisalhamento pela Lei de Newton, para fluidos Newtonianos, ver Equação (2.31). Para fluidos não-Newtonianos, como o pseudoplásticos, a relação entre a velocidade e a tensão de cisalhamento é não linear, sendo descrita pelo modelo da Lei de Potência, ver Equação (2.33) para  $n < 1$ .

Analogamente aos fluidos Newtonianos,  $\mu_{ap}$  para fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos pode ser expressa como:

$$\mu_{ap} = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (3.7)$$

Isolando  $\dot{\gamma}$ , obtém-se a Equação (3.8):

$$\dot{\gamma} = \left( \frac{\mu_{ap}}{K} \right)^{\frac{1}{n-1}} \quad (3.8)$$

No presente trabalho, a avaliação de  $\dot{\gamma}_m$  com base no coeficiente  $k_{La}$  é descrita como se segue. Primeiramente, valores de  $k_{La}$  foram obtidos para os sistemas Newtonianos (soluções de glicerol) e correlacionados com  $N$ ,  $\phi_{ar}$  e com  $\mu$  pela Equação (3.9):

$$k_{La} = b \cdot N^c \cdot \phi_{ar}^d \cdot \mu^e \quad (3.9)$$

Para sistemas não-Newtonianos (soluções de goma xantana), valores experimentais de  $k_{La}$  foram obtidos para diferentes valores de frequência de rotação ( $N$ ) e vazão específica de alimentação de  $\phi_{ar}$ . A Equação (3.9) é válida tanto para fluidos Newtonianos quanto para não-Newtonianos, substituindo  $\mu$  da Equação 3,9 por  $\mu_{ap}$  da Equação (3.7), e teremos a Equação (3.10):

$$k_L a = b \cdot N^c \cdot \phi_{ar}^d \cdot (K \cdot \dot{\gamma}^{n-1})^e \quad (3.10)$$

Posteriormente obtém-se a Equação (3.11) a partir da Equação (3.10) que apresenta a  $\dot{\gamma}_m$  como uma função das condições de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ), do coeficiente  $k_L a$  e dos parâmetros reológicos  $K$  e  $n$ .

$$\dot{\gamma}_m = \left[ \frac{k_L a}{b \cdot N^c \cdot \phi_{ar}^d \cdot K^e} \right]^{\frac{1}{e \cdot (n-1)}} \quad (3.11)$$

Os dados de  $k_L a$  para sistemas não-Newtonianos foram correlacionados com as variáveis  $N$ ,  $\phi_{ar}$ ,  $K$  e  $n$ , de acordo com a Equação (3.12):

$$k_L a = f \cdot N^g \cdot \phi_{ar}^h \cdot K^i \cdot n^j \quad (3.12)$$

Por substituição da Equação (3.12) em (3.11), obtém-se a Equação (3.13), que expressa a velocidade de cisalhamento média como função de  $N$ ,  $\phi_{ar}$  e dos parâmetros reológicos do fluido não-Newtoniano:

$$\dot{\gamma}_m = \left( \frac{f \cdot N^g \cdot \phi_{ar}^h \cdot K^i \cdot n^j}{b \cdot N^c \cdot \phi_{ar}^d \cdot K^e} \right)^{\frac{1}{e \cdot (n-1)}} \quad (3.13)$$

A Equação (3.13) também pode ser escrita da forma que segue:

$$\dot{\gamma}_m = \left[ (x \cdot N^y \cdot \phi_{ar}^z \cdot K^w \cdot n^j) \right]^{\frac{1}{e \cdot (n-1)}} \quad (3.14)$$

Onde:  $x = f/b$ ;  $y = g - c$ ;  $z = h - d$ ;  $w = i - e$ .

### 3.1.2.3. Medidas da retenção gasosa

A retenção gasosa global foi determinada através de medidas de expansão do volume em triplicata, isto é, foram realizadas medidas da altura do líquido não gaseificado ( $h_L$ ) e da altura da dispersão ( $h_D$ ) em diferentes condições de agitação e aeração.

A retenção gasosa global ( $\varepsilon_G$ ) foi calculada pela Equação (3.15) (ZHU et al. 2009):

$$\varepsilon_G = \frac{h_D - h_L}{h_L} \quad (3.15)$$

#### **3.1.2.4. Medidas de consumo de potência**

A metodologia está descrita no trabalho do Badino, Barboza e Hokka (1994b). Foi utilizado um sistema automatizado em diferentes condições de agitação ( $N$ ) e aeração ( $\Phi_{ar}$ ) a fim de obter valores de consumo de potência para sistemas não gaseificados ( $P_0$ ) e gaseificados ( $P_g$ ). A potência ( $P$ ) é calculada como o produto do torque ( $T$ ) requerido para a agitação do fluido pela velocidade angular ( $\omega$ ) sendo a Equação 3.16:

$$P = T \cdot \omega \quad (3.16)$$

O torque requerido para a agitação do fluido pelo impelidor é o mesmo torque calculado pelo produto entre a força medida pelo dinamômetro ( $F$ ) e o comprimento do braço ( $br$ ) fixado ao mesmo motor apoiado num rolamento e livre para movimentação angular na Equação 3.17:

$$T = F \cdot br \quad (3.17)$$

Sendo  $br=0,245$  m e  $\omega = 2 \cdot \pi \cdot N$  a velocidade angular do eixo do agitador, logo o consumo de potência é expresso pela Equação 3.18:

$$P = 1,54 \cdot F \cdot N \quad (3.18)$$

Para o sistema não gaseificado, pode-se calcular o número de potência ( $N_p$ ) a partir do consumo de potência ( $P_0$ ) pela Equação (3.19):

$$N_p = \frac{P_0}{\rho_L \cdot N^3 \cdot d_i^5} \quad (3.19)$$

Para sistemas gaseificados o  $N_p$  é calculado a partir de:

$$N_p = \frac{P_g}{\rho_L \cdot N^3 \cdot d_i^5} \quad (3.20)$$

## 3.2. Avaliação de transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento em cultivos de *Streptomyces clavuligerus*

### 3.2.1. Materiais

#### 3.2.1.1. Microrganismo

Para os cultivos foi utilizada a linhagem de *S. clavuligerus* ATCC 27064, considerado produtor potencial de ácido clavulânico. O criotubo foi conservado numa solução de glicerol 10% v/v em -80 °C.

#### 3.2.1.2. Médios de cultura

O meio de cultura de reativação utilizado foi proposto por Rosa et al. (2005), sendo sua composição apresentada a seguir:

**Quadro 4. Composição do médio de cultura de reativação da linhagem *S. clavuligerus*.**

Componente	(g.L <sup>-1</sup> )
Glicerol	15,00
Peptona bacteriológica	10,00
Extrato de malte	1,00
Extrato de levedura	1,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,80
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,0001
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001
MOPS (*)	21,00
pH	6,8

(\*) Tampão ácido3-N-morfolino propanesulfônico (MOPS).

A composição dos meios de cultura de crescimento e produção utilizados nos cultivos é apresentada no Quadro 5 (TEODORO et al., 2006).

**Quadro 5. Composição dos meios de crescimento de *S. clavuligerus* e produção de ácido clavulânico (Teodoro et al., 2006).**

<b>Componente</b>	<b>(g.L<sup>-1</sup>)</b>
Glicerol	15,0
Proteína isolada de soja	25,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,0001
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001
MOPS (*)	21,0
pH	6,8

(\*) Não foi utilizado no médio de produção no biorreator.

### **3.2.1.3. Mesa incubadora**

Na realização das duas primeiras etapas dos cultivos (reativação e crescimento) foi utilizada uma mesa incubadora rotativa da Nova Ética, com controle de temperatura e agitação.

### **3.2.1.4. Autoclaves**

O material envolvido nos cultivos como biorreatores, meios de cultura, soluções de ácido e base, vidraria, etc., foram esterilizados em autoclave modelo 103 da FABBE-PRIMAR Industrial a 1,2 kgf/cm<sup>2</sup> e 121°C por 20 min.

### **3.2.1.5. Câmara asséptica**

Para garantir uma manipulação asséptica do microrganismo foi utilizada uma câmara de fluxo laminar da marca VECO, contendo um bico de Bunsen e lâmpada germicida UV.

#### **3.2.1.6. Ultrafreezer**

As amostras para análise de glicerol bem como os criotubos contendo os microrganismos foram armazenados em um ultrafreezer FORMA SCIENTIFIC a temperatura de -80 °C.

#### **3.2.1.7. Espectrofotômetro UV/Vis**

Utilizou-se um espectrofotômetro digital da Amersham Pharmacia Biotech ULTROSPEC, modelo 2100 Pro UV/Vis para análise do ácido clavulânico.

#### **3.2.1.8. Solução de coloração**

Como reagente de coloração dos micélios do microrganismo em estudo foi utilizada uma solução preparada da seguinte forma: 0,3 g de azul de metileno, dissolvido em 30 mL de etanol 95% (v/v) completando até 100 mL do volume com água destilada.

O azul de metileno (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>SCl. 3H<sub>2</sub>O, PM: 373,90) foi adquirido da LABSYNTH produtos para laboratório Ltda.

#### **3.2.1.9. Microscópio óptico e câmera digital**

A morfologia do microrganismo foi examinada a partir de amostras diluídas em microscópio óptico Olympus BX50 com ampliação de 4, 10 e 20x na objetiva e 10x na ocular. Com auxílio de uma câmera instalada no microscópio foram observadas as imagens em microcomputador.

### **3.2.2. Métodos**

#### **3.2.2.1. Avaliação da velocidade cisalhamento media ( $\dot{\gamma}_m$ ) em cultivos de *Streptomyces clavuligerus***

Para avaliar a influência da  $\dot{\gamma}_m$  nos cultivos de *S. clavuligerus* foram realizados ensaios com cada tipo de impelidor (TR, EEDP, EEUP). Cada ensaio foi realizado em duplicata, considerando as mesmas condições de agitação (N = 800 rpm) e aeração ( $\phi_{ar} = 0,40$  vvm). Em cada cultivo foi avaliada a alteração da morfologia do microrganismo, assim como a produção de ácido clavulânico dependente do ambiente hidrodinâmico durante todo o processo.

### **3.2.2.2. Crescimento celular**

O crescimento celular foi determinado indiretamente pela medida do índice de consistência (K) a partir do ajuste do modelo da “lei da potência” a reogramas (valores experimentais de  $\tau$  em função de  $\dot{\gamma}$ ) a cada 6 horas para cada cultivo com diferentes impelidores. É importante acompanhar a reologia do caldo, já que a literatura mostra que o K é o parâmetro mais apropriado para inferir o crescimento celular a partir de caldos que contém partículas insolúveis como é o caso de caldos de fermentação complexos, sendo também indicado para cultivos envolvendo microrganismos filamentosos. (BADINO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 1999); (TEODORO et al., 2006).

### **3.2.2.3. Análise de imagens**

Foi empregada a metodologia proposta por Pinto et al. (2004) e utilizada por Pamboukian; Guimaraes; Facciotti (2002), para a análise de imagens. Utilizando o corante azul de metileno, foram preparados esfregaços das células em lâmina e posteriormente coradas. Este procedimento garantiu que as amostras obtidas apresentassem grande estabilidade permitindo a manipulação destas e mesmo a realização de medições horas e mesmo dias após o processo de fixação dos micélios na lâmina.

### **3.2.2.4. Análise de ácido clavulânico (AC)**

O método de Bird et al. (1982) foi utilizado para determinação do ácido clavulânico. O método consiste na leitura da absorbância em espectrofotômetro a 311 nm do produto da derivatização do AC com reagente imidazol. As amostras retiradas a cada 6 h eram centrifugadas a 4 °C a 3250·g por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para análise.

### **3.2.2.5. Análise de glicerol (AG)**

A concentração de glicerol foi determinada por método enzimático utilizando um kit para teste para determinação de triglicerídeos GPO-PAP (Laborlab, Brasil) (COSTA e BADINO, 2012).

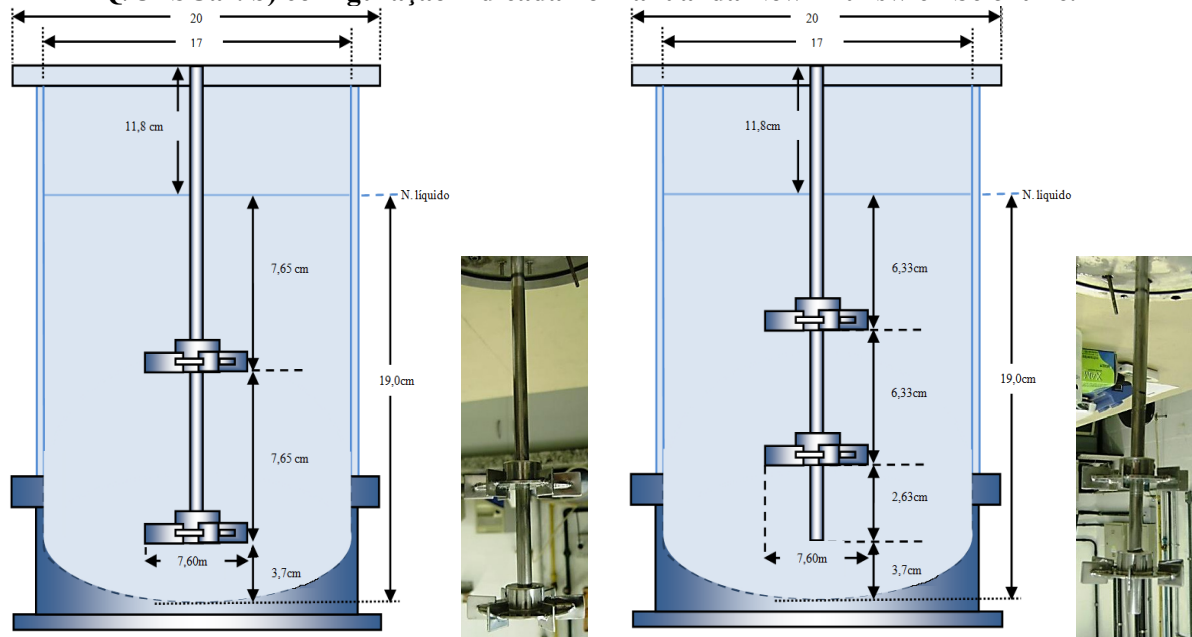
## 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.1. Transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento com diferentes impelidores

#### 4.1.1. Teste preliminar localização do impelidores TR no biorreator

Inicialmente foram testadas duas diferentes configurações com relação à disposição dos impelidores TR no eixo do biorreator. Uma primeira configuração frequentemente utilizada em trabalhos anteriores no Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, representada na Figura 4.1 (a) e uma segunda configuração indicada por normas contidas no manual do usuário da New Brunswick Scientific. Na segunda configuração analisada (Figura 4.2 (b)), os impelidores dividem o fluido em três frações iguais no tanque. A primeira configuração foi a melhor opção a ser utilizada nos experimentos posteriores em função da melhor transferência de oxigênio apresentada.

**Figura 4.1. Localização dos impelidores no eixo do agitador: (a) configuração empregada no LEB-DEQ/UFSCar. b) configuração indicada no manual da New Brunswick Scientific.**



(a)

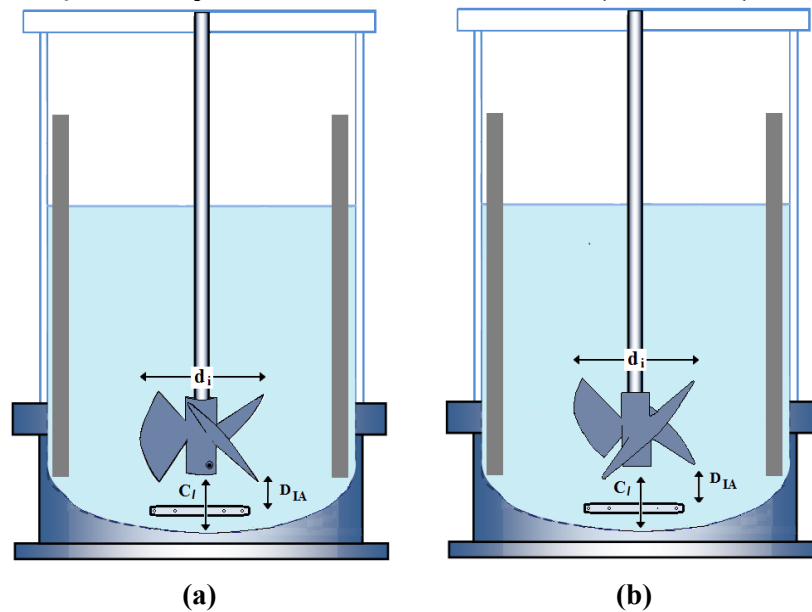
(b)

Fonte: arquivo próprio.



Conforme explicado anteriormente, foram utilizadas duas unidades de impelidores TR por eixo de reator. Para os ensaios com impelidores orelha de elefante (EE) foi utilizada apenas uma unidade para cada configuração de escoamento ascendente e descendente. A Figura 4.2 ilustra os posicionamentos utilizados para esses impelidores. O espaço livre a partir da base do biorreator para todos os impelidores foi  $C_I = 0,037$  m com as seguintes relações geométricas:  $(d_i/D_T)_{RT} = 0,450$  m e  $(d_i/D_T)_{EEDP} = (d_i/D_T)_{EEUP} = 0,471$  m e  $(D_T/H_L)_{EE} = 0,890$ .

**Figura 4.2. Localização dos impelidores dentro do biorreator. a) EEDP e b) EEUP.**



Fonte: arquivo próprio.

#### **4.1.2. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) pelo Método da Pressão.**

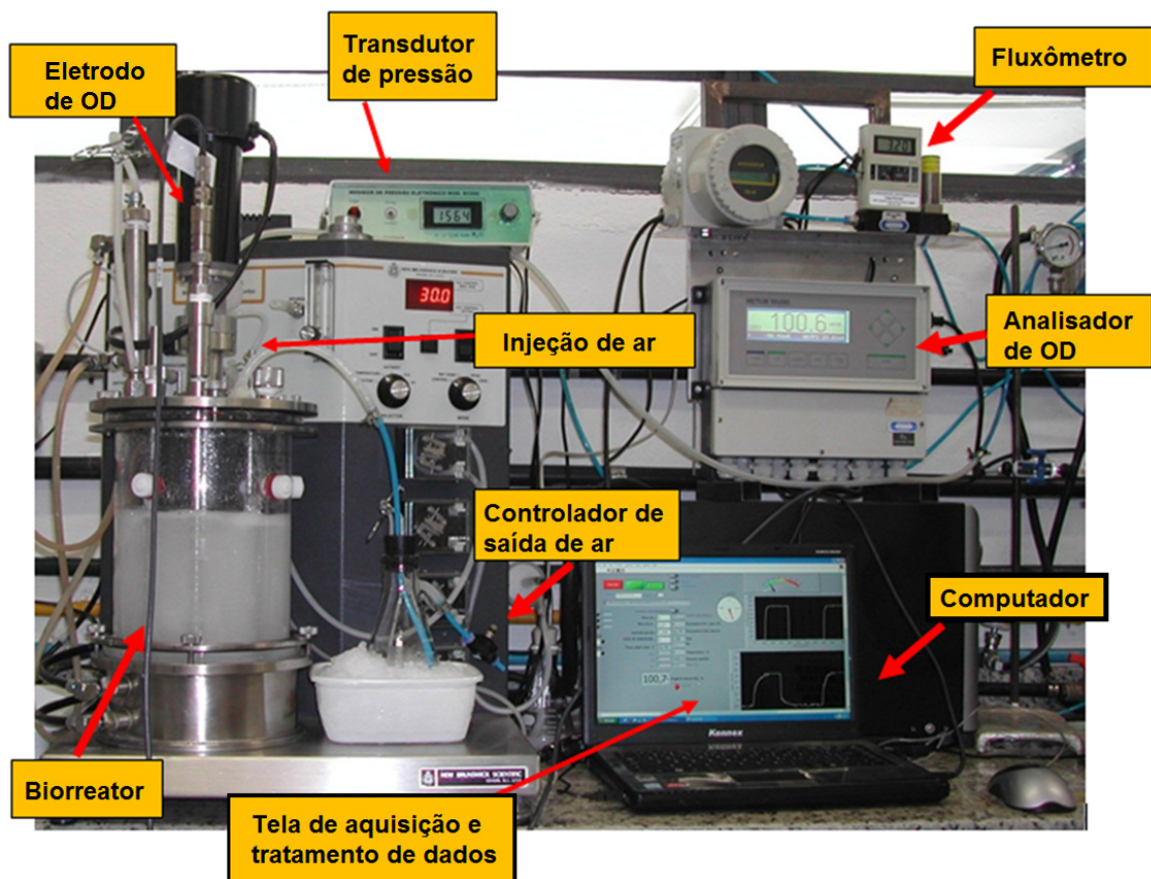
Para desenvolver esta etapa do estudo foi necessário realizar a montagem do sistema ilustrada na Figura 4.3.

Para obter as medidas de  $k_L a$ , inicialmente era realizada a calibração do 0% de concentração de OD pela passagem de uma corrente de  $N_2$  pelo biorreator. Em seguida, para cada condição agitação ( $N$ ) e aeração ( $\phi_{ar}$ ) do meio líquido foi aplicada uma sobre pressão no biorreator pelo fechamento parcial de uma válvula agulha instalada na saída de ar, seguida da calibração do transdutor de pressão num valor aproximado de 15 kPa ( $\sim 0,15$  atm) e da calibração da concentração de saturação de OD em 100%. Posteriormente, liberava-se uma segunda saída de ar isenta de válvula, de forma que a pressão manométrica zera-se no interior

do biorreator. A seguir, iniciava-se a agitação ( $N$ ) e aeração ( $\phi_{ar}$ ) do meio líquido nas condições em que se pretendia obter o valor do  $k_{L,a}$  e, subitamente, a saída do biorreator isenta de válvula era novamente fechada sendo a partir deste momento registrados os valores de concentração de OD lida pelo sistema eletrodo/analizador ( $C_e$ ) ao longo do tempo ( $t$ ). O valor de  $k_{L,a}$  foi determinado a partir do ajuste da Equação (3.6) aos valores experimentais de concentração de OD ( $C_e$ ) ao longo do tempo, utilizando o algoritmo de Marquardt (com 95% de confiança), conhecendo valor de  $k_e$ , obtido previamente a partir de um ensaio degrau expondo o eletrodo em atmosferas de  $N_2$  e de ar.

Para cada condição de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) foram obtidos valores de  $k_{L,a}$  a partir de ensaios em triplicata.

**Figura 4.3. Sistema empregado para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ).**

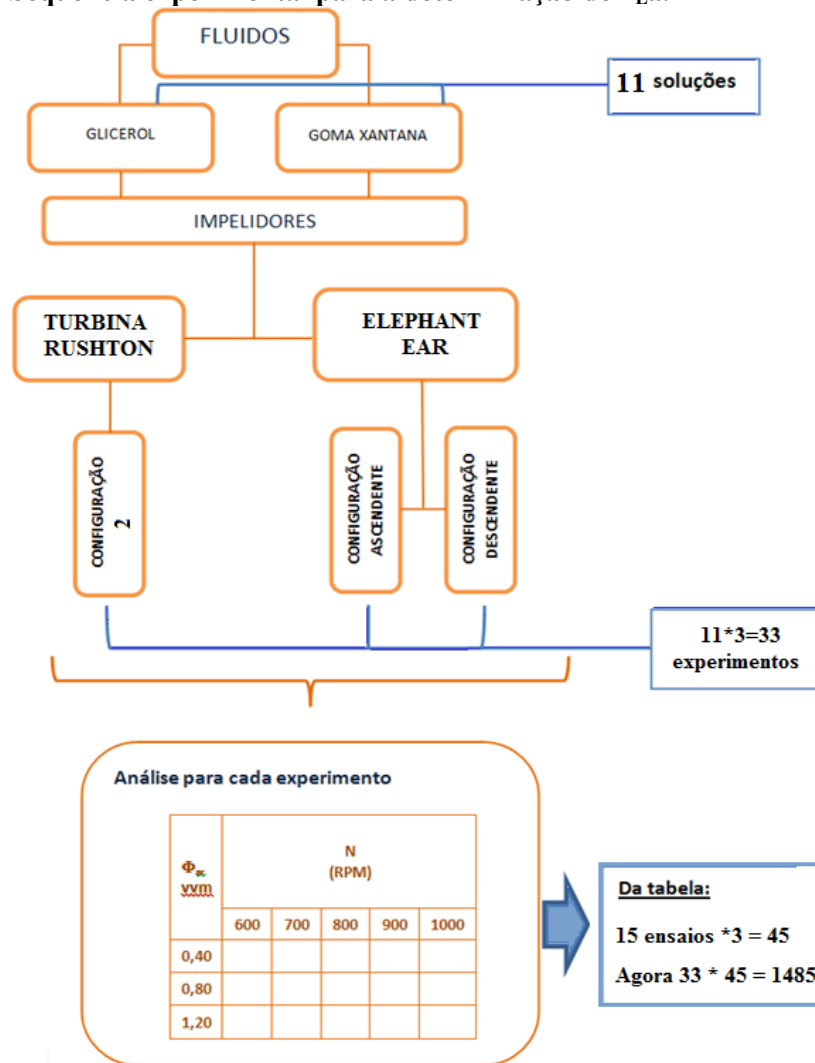


Fonte: arquivo próprio.

Para os três sistemas experimentais (TR, EEUP e EEDP) foram obtidos valores do  $k_{L,a}$  para cinco soluções de glicerol (fluido Newtoniano) e seis soluções de goma xantana (fluido

não-Newtoniano) em cinco diferentes condições de agitação ( $N = 600, 700, 800, 900$  e  $1000$  rpm) e três vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_a = 0,40; 0,80$  e  $1,20$  vvm ) para cada fluido, totalizando cerca 500 valores experimentais de  $k_L a$ . A Figura 4.4 mostra esquematicamente a sequência de ensaios descritos previamente para ambos os fluidos.

Figura 4.4. Sequência experimental para a determinação de  $k_L a$ .



Fonte: arquivo próprio.

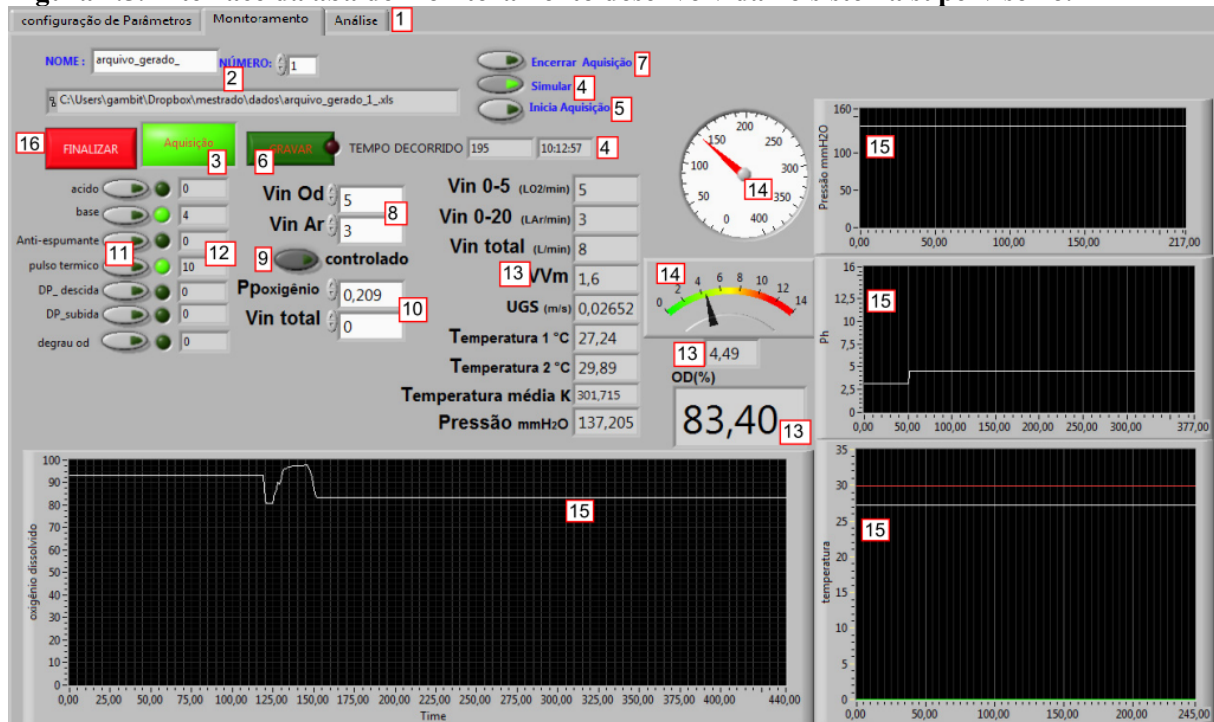
#### 4.1.3. Software para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O sistema de aquisição e tratamento de dados utilizado no presente trabalho foi desenvolvido por Torresam (2013). Este software torna mais rápida a determinação de  $k_L a$

uma vez que além de adquirir os dados o sistema a apresenta uma rotina interna de programação para a determinação de  $k_La$  a partir do ajuste da Equação (3.6). O programa utiliza o método de Levenberg-Marquardt como algoritmo de otimização para determinar o valor de  $k_La$ , que minimiza o erro entre os valores calculados pelo modelo e os dados experimentais (função objetivo com estrutura de mínimos quadrados). A convergência da busca rápida e, além do valor do parâmetro, o algoritmo também fornece o resíduo do ajuste e o erro padrão associado ao parâmetro.

A interface desenvolvida utilizando a plataforma LabVIEW 8.2 (do inglês *Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench*) da National Instrument. O sistema foi organizado de modo a facilitar a visualização dos dados obtidos do biorreator na tela principal (Figura 4.5), possibilitando monitorar a vazão de alimentação de ar e a pressão exercida no sistema e a concentração de OD ao longo do tempo, bem como determinar o  $k_La$ .

Figura 4.5. Interface da aba de monitoramento desenvolvida no sistema supervisorio.



Fonte: Dissertação de mestrado Gabriel Deriggi Torresam (2013)

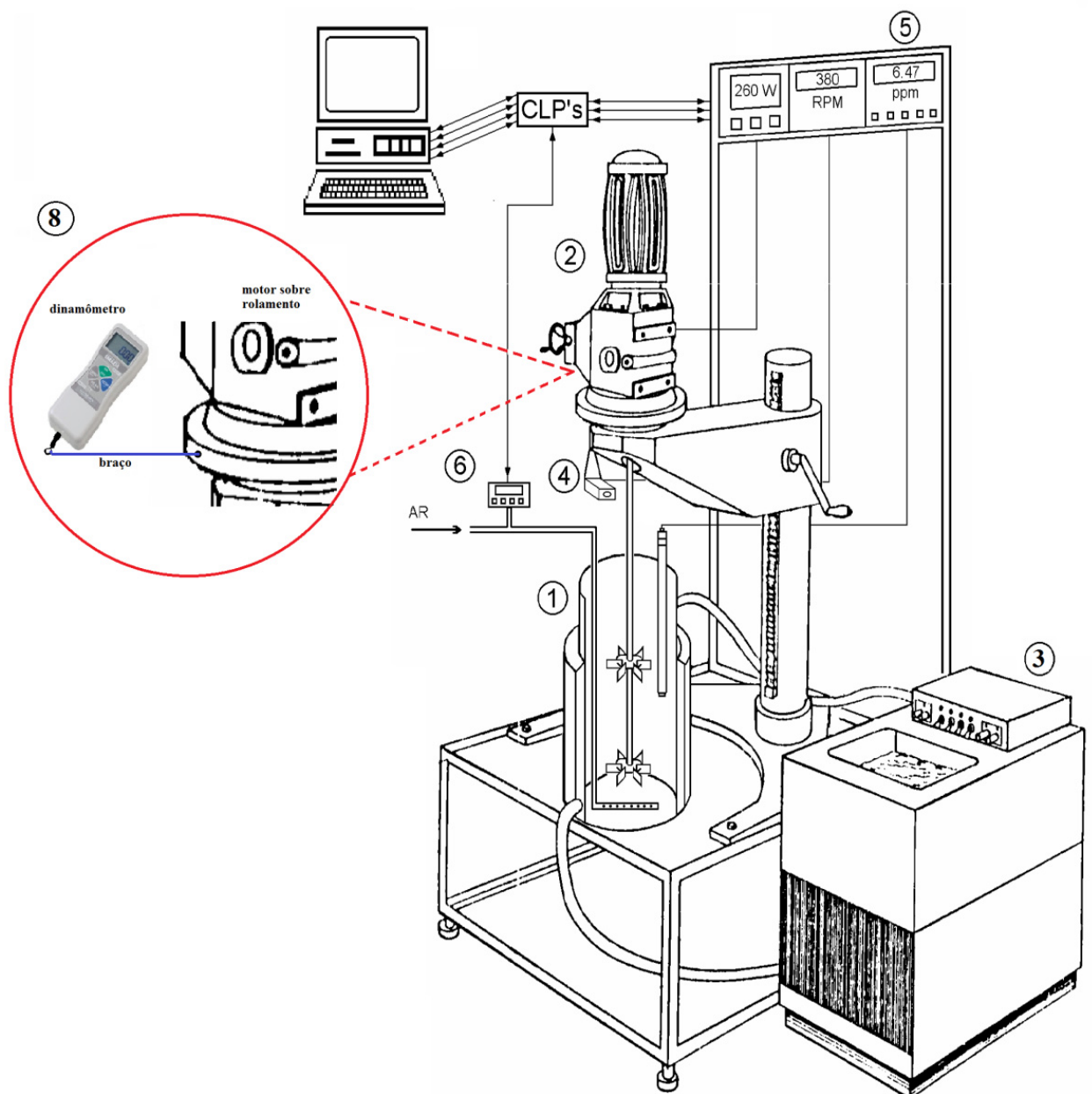
#### 4.1.4. Consumo de potência

Foram realizadas medidas de consumo de potência no sistema de agitação com 4 L de capacidade útil, provido dos impelidores TR, EEDP e EEUP utilizando dois fluidos

Newtonianos: água ( $\mu=0,000797$  Pa.s) e solução de glicerol SG-5 a 30 °C ( $\mu=0,01543$  Pa.s). Utilizaram-se quatro vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}=0,0; 0,40; 0,80$  e 1,20 vvm) e dez condições de agitação ( $N=100$  até 1000 rpm). Todos os ensaios foram realizados em triplicata a uma temperatura controlada de 30°C.

O sistema experimental ilustrado na Figura 4.6 foi proposto para medidas de consumo de potência por Badino, Barboza e Hokka (1994 b).

**Figura 4.6. Conjunto experimental semelhante utilizado para medida de consumo de potência: 1. Biorreator agitado Bioflo IIC, 2. Motor, 3. Banho termostatizado, 4. Fototacômetro, 6. Fluxômetro, 7. Indicador de frequência (indicador de potência), 8. Dinamômetro e braço.**



Fonte: Adaptado a Badino, Barboza e Hokka (1994b)

A frequência de rotação do agitador (N) foi medida por um fototacômetro digital, a vazão de alimentação de ar foi controlada por fluxômetro e o consumo de potência (P) foi calculado pela Equação (3.18) a partir de medidas de força (F) obtidas a partir de um dinamômetro.

#### **4.1.5. Dissipação de Energia e Microescala de turbulência de Kolmogorov ( $\eta_K$ )**

Como foi explicado na seção 2.11, a microescala de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) ou o tamanho dos pequenos turbilhões (em  $\mu\text{m}$ ) é função da dissipação da energia  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  (em W/kg) e da viscosidade cinemática do fluido ( $\nu$ ). Esse parâmetro é considerado de grande importância nestes processos devido ao fato de estar associado diretamente com as condições de cisalhamento impostas às células. Valores de  $(\eta_K)$  e de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  foram calculados pelas Equações (2.46) e (2.49), respectivamente.

Valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  e de  $(\eta_K)$  foram avaliados *in vitro* em dois fluidos, um deles com uma viscosidade cinemática  $10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , ou seja, uma suspensão aquosa como fluido Newtoniano (FN) sem aeração e uma solução de goma xantana de viscosidade aparente elevada (SGX-5) como fluido não-Newtoniano (FNN). Valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  e de  $(\eta_K)$  foram também avaliados *in vivo* durante os cultivos utilizando a viscosidade cinemática obtida a partir dos valores de  $\dot{\gamma}_m$ .

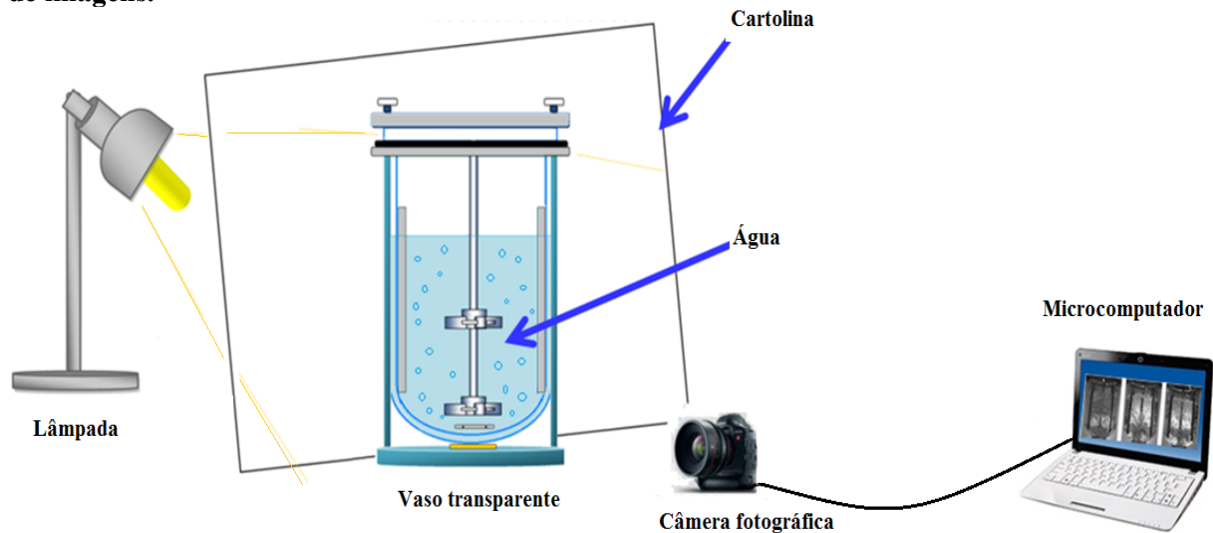
#### **4.1.6. Aquisição de imagens para determinação do tamanho médio das bolhas**

Foi utilizada a técnica de análise de imagem a partir de uma série de fotografias e vídeo do sistema através da parede do vaso. O esquema experimental está mostrado na Figura 4.7. Nesse sistema foi utilizado um vaso de vidro transparente com as mesmas características geométricas do vaso do biorreator Bioflo IIC. Foi utilizada água destilada como fluido para que fosse possível mostrar claramente a distribuição das bolhas de ar em todo o ambiente hidrodinâmico do biorreator (*hold-up*). As condições de agitação e aeração empregadas foram: N=100 a 1000 rpm e  $\phi_{ar}=0,0; 0,4; 0,8; 1,2$  vvm.

Foi instalada uma câmera digital a aproximadamente 20 cm de distância do sistema para captura de imagens e vídeo. A câmera foi fixada num tripé para evitar imagens trêmulas, permitindo manter a mesma calibração durante a sequência total dos ensaios e mostrar o

padrão de distribuição e de tamanho de bolhas em cada condição de agitação e aeração empregada ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ). As imagens foram capturadas em intervalos de tempo de 2 minutos obtendo um total de 5 imagens para cada configuração de impelidor e diretamente armazenadas no computador, além dos vídeos obtidos para cada configuração.

**Figura 4.7. Sistema experimental utilizado no estudo do diâmetro de bolha mediante obtenção de imagens.**



Fonte: arquivo próprio.

Essas imagens foram analisadas no software Image-Pro® Plus<sup>TM</sup>, permitindo a determinação do número e do diâmetro médio das bolhas para cada imagem. Posteriormente, esses resultados foram tratados no OriginPro 8.1.

## **4.2. Avaliação de transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento em cultivos de *Streptomyces clavuligerus***

### **4.2.1. Influência das condições de cisalhamento em cultivos de *Streptomyces clavuligerus***

Para avaliar a influência das condições de cisalhamento nas variáveis de cultivo de *S. clavuligerus* foram realizados três cultivos em duplicata simultânea com os diferentes impelidores (TR, EEDP, EEUP), sob as mesmas condições de agitação e aeração ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) especificadas no Quadro 6. Estas condições utilizadas na literatura geraram bons resultados

(ROSA et al., 2005; CAMPESI et al., 2009).

**Quadro 6. Condições de agitação e aeração empregadas nos cultivos em biorreator T=30 °C.**

Cultivo	Tipo de Impelidor	N rpm	$\phi_{ar}$ vvm (*)	Tempo de cultivo h
B <sub>1</sub>	TR	800	0,5	70
B <sub>2</sub>	EEDP	800	0,5	57
B <sub>3</sub>	EEUP	800	0,5	57

\*Tempo médio de duração de cada cultivo.

#### 4.2.2. Cultivos em biorreator tipo tanque agitado e aerado

Os cultivos foram realizados em três etapas, reativação do microrganismo, crescimento e produção, cujos procedimentos estão descritos a seguir:

**Reativação:** um volume de 3,5 mL de suspensão celular contendo 5 g.L<sup>-1</sup> de massa seca de *S. clavuligerus* foram inoculados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de meio de cultura de reativação (MR) e incubados numa mesa incubadora rotativa ou shaker a 30 °C e 250 rpm por 24 h.

**Crescimento:** Erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura de crescimento (MC) foram inoculados com 5 mL de caldo de reativação e incubados nas mesmas condições da etapa de reativação.

**Produção:** Finalmente, 400 mL de caldo de crescimento foram transferidos para biorreator convencional contendo 3,6 L de meio de produção (MP). Os cultivos em biorreator foram conduzidos a 30 °C, 800 rpm e 0,5 vvm e o pH controlado automaticamente em 6,8 pela adição de soluções de ácido (HCl 2M) e de base (NaOH 1M) com controle da espuma .

Em cada cultivo foram retiradas amostras (≈35 mL) a cada 6 h, sendo parte destas utilizadas para a análise reológica do caldo de cultivo, uma fração para análise de imagens e o restante foi centrifugado a 3250 g por 15 min a 4 °C, sendo o sobrenadante armazenado em freezer para posteriores análises de ácido clavulânico e glicerol. A cada tomada das amostras foram registrados os valores da concentração de OD.

A Figura 4.8 ilustra o procedimento experimental utilizado nos cultivos.



Figura 4.8. Procedimento experimental dos cultivos em biorreator.

Criotubo contendo 3,5 mL de suspensão de células vegetativas ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) em solução de glicerol (10% v/v)



3,5 mL

Erlenmeyer contendo 50 mL de MR incubado por 24 h em shaker a 250 rpm e  $30 \text{ }^\circ\text{C}$



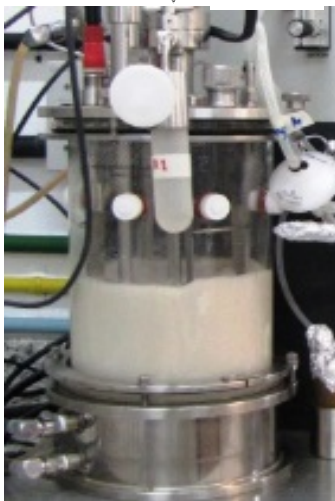
5,0 mL

Cada 8 Erlenmeyer contem 45 mL de MC incubados por 24 h no shaker a 250 rpm e  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .



400 mL

Biorreator IIC, contendo 3,6 L de MP



Cultivo operado a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 800 rpm, 0,5 vvm e  $\text{pH}=6,8$  com diferentes impelidores

Fonte: arquivo próprio.

### 4.2.3. Análise morfológica

Para a análise morfológica de *S. clavuligerus* foi realizada a seguinte sequência para o preparo de lâminas:

- Amostras foram retiradas do biorreator e uma fração de aproximadamente 2 mL foi diluída segundo fator de diluição do Quadro 7 para realização do esfregaço.
- O esfregaço foi realizado espalhando 30  $\mu$ L a suspensão do microrganismo numa lâmina de vidro limpa.
- Para fixação dos micélios na lâmina, a mesma foi levada à chama de um bico de Bunsen.

**Quadro 7. Diluições utilizadas nos cultivos realizados para análise morfológica.**

Tempo de cultivo (h)	Fator de diluição		
	TR	EEDP	EEUP
0	70	70	70
6	70	70	70
12	100	80	100
18	100	90	100
24	100	100	150
30	150	100	150
36	150	100	150
Após de 42 h	200	150	200

Após a fixação, aplicou-se a solução de corante azul de metileno e a lâmina foi colocada em repouso por aproximadamente 2 min. As lâminas foram então lavadas com água destilada para remover o corante não absorvido pelo micélio e secadas novamente ao ar. Finalmente, as amostras foram rotuladas e armazenadas para posterior análise.

### 4.2.4. Análises de imagem

Para a análise da morfologia dos microrganismos a partir das lâminas, as mesmas foram observadas em microscópio tendo câmara digital acoplada. Foram capturadas aproximadamente 50 imagens/lâmina, sendo as imagens adquiridas e arquivadas no formato

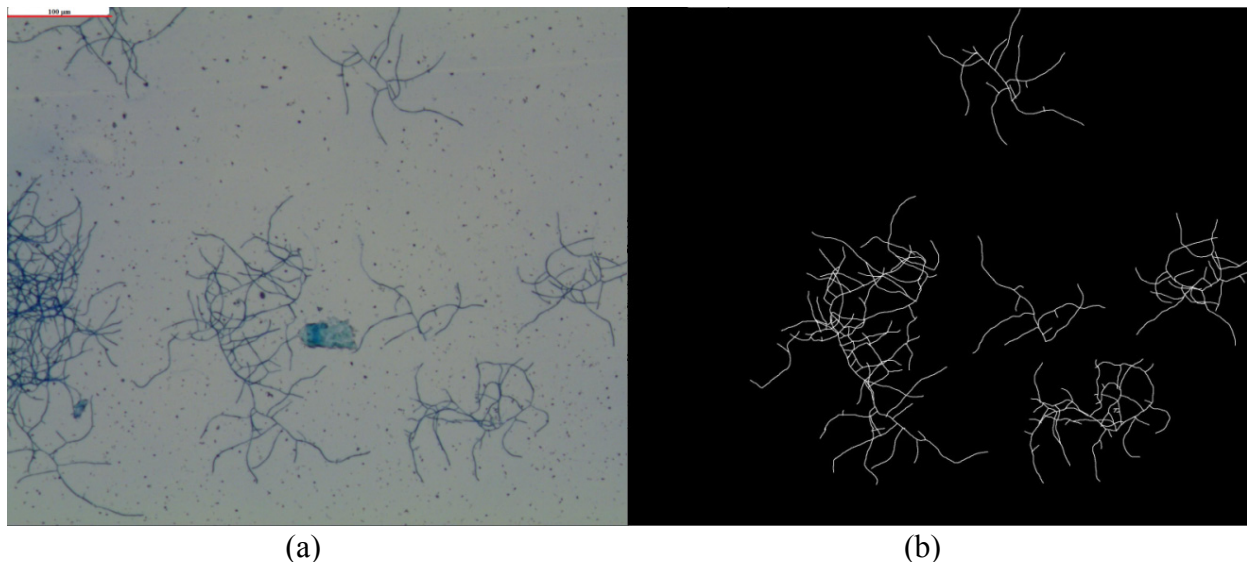
JPG (com resolução de 2048x1536 pixels) em computador para posterior análise de imagem.

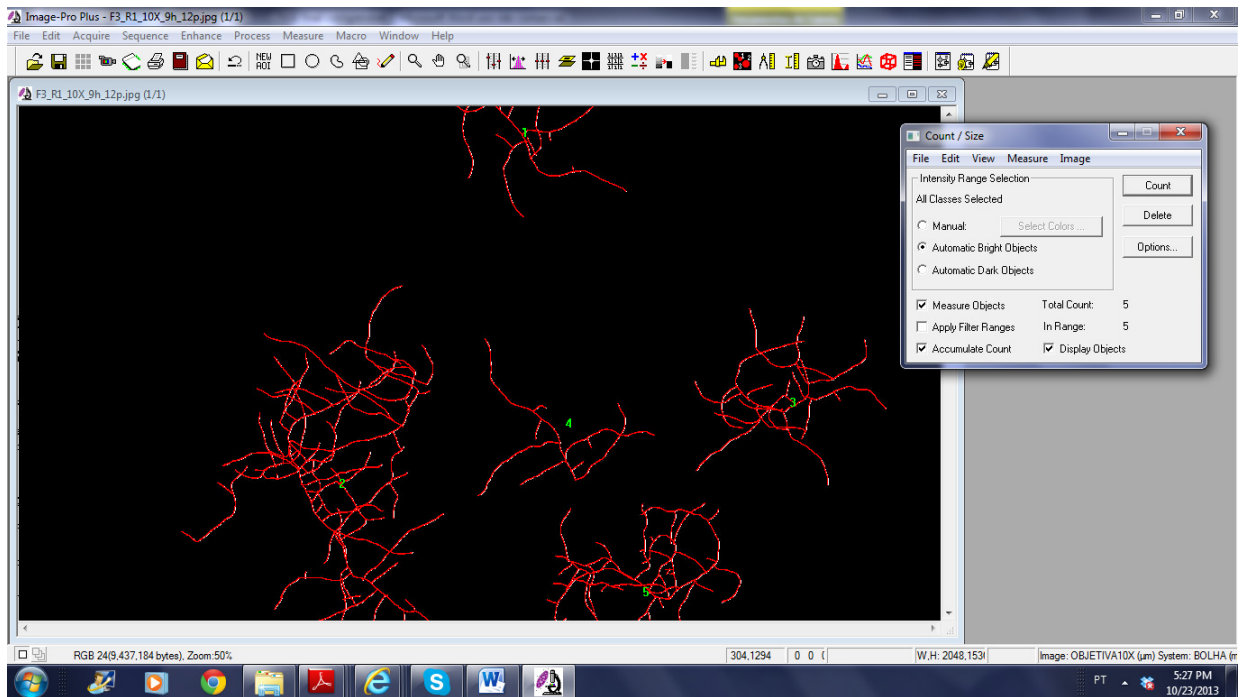
As imagens foram tratadas a fim de se obter maior contraste nas imagens e logo analisadas no software Image-Pro® Plus™ 6, para se determinar os diferentes parâmetros morfológicos como: porcentagem de cada classe (%), área, perímetro convexo médio, comprimento, diâmetro de cada classe morfológica (*pellets*, *clumps*, hifas ramificadas e hifas não ramificadas), considerando-se também o número de extremidades de hifas ramificadas ou número de pontas.

A partir desses resultados foi calculada a unidade de crescimento hifal (UCH) conforme indicado na Equação (2.54).

A digitalização óptica de imagens é o principal processo envolvido na análise digital, onde os pixels são convertidos em unidades métricas, utilizando um fator de calibração que é inserido no programa para a determinação do tamanho da espécie analisada. Neste caso a calibração espacial foi de pixels para  $\mu\text{m}$ . Na figura 4.9 pode-se observar um exemplo do tratamento utilizado.

**Figura 4.9. Tratamento das imagens com o software Image-Pro® Plus™ 6. (a) Fotografia referente a *clumps* e hifas ramificadas às 9 horas de cultivo com o impelidor EEUP com aumento de 100x. Em (b) e (c) Tratamento dessa imagem.**





(c)

Fonte: arquivo próprio.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Transferência de oxigênio e das condições de cisalhamento em biorreator convencional com diferentes impelidores

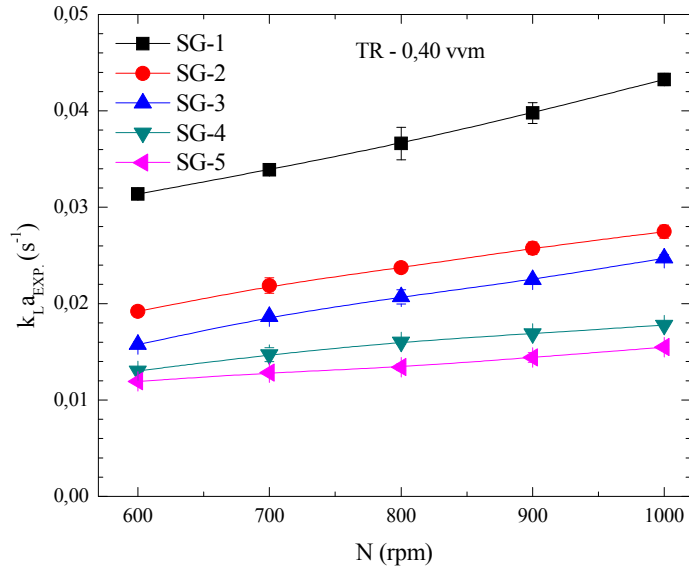
Nesta primeira etapa do trabalho são apresentados, e discutidos os resultados de transferência de oxigênio assim como das condições de cisalhamento, obtidos em biorreator convencional equipado com três tipos de impelidores (TR, EEDP e EEUP) em função das condições de agitação e aeração. Utilizando fluidos Newtonianos (água e soluções de glicerol) e não-Newtonianos (soluções de goma xantana) similares reologicamente, caldos de fermentação com microrganismos filamentosos. Como principal resultado desta etapa foram obtidas equações de previsão da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) para os diferentes sistemas.

#### 5.1.1. Correlações de $k_{La}$ para fluidos Newtonianos

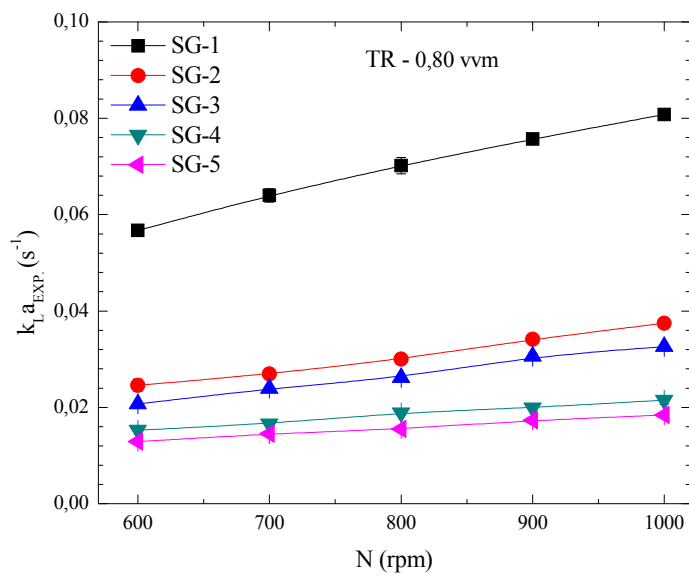
##### 5.1.1.1. Impelidor TR

Os valores de  $k_{La}$  obtidos para cada  $\phi_{ar}$  (0,40; 0,80 e 1,20 vvm) estão ilustrados em função a N para os diferentes fluidos Newtonianos (Figura 5.1). Na solução com menor concentração de glicerol SG-1 observa-se altos valores de  $k_{La}$  devido à grande quantidade de bolhas de ar geradas no meio não coalescente originando uma grande área de contato gás-líquido. Observa-se também que o  $k_{La}$  é fortemente influenciado tanto por  $\phi_{ar}$  quanto por N. No entanto, para maiores concentrações de glicerol (solução SG-2 a SG-5) as influências de  $\phi_{ar}$  e N são menos pronunciadas, devido à maior viscosidade da fase líquida. Para o impelidor TR, os dados experimentais de  $k_{La}$  para fluidos Newtonianos variaram no intervalo de 0,012 a 0,115  $s^{-1}$  apresentando um aumento de 9 vezes. Comparando com a literatura, estes valores mostraram-se maiores que os obtidos por Campesi et al. (2009), que determinaram valores de  $k_{La}$  na faixa de 0,0155 a 0,0827  $s^{-1}$  utilizando soluções de glicerol com viscosidades de 2,30 a 16,21 mPa.s.

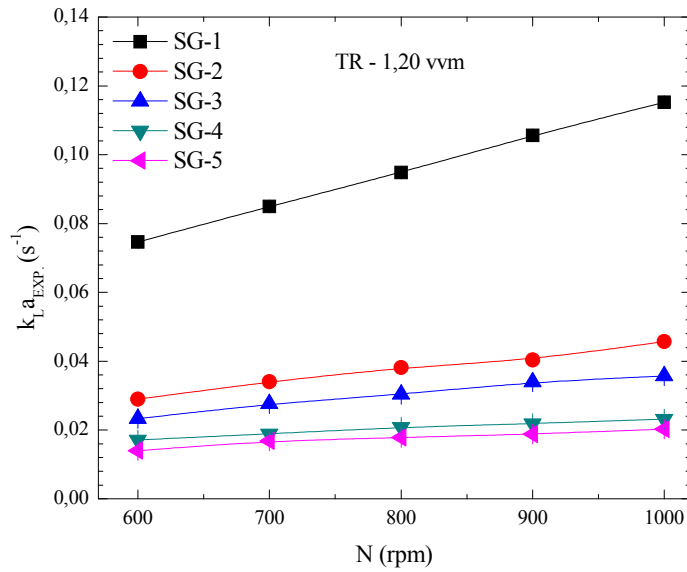
Figura 5.1. Determinações de  $k_L a$  através da Equação 3.6 para fluidos Newtonianos (FN) ou soluções de glicerol utilizando o impelidor TR em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.



(a)



(b)



(c)

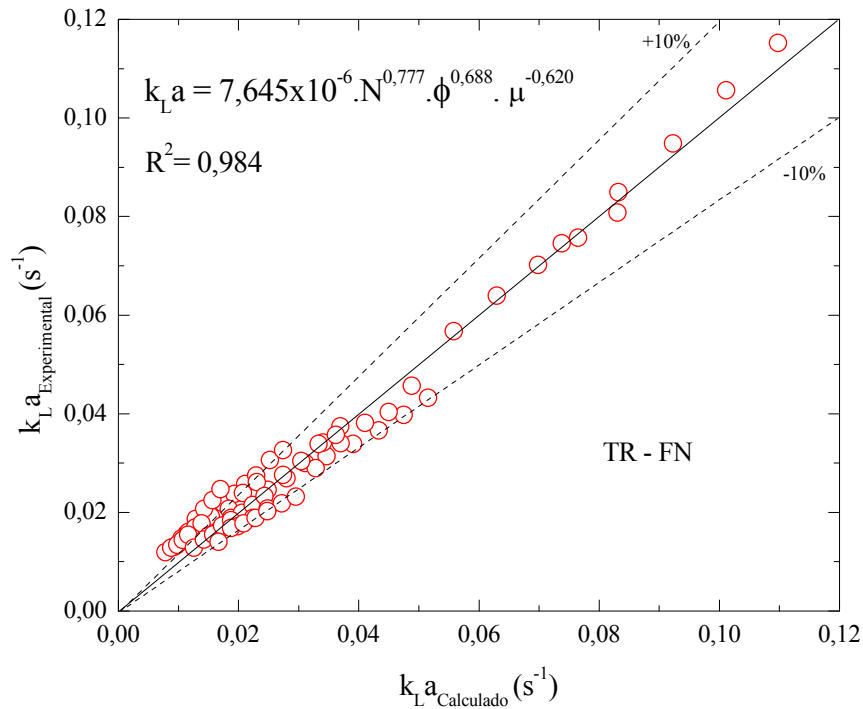
Os valores de  $k_L a$  foram correlacionados com  $N$ ,  $\phi_{ar}$  e  $\mu$  de acordo com a Equação (3.9), para fluidos Newtonianos. A correlação obtida é dada pela Equação (5.1) observando-se que a viscosidade influencia negativamente a transferência de oxigênio.

$$k_{L a(TR)} = (7,645 \pm 3,47) \cdot 10^{-6} \cdot N^{0,778 \pm 0,065} \phi_{ar}^{0,688 \pm 0,032} \cdot \mu^{-0,620 \pm 0,015} \quad (5.1)$$

$$R^2=0,984$$

A Figura 5.2 mostra os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) obtidos experimentalmente e os dados previstos pela Equação (5.1) para o impelidor TR. Para ilustrar qualidade do ajuste, observa-se que a maioria dos desvios entre os valores experimentais e previstos pela correlação estão abaixo de 10%.

Figura 5.2. Valores experimentais de  $k_L a$  em função dos valores calculados pela Equação (5.1) para fluidos Newtonianos agitados com o impelidor TR.



### 5.1.1.2. Impelidor EEDP

Para este impelidor (EEDP) foram obtidos valores baixos de  $k_L a$  na faixa de 0,006 até 0,066  $s^{-1}$ , praticamente a metade da faixa obtida para o impelidor TR. Na literatura não existem trabalhos publicados que apresentem valores de  $k_L a$  em biorreatores convencionais operando com esta configuração de impelidor (EEDP) em regime turbulento.

Os valores de  $k_L a$  obtidos para cada  $\phi_{ar}$  (0,40; 0,80 e 1,20 vvm) estão ilustrados em função de  $N$  para os diferentes fluidos Newtonianos para o impelidor EEDP (Figura 5.3).

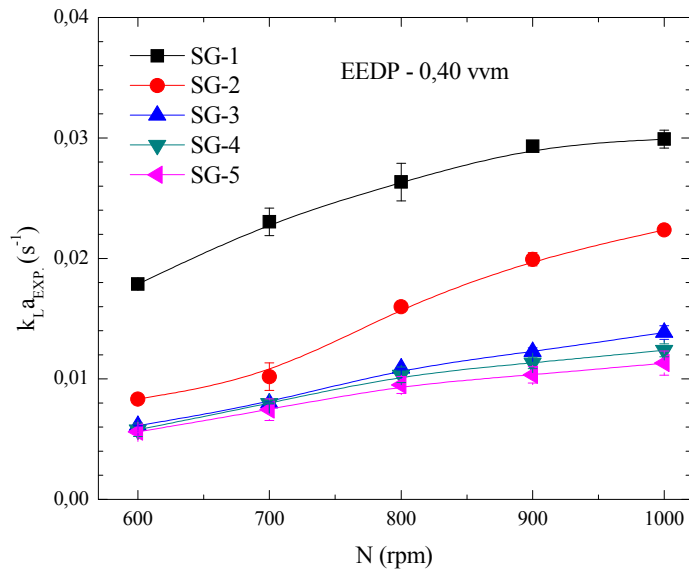
Da mesma forma que para o impelidor TR, os valores de  $k_L a$  foram correlacionados com  $N$ ,  $\phi_{ar}$  e  $\mu$  de acordo com a Equação (3.9), para fluidos Newtonianos. A correlação obtida para o impelidor EEDP é dada pela Equação (5.2).

$$k_{L a(EEDP)} = (4,94 \pm 2,67) \cdot 10^{-7} \cdot N^{1,196 \pm 0,078} \cdot \phi_{ar}^{0,585 \pm 0,035} \cdot \mu^{-0,521 \pm 0,015} \quad (5.2)$$

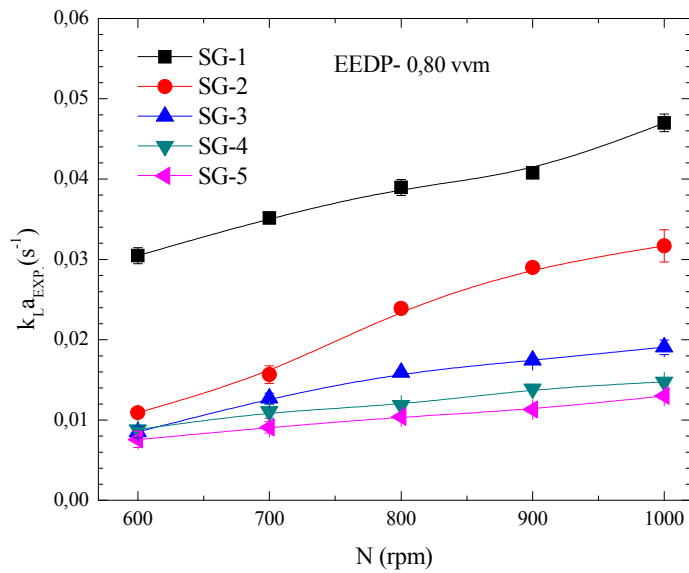
$$R^2 = 0,972$$



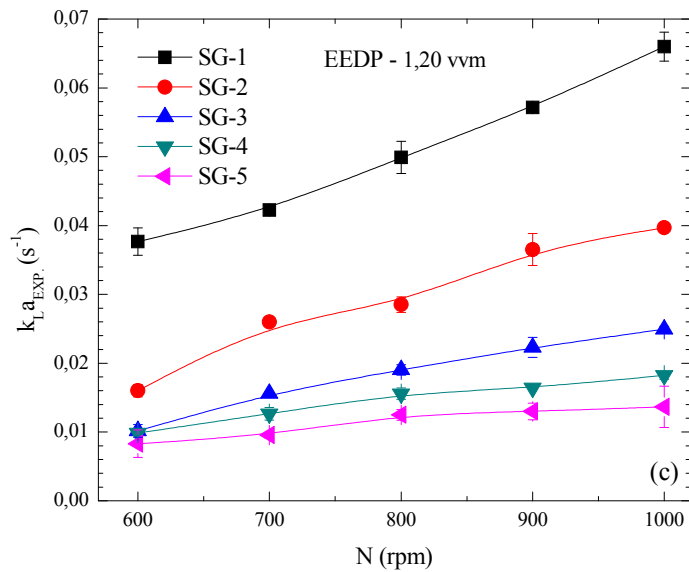
Figura 5.3. Determinações de  $k_L a$  através da Equação 3.6 para fluidos Newtonianos (FN) ou soluções de glicerol utilizando o impelidor EEDP em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.



(a)

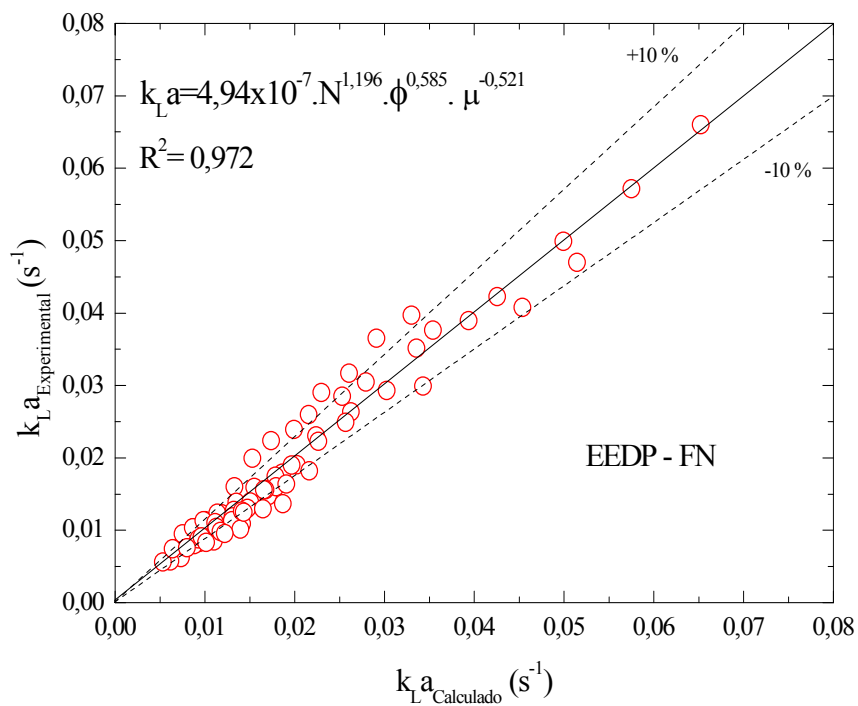


(b)



A Figura 5.4 mostra os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) obtidos experimentalmente e os valores previstos pela Equação (5.2), para o impelidor EEDP, onde a dispersão da maioria dos valores estão dentro de um desvio de  $\pm 10\%$ .

**Figura 5.4. Valores experimentais de  $k_L a$  em função dos valores calculados pela Equação (5.2) para fluidos Newtonianos agitados com o impelidor EEDP.**



### 5.1.1.3. Impelidor EEUP

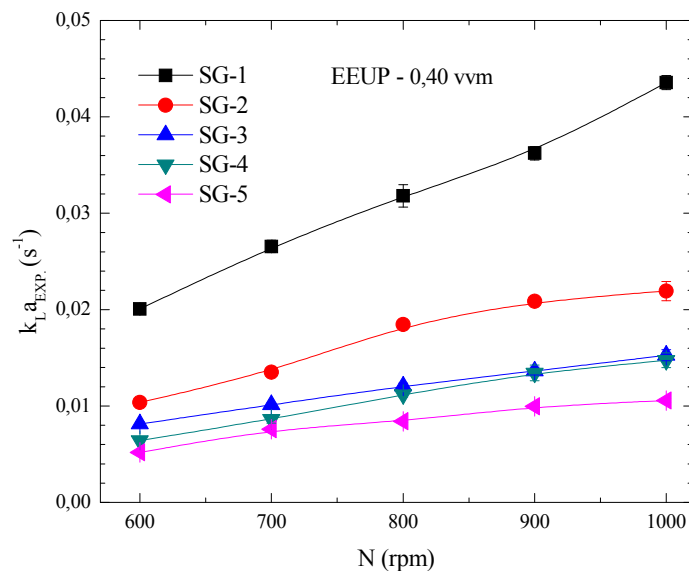
Quando utilizado o impelidor EEUP, os valores de  $k_L a$  variam na faixa de 0,005 a 0,103  $s^{-1}$ , ou seja, um incremento de 19 vezes, com uma faixa de variação muito próxima da obtida para o impelidor TR. Na literatura não foram encontrados trabalhos publicados que apresentem valores de  $k_L a$  em biorreatores convencionais operando com esta configuração de impelidor (EEUP) em regime turbulento. As variações de  $k_L a$  para fluidos Newtonianos em função das condições de agitação e aeração estão ilustradas na Figura 5.5.

Os valores de  $k_L a$  foram correlacionados com  $N$ ,  $\phi_{ar}$  e  $\mu$  de acordo com a Equação (3.9), para fluidos Newtonianos. A correlação obtida para o impelidor EEUP é dada pela Equação (5.3).

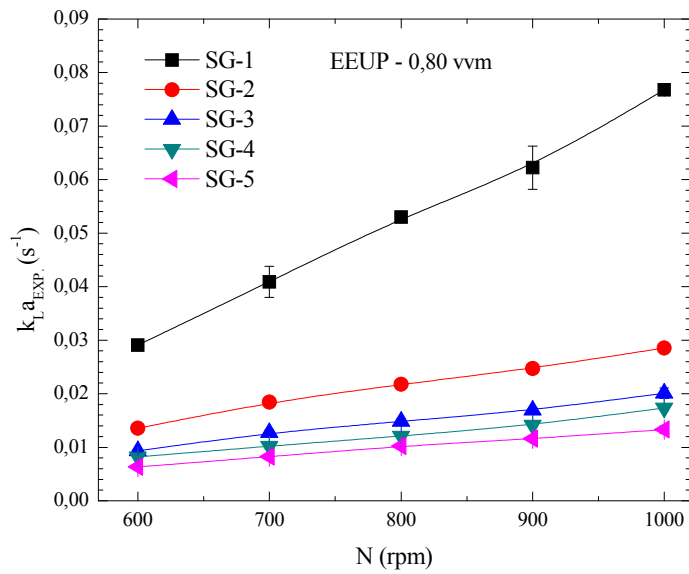
$$k_{La(EEUP)} = (6,011 \pm 2,59) \cdot 10^{-9} \cdot N^{1,706 \pm 0,061} \cdot \phi_{ar}^{0,618 \pm 0,026} \cdot \mu^{-0,716 \pm 0,014} \quad (5.3)$$

$$R^2=0,990$$

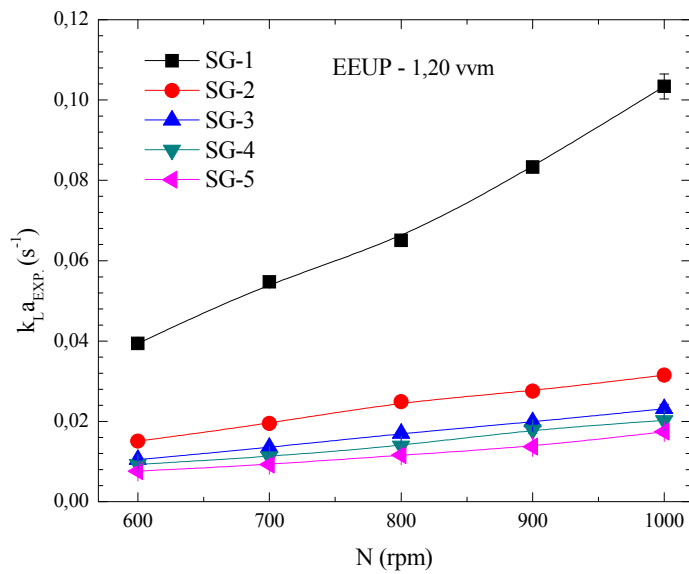
Figura 5.5. Determinações de  $k_L a$  através da Equação 3.6 para fluidos Newtonianos (FN) ou soluções de glicerol utilizando o impelidor EEUP em função da frequência de rotação ( $N$ ) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.



(a)



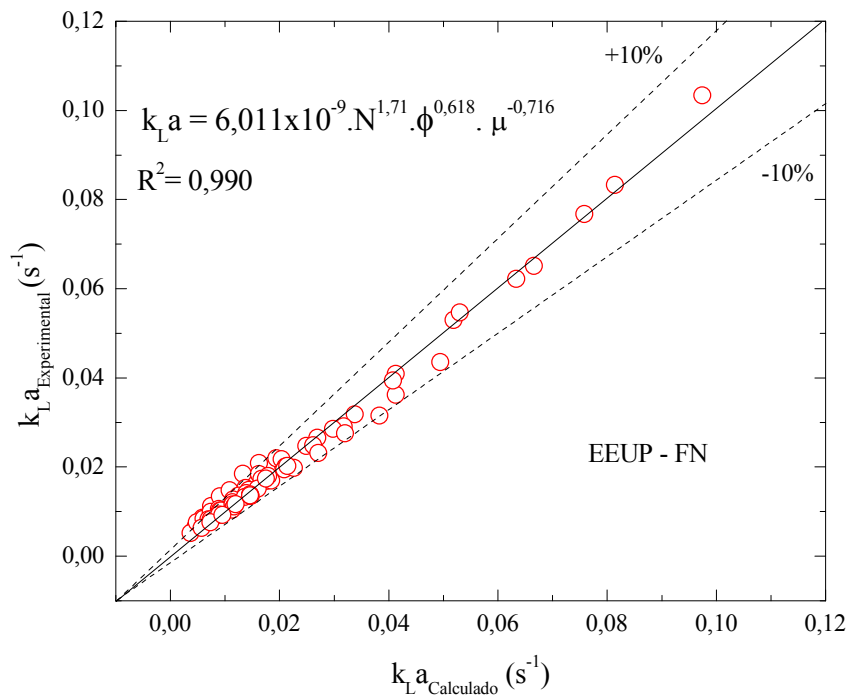
(b)



(c)

A Figura 5.6 ilustra os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) obtidos experimentalmente e os dados previstos pela Equação (5.3), para o impelidor EEUP. Observa-se novamente que os desvios encontram-se dentro de  $\pm 10\%$ , mostrando o bom ajuste obtido.

Figura 5.6. Valores experimentais de  $k_L a$  em função dos valores calculados pela Equação (5.3) para fluidos Newtonianos agitados com o impelidor EEUP.



Na faixa experimental estudada, observa-se que os valores de  $k_L a$  obtidos com o impelidor EEDP foram inferiores àqueles obtidos com os impelidores TR e EEUP. Isto é devido ao tipo de escoamento (fluxo descendente ou “*down-pumping*”) imposto ao fluido, no qual as pás do impelidor quebram rapidamente as bolhas de ar resultando numa maior área interfacial gás-líquido na região entre o impelidor e a base do tanque, mas com pequenos incrementos na transferência de massa ( $k_L a$ ) em comparação aos impelidores EEUP e RT.

As correlações obtidas para estimativas de  $k_L a$  para fluidos Newtonianos referentes às Equações (5.1) a (5.3) apresentaram bons ajustes aos valores experimentais obtidos, sendo os valores das constantes “b”, “c”, “d” e “e” específicos para cada sistema utilizado, devido às diferenças entre as geometrias dos impelidores. Observa-se que os valores da constante “b” foi diminuindo em uma ordem de grandeza para os impelidores TR, EEDP e EEUP. Quanto aos parâmetros “d” e “e”, ou seja, as potências da vazão específica de aeração ( $\phi_{ar}$ ) e da viscosidade dinâmica ( $\mu$ ), os valores obtidos para os impelidores TR, EEDP e EEUP foram inferiores a um e similares. As diferenças máximas obtidas para os parâmetros “d” e “e” foram de 17,6 e 37,4%, respectivamente. No entanto, observa-se uma grande diferença entre os valores do parâmetro “c” que expressa a influência da frequência de rotação (N) no  $k_L a$ , principalmente entre os impelidores TR e EEUP, cuja diferença alcançou cerca de 120%.

Ainda, os valores de “c” para os impelidores TR e EEUP foram iguais a 0,778 e 1,706, respectivamente, onde se constata a grande influência deste parâmetro para o impelidor EEUP.

### **5.1.2. Correlações de $k_L a$ para fluidos não-Newtonianos**

#### **5.1.2.1. Impelidor TR**

A fim de garantir bons resultados experimentais, os resultados experimentais foram obtidos em triplicata, com um desvio padrão ínfima, indicando os excelentes resultados em cada caso. Os valores de  $k_L a$  variaram na faixa de 0,0143 a 0,0813  $s^{-1}$ , com um incremento de 5,7 vezes.

Comparando com a literatura, estes valores ficaram próximos aos obtidos por Campesi et al. (2009), que determinaram valores de  $k_L a$  na faixa de 0,0155 a 0,0521  $s^{-1}$  utilizando soluções de goma xantana com valores de  $K$  na faixa de 0,094 a 1,978  $Pa \cdot s^n$  e  $n$  de 0,54 a 0,21 em biorreator convencional provido do impelidor TR.

Além disso, nas mesmas condições de operação observa-se que os valores de  $k_L a$  para fluidos não-Newtonianos (FNN) foram menores em comparação com os obtidos para fluidos Newtonianos (FN). De acordo com a literatura, os valores de  $k_L a$  decrescem com incrementos de concentração de SGX e, conseqüentemente, com a viscosidade aparente do fluido empregado (CAMPESI et al., 2009).

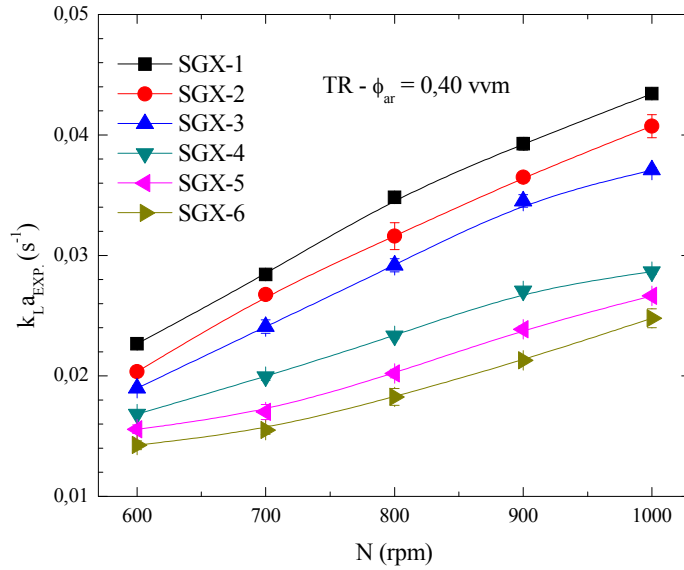
Os comportamentos do  $k_L a$  em função da frequência de rotação ( $N$ ) para cada  $\phi_{ar}$  (0,40; 0,80 e 1,20 vvm) com os diferentes fluidos não-Newtonianos empregados utilizando o impelidor TR são mostrados na Figura 5.7.

Os valores de  $k_L a$  foram correlacionados com as condições de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) e com as propriedades reológicas ( $K$  e  $n$ ) de acordo com a Equação (3.12), para fluidos não-Newtonianos. A correlação obtida é dada pela Equação (5.4).

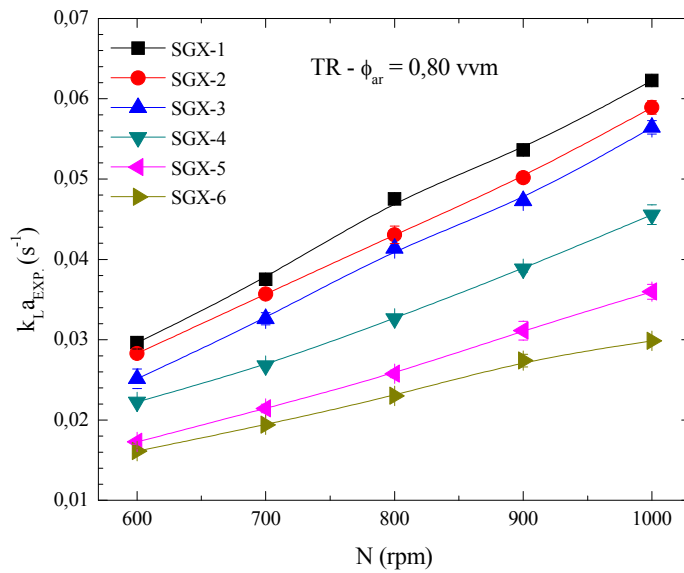
$$k_{La(TR)} = (1,13 \pm 0,372) \cdot 10^{-5} \cdot N^{1,431 \pm 0,040} \cdot \phi_{ar}^{0,488 \pm 0,017} \cdot K^{0,131 \pm 0,046} \cdot n^{1,193 \pm 0,140} \quad (5.4)$$

$$R^2 = 0,979$$

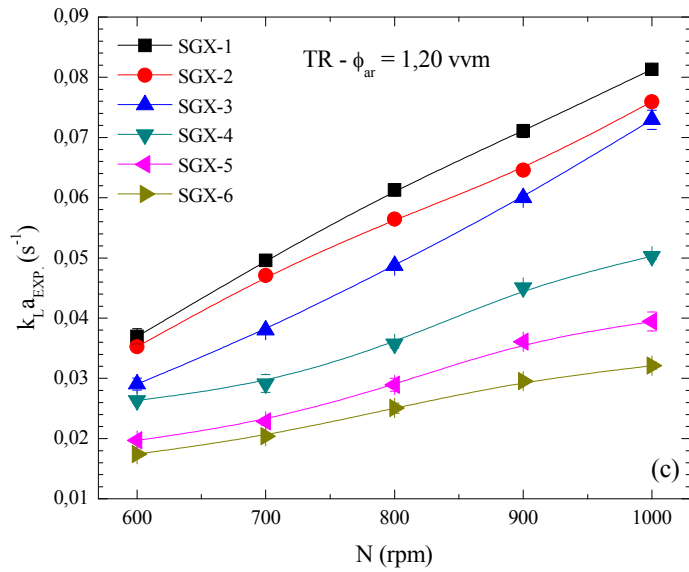
Figura 5.7. Resultados experimentais de  $k_{L,a}$  para fluidos não-Newtonianos (FNN) utilizando o impelidor TR em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.



(a)

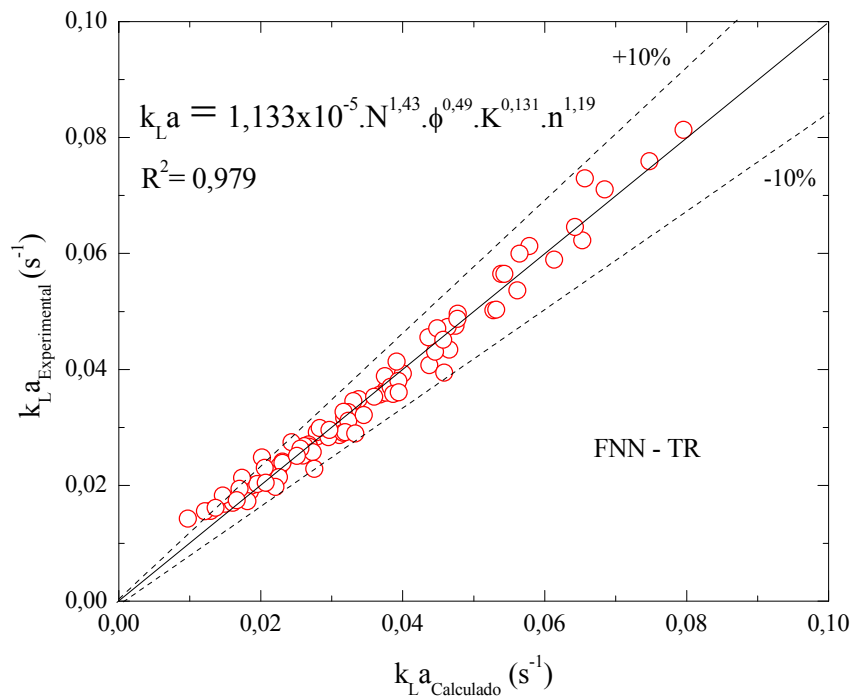


(b)



A Figura 5.8 mostra os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) obtidos experimentalmente e os dados previstos pela Equação (5.4), para o

**Figura 5.8. Valores experimentais de  $k_L a$  em função dos valores calculados pela Equação (5.4) para fluidos não-Newtonianos agitados com o impelidor TR.**



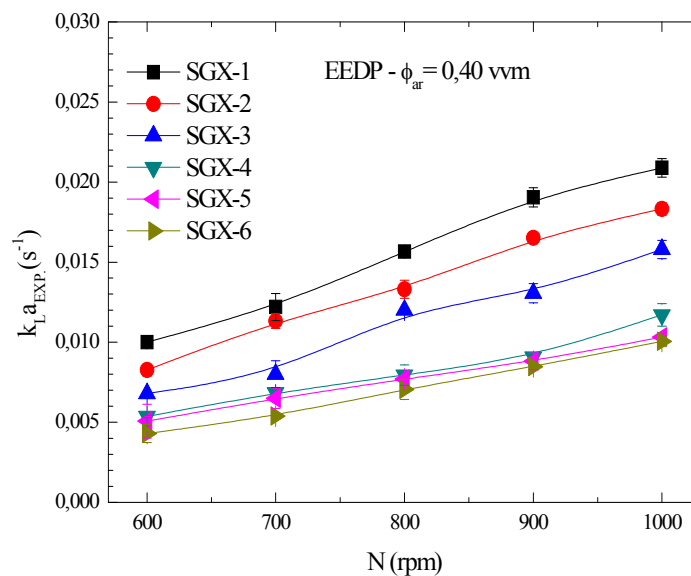


impelidor TR. Para ilustrar qualidade do ajuste, observa-se que a grande maioria dos desvios entre os valores experimentais e previstos pela correlação estão abaixo de 10%.

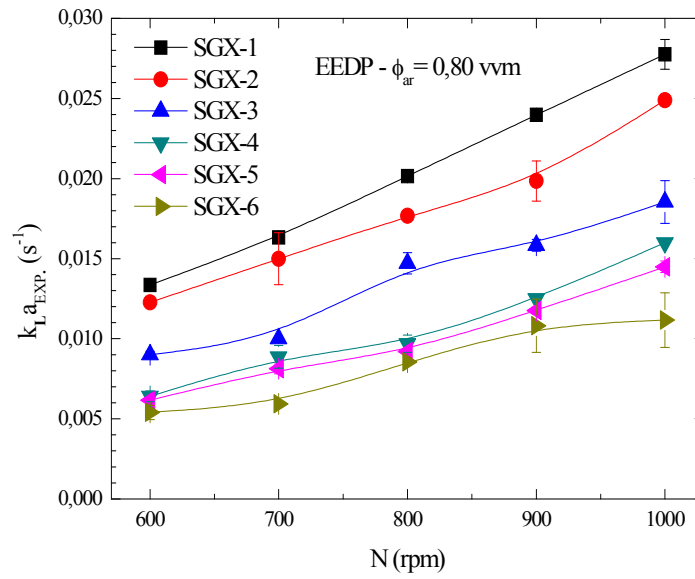
### 5.1.2.2. Impelidor EEDP

Foram obtidos valores de  $k_{La}$  na faixa de 0,0043 e 0,0366  $s^{-1}$  (incremento de 8,5 vezes), verificando-se que os valores obtidos para este impelidor apresentaram-se bem inferiores aos obtidos com o impelidor TR. Na literatura não foram encontrados trabalhos publicados que apresentem valores de  $k_{La}$  em biorreatores convencionais operando com esta configuração de impelidor (EEDP) em regime turbulento. Para uma melhor visualização, estes valores são mostrados na Figura 5.9. Os valores de  $k_{La}$  obtidos para cada  $\phi_{ar}$  (0,40; 0,80 e 1,20 vvm) são ilustrados em função a N para os diferentes fluidos não-Newtonianos para o impelidor EEDP.

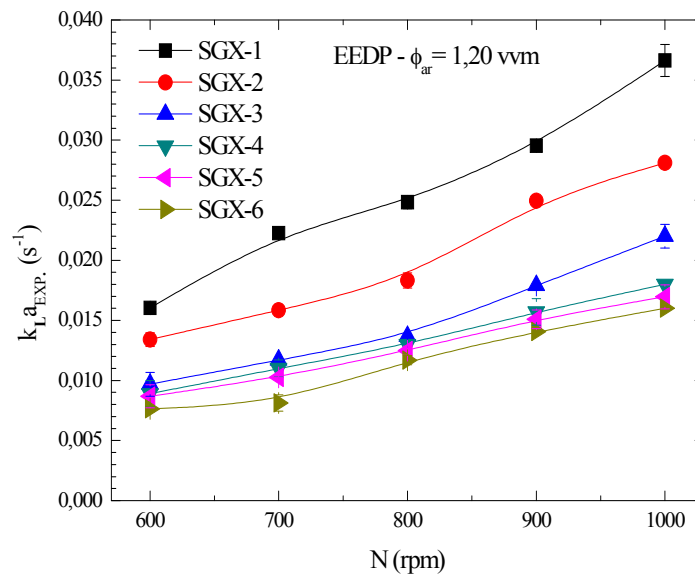
**Figura 5.9. Resultados experimentais de  $k_{La}$  para fluidos não-Newtonianos (FNN) utilizando o impelidor EEDP em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.**



(a)



(b)



(c)

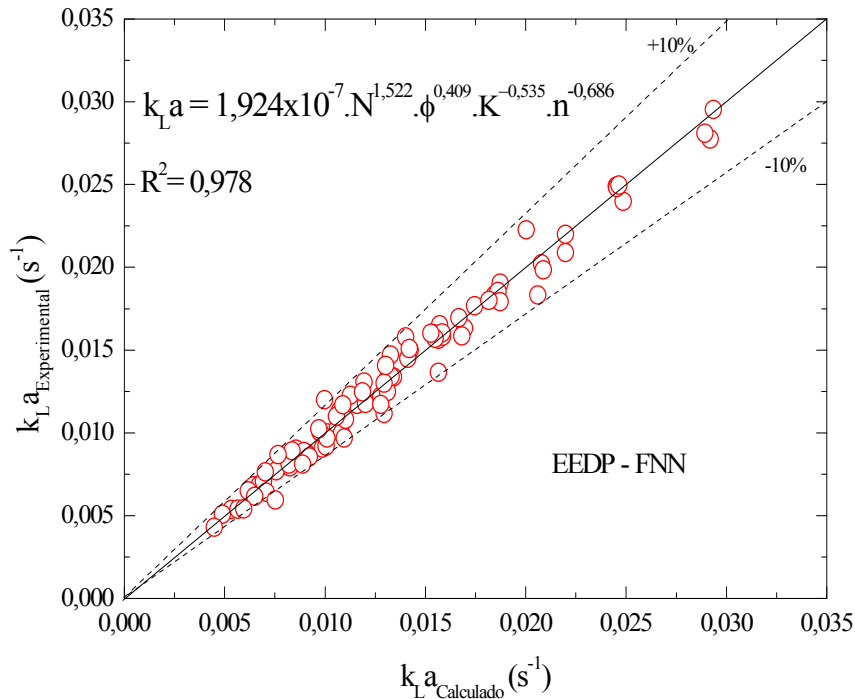
Da mesma forma que para o impelidor TR, os valores de  $k_L a$  foram correlacionados com  $N$ ,  $\phi_{ar}$ ,  $K$  e  $n$  de acordo com a Equação (3.12) para fluidos não-Newtonianos. A correlação obtida para o impelidor EEDP é dada pela Equação (5.5).

$$k_{L,a(EEDP)} = (1,924 \pm 0,58) \cdot 10^{-7} \cdot N^{1,522 \pm 0,037} \cdot \phi_{ar}^{0,409 \pm 0,015} \cdot K^{-(0,535 \pm 0,042)} \cdot n^{-(0,686 \pm 0,126)} \quad (5.5)$$

$$R^2 = 0,978$$

Os valores de  $k_L a$  obtidos experimentalmente o impelidor EEDP são confrontados com os valores calculados pela Equação (5.5), mostrando-se na Figura 5.10 e a dispersão da maioria dos valores estão dentro de um desvio de  $\pm 10\%$ .

**Figura 5.10. Valores experimentais de  $k_L a$  em função dos valores calculados pela Equação (5.5) para fluidos não-Newtonianos agitados com o impelidor EEDP.**



### 5.1.2.3. Impelidor EEUP

Por fim, similarmente ao realizado para os outros impelidores, para cada condição de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) são apresentados os valores de  $k_L a$  obtidos com o impelidor EEUP foram obtidos. Os valores de  $k_L a$  variaram entre 0,00622 e 0,0498  $s^{-1}$ , representando um incremento de aproximadamente 8 vezes.

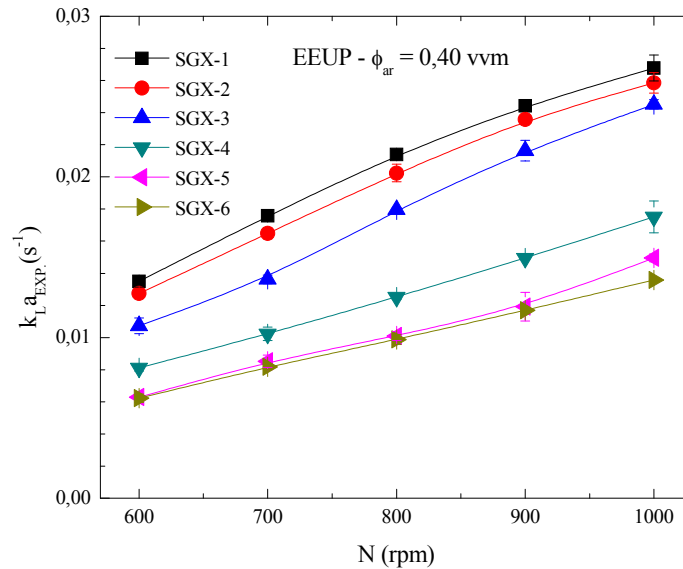
As variações de  $k_L a$  para fluidos Newtonianos em função das condições de agitação e aeração estão ilustradas na Figura 5.11.

Os valores de  $k_L a$  foram correlacionados com  $N$ ,  $\phi_{ar}$ ,  $K$  e  $n$  de acordo com a Equação (3.9), para fluidos não-Newtonianos. A correlação obtida para o impelidor EEUP é dada pela Equação (5.6).

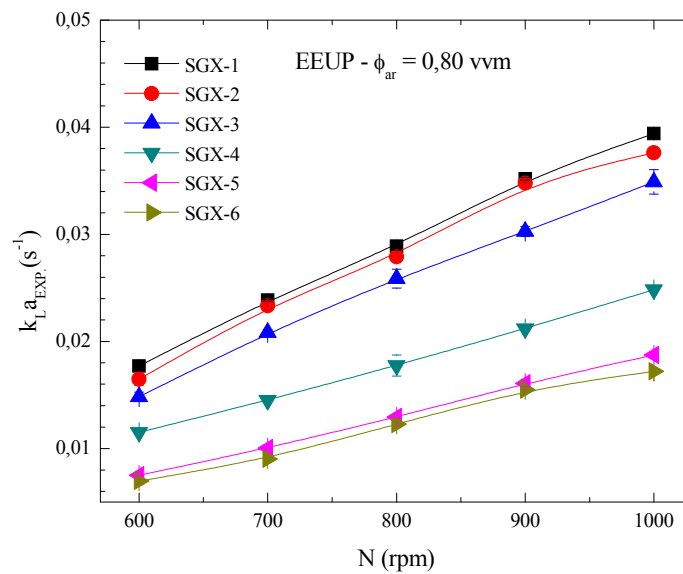
$$k_L a_{(EEUP)} = (4,447 \pm 1,52) \cdot 10^{-6} \cdot N^{1,512 \pm 0,041} \cdot \phi_{ar}^{0,462 \pm 0,017} \cdot K^{0,124 \pm 0,048} \cdot n^{1,338 \pm 0,151} \quad (5.6)$$

$$R^2 = 0,980$$

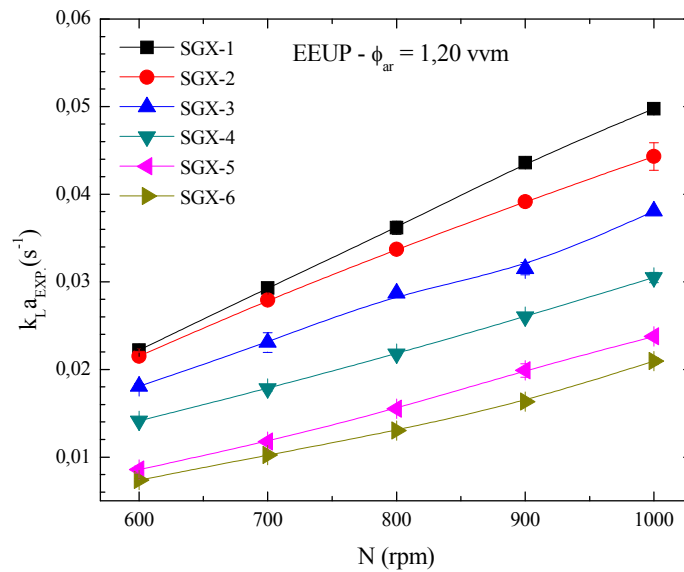
Figura 5.11. Resultados experimentais de  $k_L a$  para fluidos não-Newtonianos (FNN) utilizando o impelidor EEUP em função da frequência de rotação (N) para diferentes vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.



(a)



(b)



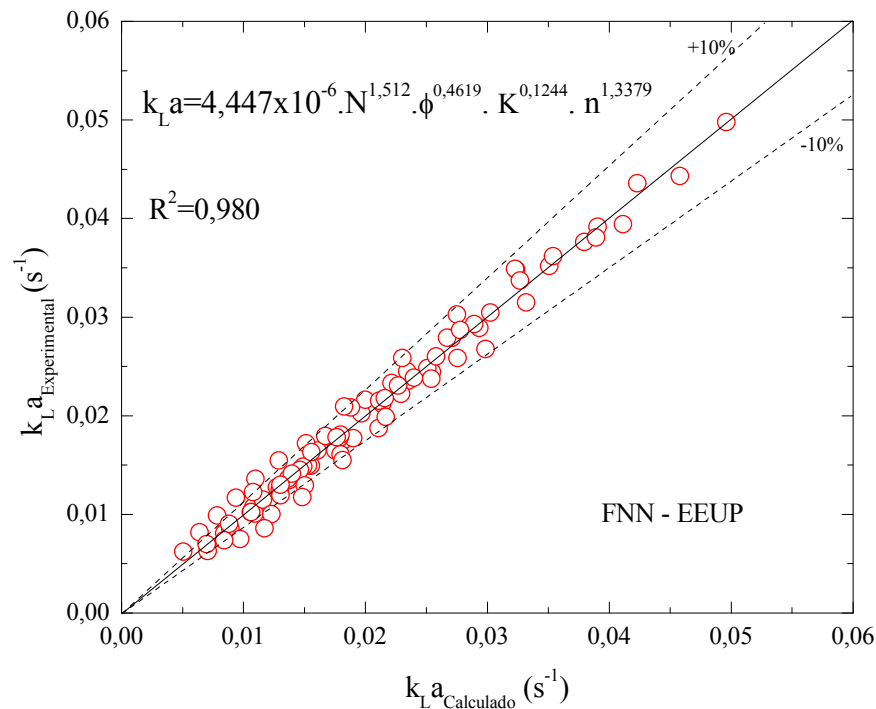
(c)

A Figura 5.12 ilustra a qualidade do ajuste, confrontando os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ) obtidos experimentalmente e os dados previstos pela Equação (5.6), para o impelidor EEUP. Observa-se novamente que os desvios encontram-se dentro de  $\pm 10\%$ , mostrando o bom ajuste obtido.

Comparando as faixas de valores de  $k_{L,a}$  para os três impelidores operando com FNN, observa-se a maior faixa foi obtida com o impelidor TR, seguido dos impelidores EEUP (61,3%) e EEDP (45,0%).

As correlações obtidas para estimativas de  $k_{L,a}$  para fluidos não-Newtonianos referentes às Equações (5.4), (5.5) e (5.6) apresentaram bons ajustes aos valores experimentais obtidos. Observa-se que para os impelidores TR e EEUP, as dependências de  $k_{L,a}$  com todas as variáveis independentes propostas ( $N$ ,  $\phi_{ar}$ ,  $K$ , e  $n$ ) são similares o que pode ser constatado pela proximidade dos valores dos parâmetros “g”, “h”, “i” e “j”, todos positivos e com pequenos desvios. Os valores da constante de proporcionalidade “f” para os impelidores TR e EEUP foram próximos e superiores ao valor obtido para o impelidor EEDP. Observou-se, também, uma influência negativa dos parâmetros reológicos  $K$  e  $n$  no  $k_{L,a}$  para o impelidor EEDP, fato que juntamente com o baixo valor de “f” caracteriza esse tipo de impelidor como não adequado para processos que demandem transferência de oxigênio em sistemas convencionais utilizando fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos.

Figura 5.12. Valores experimentais de  $k_L a$  em função dos valores calculados pela Equação (5.6) para fluidos não-Newtonianos agitados com o impelidor EEUP.



Ainda, verificou-se que a dependência do coeficiente de transferência de massa em relação às condições de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) para as três configurações de impelidores foram semelhantes, visto que os coeficientes “g” e “h” apresentaram valores próximos.

Para todos os sistemas avaliados os valores de  $k_L a$  foram maiores operando com fluidos Newtonianos, nitidamente na solução com menor concentração de glicerol (SG-1). Trabalhando com este fluido tem-se uma redução na formação de espuma e uma grande quantidade de bolhas pequenas dispersas no vaso. Segundo Nocentini et al. (1993), isto deve-se ao fato de que soluções de glicerol com concentrações entre 5 e 50 % v.v<sup>-1</sup> apresentam mudança de comportamento de líquido coalescente para não coalescente talvez devido à mudança da tensão superficial, aumentando desta forma a área interfacial e, por conseguinte, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ). Por outro lado, concentrações maiores de glicerol (SG-2 e SG-5) mostraram características coalescentes, efeito também exposto na literatura (LINEK, VACEK e BENEŠ, 1987).

Com o aumento da viscosidade dos fluidos (FN e FNN), os valores de  $k_L a$  são reduzidos. Além disso, devido à característica coalescente destes fluidos, têm-se bolhas de

maior tamanho, o qual foi notado com os aumentos de vazão de ar ( $\phi_{ar}$ ), sendo necessário seu controle com antiespumante.

Como descrito no Capítulo 2, o  $k_L a$  é o produto do coeficiente de transferência ( $k_L$ ) e da área interfacial de troca de massa ( $a$ ), portanto, conforme se aumenta  $k_L$  com o aumento de  $\phi_{ar}$  há uma diminuição da espessura da película estagnada de líquido ao redor da bolha de gás. Como a área interfacial de troca de massa ( $a$ ) aumenta conforme se aumenta  $\phi_{ar}$ , isto resulta em um aumento da retenção gasosa global ( $\epsilon_G$ ). No entanto, para altos valores de  $\phi_{ar}$  a área interfacial ( $a$ ) começará a diminuir devido à coalescência de bolhas e, como consequência, os valores de  $k_L a$  também, lembrando que a coalescência é uma propriedade física do fluido e que ocorre quando bolhas colidem ocorrendo uma fusão destas gerando outras de maior tamanho (KRESTA e BRODKLEY, 2003). Esse efeito pode ser desfavorecido no impelidor EEUP, onde após a fragmentação das bolhas inicialmente formadas (SG-1), estas podem posteriormente manter seu menor tamanho na dispersão gás-líquido. Esta hipótese está de acordo com o proposto por Kresta and Brodkley (2003), indicando que estes impelidores axiais de escoamento ascendente (*up-pumping*) são excelentes para a dispersão gás-líquido, ou seja, resultando em aumentos de  $k_L a$ , tornando-os mais eficientes em termos de transferência de oxigênio. Esta eficiência dos impelidores “*Elephant Ear*” deve-se ao fato do comportamento misto no padrão de escoamento, ou seja, um escoamento radial e axial (MIRRO e VOLL, 2009), para baixas e médias viscosidades (KRESTA e BRODKLEY, 2003), embora os autores não citem a faixa de valores. Este comportamento está de acordo com o observado experimentalmente no presente trabalho, pois para maiores viscosidades e valores de  $K$ , a predominância foi de um escoamento meramente axial.

Na obtenção dos dados de  $k_L a$  para todos os fluidos, o método do degrau de pressão (MP) se mostrou altamente confiável pela reprodutibilidade dos resultados, obtendo-se excelentes ajustes além do método ser rápido e de baixo custo, quando comparado com outros métodos (CERRI, 2009). As qualidades dos ajustes podem ser verificadas pelos altos valores dos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) e nas Figuras 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 5.10 e 5.12, onde a grande maioria dos desvios entre valores experimentais e preditos de  $k_L a$  foi inferior a  $\pm 10\%$  nos três sistemas estudados.

### 5.1.3. Correlações de velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ )

Uma vez obtidos os coeficientes “b”, “c”, “d”, e “e” para fluidos Newtonianos (SG), e os coeficientes “f”, “g”, “h”, “i”, e “j” para fluidos não-Newtonianos (SGX), são substituídos na Equação (3.14). Sendo obtidas as correlações de previsão da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) para fluidos não-Newtonianos em regime altamente turbulento para os sistemas equipados com os impelidores TR (o clássico), EEDP e EEUP (os novos impelidores). A  $\dot{\gamma}_m$  foi obtida em função das condições de operação (N e  $\phi_{ar}$ ) e das propriedades reológicas dos fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos (K e n).

$$\dot{\gamma}_{m(TR)} = (1,4826 \cdot N^{0,653} \cdot \phi_{ar}^{-0,200} \cdot K^{0,751} \cdot n^{1,193})^{\frac{1}{0,620 \cdot (1-n)}} \quad R^2=0,979 \quad (5.7)$$

$$\dot{\gamma}_{m(EEDP)} = (0,389 \cdot N^{0,326} \cdot \phi_{ar}^{-0,176} \cdot K^{-0,014} \cdot n^{-0,686})^{\frac{1}{0,521 \cdot (1-n)}} \quad R^2=0,980 \quad (5.8)$$

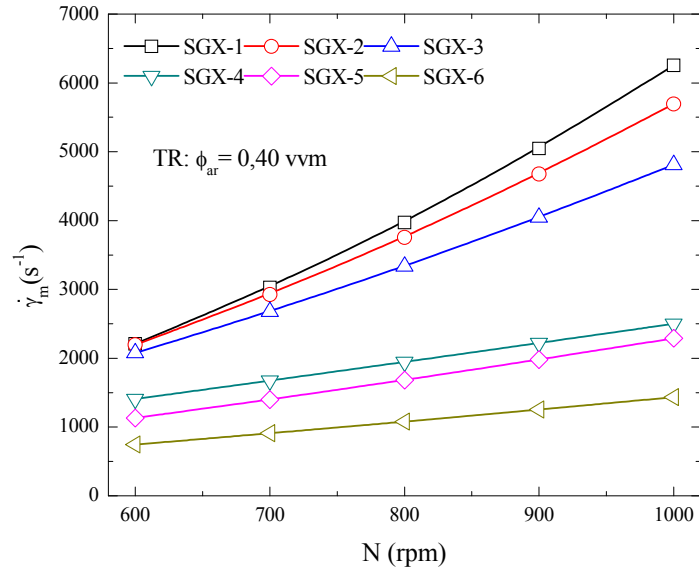
$$\dot{\gamma}_{m(EEUP)} = (739,768 \cdot N^{-0,194} \cdot \phi_{ar}^{-0,156} \cdot K^{0,840} \cdot n^{1,338})^{\frac{1}{0,716 \cdot (1-n)}} \quad R^2=0,980 \quad (5.9)$$

As Equações (5.7) a (5.9) de previsão de  $\dot{\gamma}_m$ , para os impelidores TR e EEUP apresentam expoentes para as variáveis  $\phi_{ar}$ , K e n positivos e com valores similares. Quanto à dependência de  $\dot{\gamma}_m$  em relação a N, o mesmo influencia positivamente  $\dot{\gamma}_m$  para o impelidor TR e negativamente para EEUP. Já para o impelidor EEDP (ver Equação (5.8)), a influência do parâmetro  $\phi_{ar}$  em  $\dot{\gamma}_m$  se apresenta como negativa para os impelidores EEDP e EEUP, a influência de N positiva do mesmo modo que para impelidor TR. No entanto, as influências dos parâmetros reológicos K e n em  $\dot{\gamma}_m$  foram negativas, contrastando com os impelidores TR e EEUP.

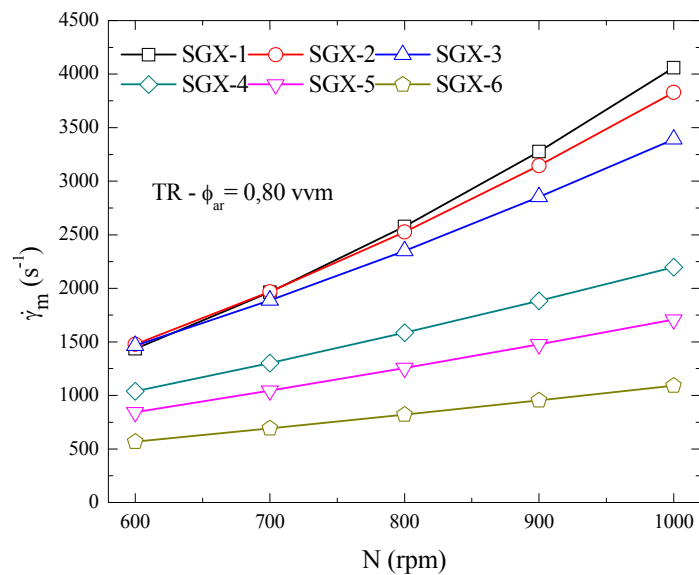
Como ilustração, nas Figuras 5.13 a 5.15 são mostrados, para os três impelidores estudados, os comportamentos de  $\dot{\gamma}_m$  para os fluidos não-Newtonianos (FNN) em função da frequência de rotação (N) para três vazões de ar ( $\phi_{ar}$ ).



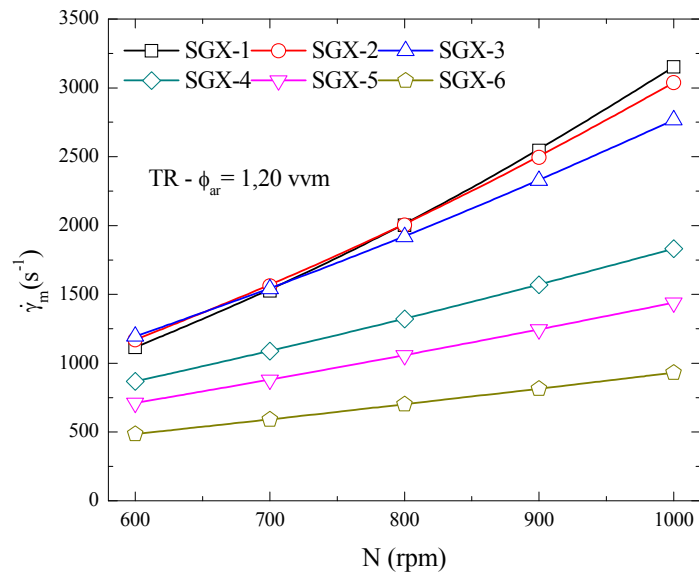
Figura 5.13. Variação de  $\dot{\gamma}_m$  para o biorreator equipado com o impelidor TR com diferentes FNN em função da frequência de rotação (N) e da vazão específica de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.



(a)

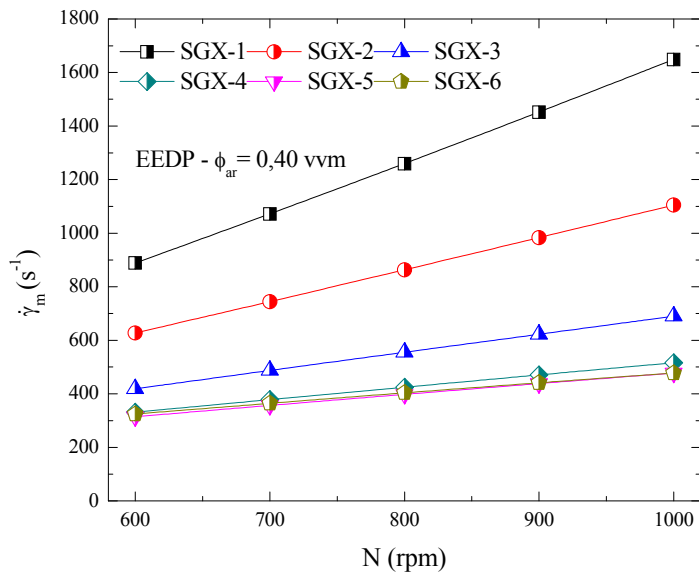


(b)

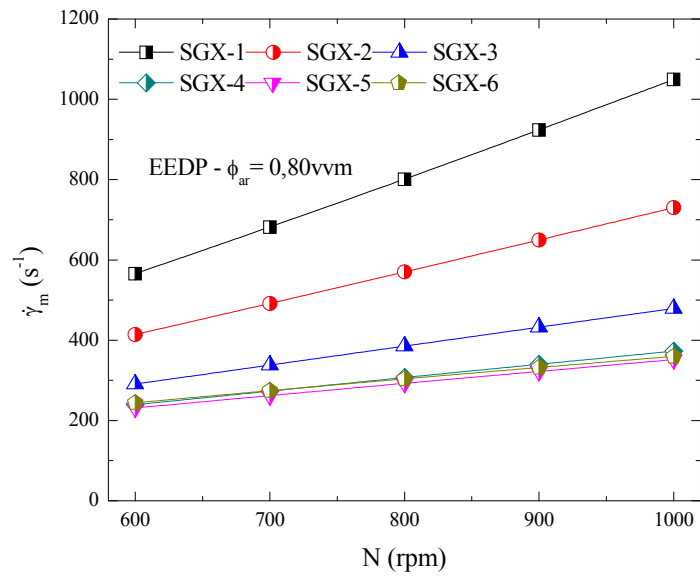


(c)

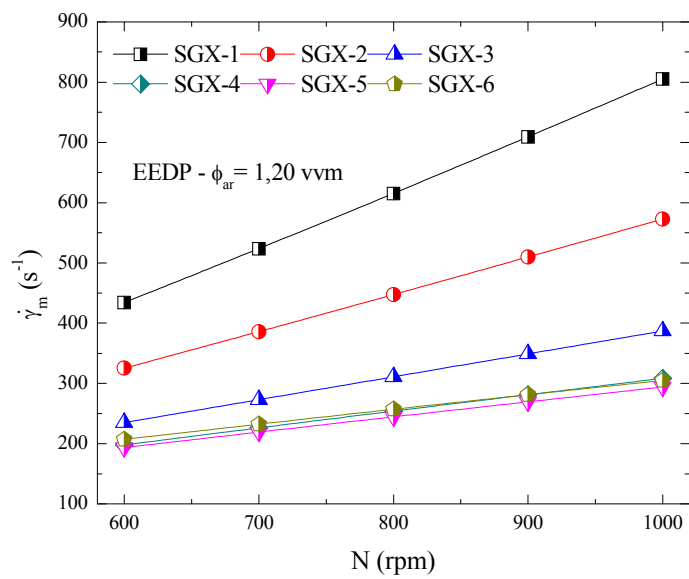
Figura 5.14. Variação de  $\dot{\gamma}_m$  para o biorreator equipado com o impelidor EEDP com diferentes FNN em função da frequência de rotação (N) e da vazão específica de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.



(a)

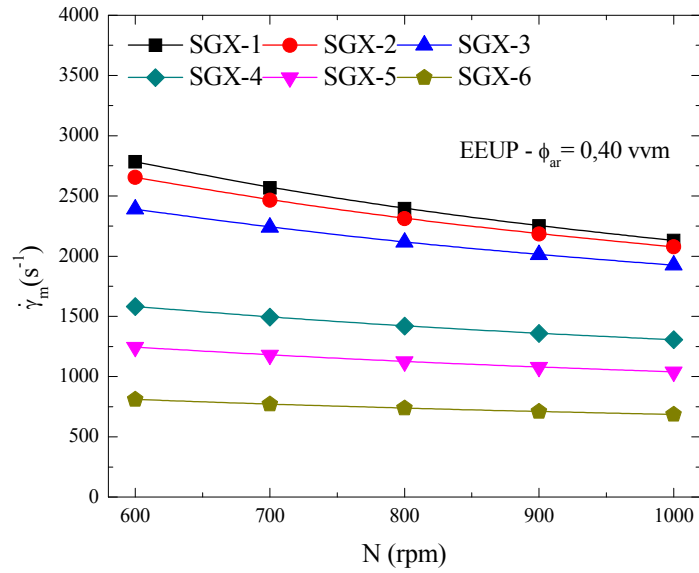


(b)

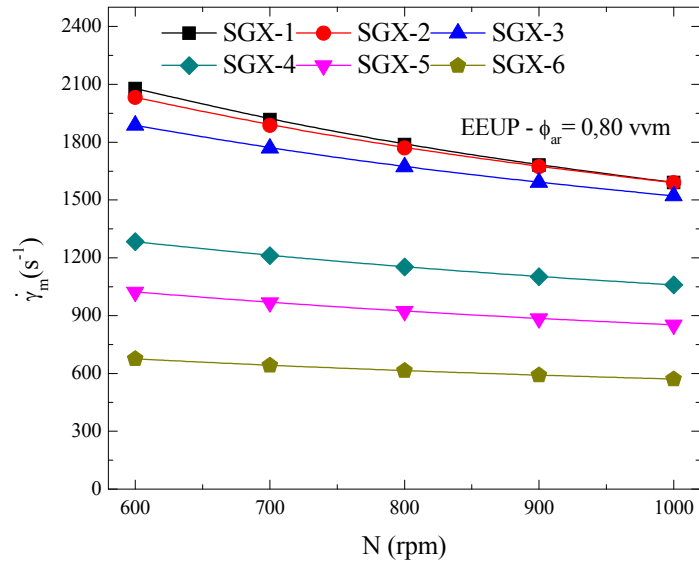


(c)

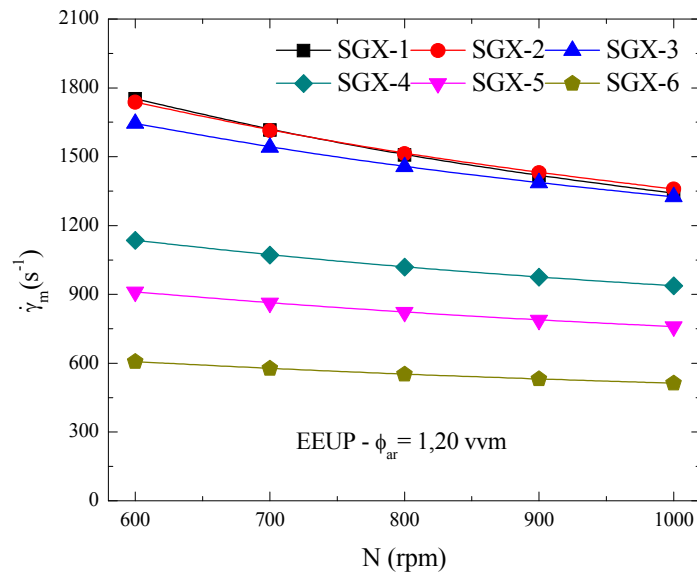
Figura 5.15. Variação de  $\dot{\gamma}_m$  para o biorreator equipado com o impelidor EEUP com diferentes FNN em função da frequência de rotação (N) e da vazão específica de ar ( $\phi_{ar}$ ): (a) 0,40 vvm, (b) 0,80 vvm e (c) 1,20 vvm.



(a)



(b)



(c)

Na Tabela 5.7 são apresentados as faixas de variação de  $\dot{\gamma}_m$  para cada impelidor, em que o valor à esquerda refere-se a 600 rpm e o valor à direita à 1000 rpm.

**Tabela 5.7. Faixas de variação de  $\dot{\gamma}_m$  para os impelidores TR, EEDP e EEUP em função de N (600-1000 rpm) para três valores de  $\phi_{ar}$  de acordo com as faixas de propriedades.**

$\phi_{ar}$ (vvm)	$\dot{\gamma}_m$ (s <sup>-1</sup> )					
	K<1,0 Pa.s <sup>n</sup> e n>0,28			K>1,0 Pa.s <sup>n</sup> e n<0,28		
	TR	EEDP	EEUP	TR	EEDP	EEUP
0,40	2076 - 6255	419 - 1648	2782 - 1924	745 - 2499	324 - 515	1582 - 685
0,80	1464 - 4060	290 - 1049	2078 - 1520	568 - 2195	244 - 372	1283 - 571
1,20	1114 - 3152	234 - 805	1772 - 1324	485 - 1831	206 - 304	1135 - 513

\*São considerados valores mínimos e máximos obtidos com 600 e 1000 rpm.

Observa-se que valores de  $\dot{\gamma}_m$  obtidos para o impelidor TR variaram entre 2,8 e 3,8 vezes. Ainda, nota-se que conforme se aumenta  $\phi_{ar}$  com baixas frequências de rotação (600 e 700 rpm), os valores da  $\dot{\gamma}_m$  se aproximam.

Analisando esse comportamento da  $\dot{\gamma}_m$  para o sistema equipado com o impelidor EEDP (Equação (5.8)), observa-se que os valores foram de 4 e 5 vezes inferiores aos obtidos com o impelidor TR. Por outro lado,  $\dot{\gamma}_m$  apresentou aumentos de 1,4 a 3,9 vezes para o impelidor EEDP na faixa experimental estudada.

Em relação ao impelidor EEUP (Equação (5.9)), observou-se comportamentos não esperados contrários aos observados para os outros impelidores, com uma maior sensibilidade de  $\dot{\gamma}_m$  em relação a N e, inesperadamente, uma diminuição de  $\dot{\gamma}_m$  com aumentos de N. Foram obtidas quedas nos valores da  $\dot{\gamma}_m$  entre 1,3 e 2,3 vezes, mesmo com incrementos nos níveis de  $\phi_{ar}$  e N. Além disso, os valores de  $\dot{\gamma}_m$  mostraram pequenas mudanças para soluções com baixas concentrações de goma xantana.

Analisando os valores para os impelidores TR e o EEDP, têm-se efetivamente aumentos de  $\dot{\gamma}_m$  em função de aumentos de N para ambas as configurações. Contrariamente, aumentos em  $\phi_{ar}$  resultam e decréscimos em  $\dot{\gamma}_m$ . Por outro lado e surpreendentemente, para o impelidor EEUP temos um comportamento contrário com decréscimos em  $\dot{\gamma}_m$  à medida que se aumenta N, com maiores valores de  $\dot{\gamma}_m$  a 600 rpm em relação aos demais impelidores. Esses comportamentos podem ser verificados na Tabela 5.7 e nas Figura 5.13 à Figura 5.15.

Observando-se os dados da Tabela 5.7, para fluidos com  $K < 1,0 \text{ Pa.s}^n$  e  $n > 0,28$  foram obtidos valores elevados de  $\dot{\gamma}_m$  para os três impelidores, em comparação com os fluidos com  $K > 1,0 \text{ Pa.s}^n$  e  $n < 0,28$ , mostrando que quanto mais viscoso o fluido, menor a transferência de quantidade de movimento e, portanto, a velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) diminui. Assim, para evitar o alto cisalhamento durante cultivos, os mesmos devem ser iniciados com um valor baixo de N e com aumentos de N ao longo do cultivo, à medida que as células crescem.

Avaliando o comportamento de  $\dot{\gamma}_m$  no sistema com o impelidor TR (Figura 5.13) empregando os fluidos SGX-4 – SGX-6 (  $K > 1,0 \text{ Pa.s}^n$  ) em função dos níveis de N (600 a 1000rpm) e de  $\phi_{ar}$  (0,40; 0,80; 1,20 vvm),  $\dot{\gamma}_m$  apresentou aumentos em baixas proporções entre 1,8 e 2,0 vezes. Para o sistema operando com o impelidor EEDP (Figura 5.14) foram observados aumentos de  $\dot{\gamma}_m$  ainda menores 1,4 e 1,6 vezes, mostrando uma tendência similar conforme foram aumentando os valores de N, ou seja, para os valores de  $\dot{\gamma}_m$  não houve diferença significativa para um mesmo valor de  $\phi_{ar}$ , sendo os níveis de  $\dot{\gamma}_m$  similares nos três fluidos apresentando-se as três curvas bem próximas. Analisando o comportamento do sistema com o impelidor EEUP (Figura 5.15), foram observados decréscimos constantes de 1,2 vezes para cada valor de N e  $\phi_{ar}$  para os fluidos utilizados (SGX-4 – SGX-6), apresentando-se uma queda no comportamento de  $\dot{\gamma}_m$  quase constante. Isto é os impelidores EE em fluidos com  $K > 1,0 \text{ Pa.s}^n$  mostraram um menor coeficiente angular nos comportamentos do  $\dot{\gamma}_m$ .

Outra observação importante dos dados Tabela 5.7 é que para os três impelidores operados, os níveis de  $\dot{\gamma}_m$  foram afetados com os sistemas operando com baixa frequência de rotação ( $N = 600$  rpm) e elevando-se  $\phi_{ar}$  de 0,80 a 1,20 vvm. No entanto esse aumento da aeração no sistema com o impelidor TR, fez com que os valores de  $\dot{\gamma}_m$  diminuíssem em torno de 29 e 46%, respectivamente, para  $K < 1.0$  Pa.s<sup>n</sup> e  $n > 0,28$  e em torno de 23 e 35% para  $K > 1.0$  Pa.s<sup>n</sup> e  $n < 0,28$ . O mesmo efeito foi observado para o impelidor EEDP, apresentando quedas superiores, de 30 a 44% para  $K < 1.0$  Pa.s<sup>n</sup> e  $n > 0,28$  e de 10 e 36% para os fluidos com  $K > 1.0$  Pa.s<sup>n</sup> e  $n < 0,28$ . Para o impelidor EEUP também foram observadas reduções de 36% para  $K < 1.0$  Pa.s<sup>n</sup> e  $n > 0,28$  e de 19 a 28% para  $K > 1.0$  Pa.s<sup>n</sup> e  $n < 0,28$ . Portanto, o emprego de baixos valores de agitação acompanhados por aumentos na vazão de alimentação de ar, torna-se uma alternativa operacional do equipamento em cultivos envolvendo células sensíveis ao cisalhamento, mas que necessitam de alta transferência de oxigênio, características apresentadas em cultivos de microrganismos filamentosos.

Em todos os sistemas estudados, observa que aumentos em  $K$  geram diminuições em  $\dot{\gamma}_m$ . Resultado semelhante foi também obtido por Cerri (2009), indicando que esta resposta é esperada devido ao fato que a viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) é inversamente proporcional à velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) para fluidos pseudoplásticos, conforme mostra a Equação (3.8).

Para fins comparativos, a Figura 5.16 ilustra valores estimados de  $\dot{\gamma}_m$  para os três tipos de impelidores em função das condições de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) para a solução de goma xantana SGX-5 ( $K = 1,47$  Pa.s<sup>n</sup> e  $n = 0,237$ ) como fluido não-Newtoniano. Pode-se observar que à medida que se aumenta  $\phi_{ar}$  nos sistemas, os valores estimados de  $\dot{\gamma}_m$  diminuem independentemente de  $N$ . Comportamentos similares foram obtidos para outras concentrações de goma xantana, conforme pode ser visto nas Figuras 5.13 – 5.15. Isto se deve ao fato de que com o aumento das bolhas de ar na dispersão gás-líquido (retenção gasosa) devido ao aumento de  $\phi_{ar}$ , há uma diminuição da densidade aparente do meio, resultando numa redução da potência transferida e, portanto, da transferência de quantidade de movimento ao meio (BADINO e SCHMIDELL, 2001). Comportamento similar também foi reportado por Cerri et al. (2008) trabalhando em um biorreator *airlift* de cilindros concêntricos com fluidos não-Newtonianos, onde os altos valores da velocidade superficial do gás ( $U_{gs} = Q_{ar}/A$ ) gera uma decréscimo nos valores de  $\dot{\gamma}_m$ , devido à coalescência de bolhas.

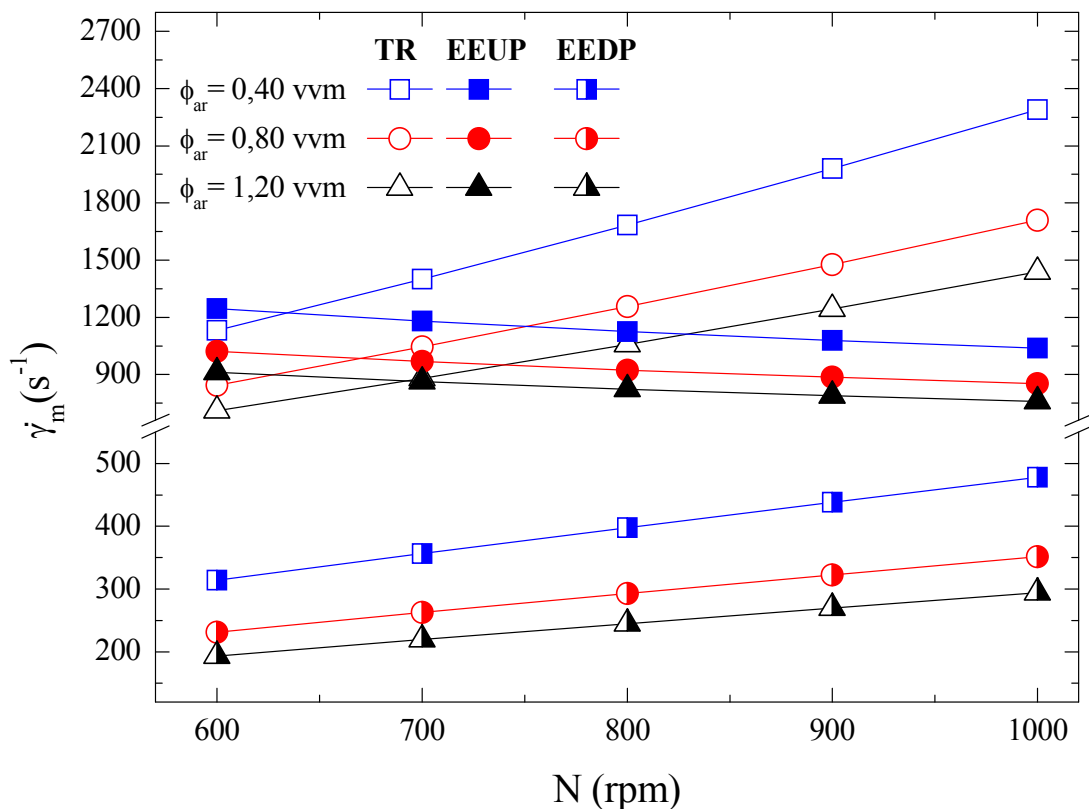
Para as condições de operação estudadas ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ), tem-se a seguinte ordem de

grandeza em termos de faixa de valores de  $\dot{\gamma}_m$ .

$$\dot{\gamma}_{TR} \gg \dot{\gamma}_{EEUP} > \dot{\gamma}_{EEDP}$$

Sabe-se da literatura que, impelidores que geram um escoamento radial são mais cisalhantes que, aqueles que geram escoamento predominantemente axial, como os “*Elephant Ear*”, os quais apresentam menor velocidade de cisalhamento. Tal característica pode ser verificada pelos resultados obtidos. Possivelmente devido ao padrão de escoamento ou ao tamanho das pás, sendo que os impelidores com pás de maior tamanho mostram-se menos cisalhantes (COLLINGNON et al., 2010).

**Figura 5.16.** Velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) em função da frequência de agitação (N) para os três impelidores (TR, EEUP e EEDP) considerando a solução XGS-5 em diferentes condições de aeração:  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm,  $\phi_{ar} = 0,80$  vvm,  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm



Observa-se que o impelidor TR mostrou-se mais cisalhante além de apresentar uma maior transferência de oxigênio seguido do impelidor EEUP. No entanto, o impelidor EEDP gerou valores muito baixos de  $\dot{\gamma}_m$  não mostrando diferença utilizando médios com valores de  $K > 1,0 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$  e  $n < 0,28$  e, por isso, este tipo de impelidor seria apropriado no desenvolvimento



de trabalhos com fluidos de média viscosidade, mas com baixa necessidade de transferência de oxigênio. Este baixo poder cisalhante também foi demonstrado no trabalho de Collingnon et al. (2010), sendo os impelidores EE e o impelidor TTP (Mixel), menos cisalhantes, comparados a outros na configuração de escoamento descendente (*down-pumping*).

Uma vez obtidas as equações de previsão de  $\dot{\gamma}_m$  é possível também prever o comportamento das condições de cisalhamento para diferentes condições de agitação e aeração com estes tipos de impelidores ao longo de cultivos envolvendo caldos não-Newtonianos pseudoplásticos a partir da Equação (3.11) que apresenta a  $\dot{\gamma}_m$  como uma função das “condições de operação reais” ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ), do coeficiente  $k_{La}$  e dos parâmetros reológicos  $K$  e  $n$  do cultivo, todos medíveis, e os coeficientes  $b$ ,  $c$ ,  $d$  e já determinados anteriormente para os diferentes impelidores.

#### 5.1.3.1. Viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ) e regime de agitação

Em relação ao regime de escoamento foi observada uma maior turbulência trabalhando com o impelidor TR seguido do EEUP com o aumento dos valores de  $N$  (600 → 1000 rpm). Por outro lado, com o incremento do  $\phi_{ar}$  este fenômeno é levemente amortecido.

Para o impelidor EEDP observou-se uma menor turbulência no meio agitado e aerado com o aumento das condições de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) para fluidos com baixas viscosidades. Porém, quando se aumenta a viscosidade destes fluidos, com o aumento da agitação e aeração o sistema se mostrou instável (altas vibrações mecânicas no vaso). Nesse sentido, a partir dos valores obtidos de  $\dot{\gamma}_m$  foi possível obter o número de Reynolds para os sistemas com os diferentes impelidores pela Equação (2.42), sendo calculada a viscosidade aparente média ( $\mu_{ap}$ ), considerando a densidade da água  $\rho = 995,65$  (kg/m<sup>3</sup>). Mostrando-se todos eles um comportamento altamente turbulento  $Re \geq 10^4$ , como mostrado na Tabela 5.8.

**Tabela 5.8. Faixa de número de Reynolds obtidos para os impelidores TR, EEDP e EEUP.**

Impelidor	Número de Reynolds (Re)
TR	$3712 < Re < 58084$
EEDP	$2038 < Re < 32287$
EEUP	$4948 < Re < 32955$

Como foi indicado partir dos valores da  $\dot{\gamma}_m$  foi possível estimar as faixas de viscosidade aparente média ( $\mu_{ap}$ ) segundo a Equação 3.7 em função das condições de agitação

(600-1000 rpm) para cada  $\phi_{ar}$ , sendo esses valores mostrados na Tabela 5.9. Assim, verificamos que com o aumento da agitação no vaso há uma diminuição nos valores da  $\mu_{ap}$ , contrariamente aos valores obtidos de  $\dot{\gamma}_m$  para esses fluidos pseudoplásticos.

**Tabela 5.9. Faixa de viscosidade aparente média ( $\mu_{ap}$ ) para os impelidores TR, EEDP e EEUP em função das condições de operação.**

$\phi_{ar}$ vvm	$\mu_{ap}$ (Pa.s)		
	TR	EEDP	EEUP
0,40	0,0016 - 0,01087	0,0032 - 0,021	0,0025 - 0,011
0,80	0,00206 - 0,01359	0,00416 - 0,02726	0,002917 - 0,013
1,20	0,00235 - 0,01549	0,00477 - 0,03126	0,003187 - 0,01478

\*São considerados valores mínimos e máximos

#### 5.1.4. Comparação entre os valores da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) com a literatura

Na sequência, procedeu-se a comparação dos valores de  $\dot{\gamma}_m$  obtidos nesta etapa do trabalho com valores de literatura, no caso para o impelidor TR, devido à existência na literatura de correlações para obtenção de  $\dot{\gamma}_m$  apenas para este modelo de impelidor. Para tal fim, utilizou-se a Equação (5.7) e compararam-se os resultados com aqueles obtidos das correlações de literatura apresentadas na Tabela 2.2. Para efetuar a comparação, utilizou-se como fluido uma solução de goma xantana de concentração elevada (SGX-5), nas diferentes condições de operação (N e  $\phi_{ar}$ ). A Figura 5.17 ilustra os valores de  $\dot{\gamma}_m$  obtidos pela Equação (5.7) e pelas demais correlações de literatura.

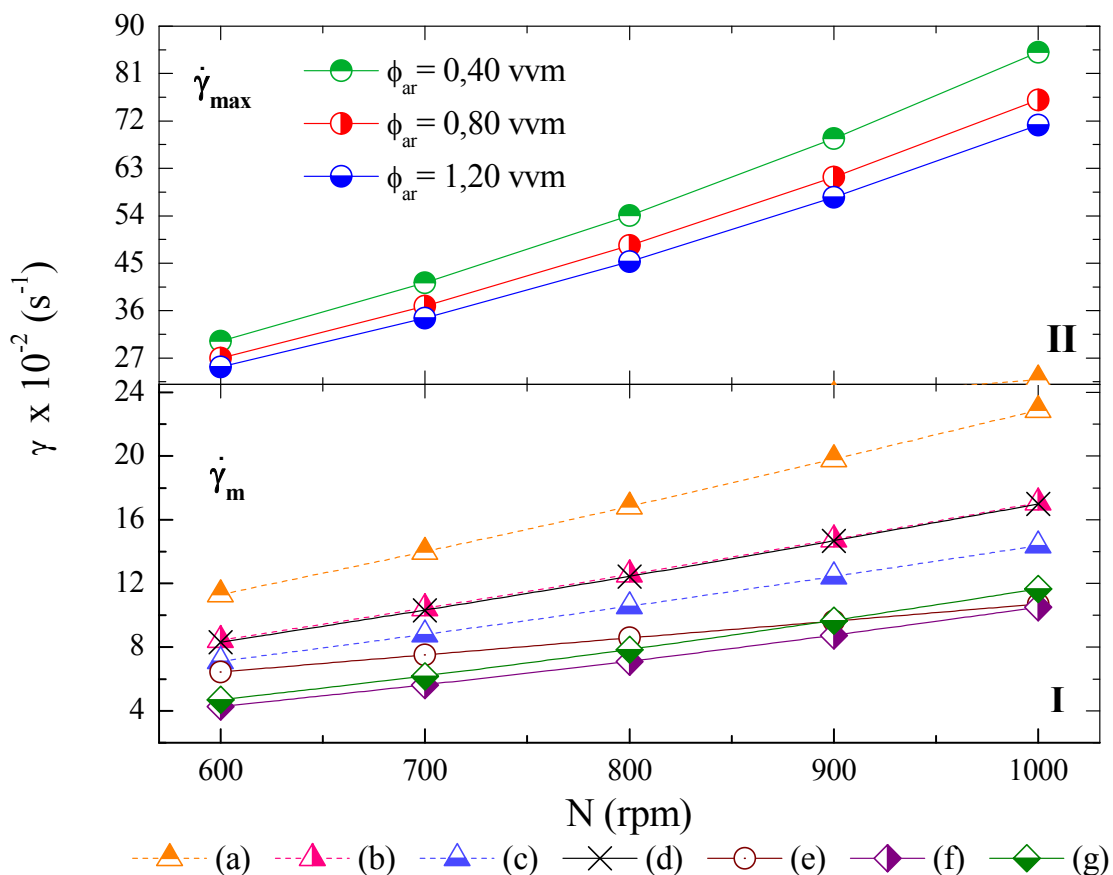
Na região I da Figura 5.17, observa-se que as curvas geradas pela equação de previsão do presente trabalho (Equação (5.7)) encontram-se inseridas na faixa de valores previstos por correlações da literatura. Cabe dizer, que os resultados obtidos com  $\phi_{ar}=0,80$  vvm foram bem próximos aos obtidos por Pérez et al. (2006). As correlações propostas por Kelly e Gigas (2003) e Pérez et al. (2006) foram obtidas em regime transiente de agitação mas, no entanto, elas foram extrapoladas para o regime turbulento para comparação com as demais correlações.

Das correlações propostas por Campesi et al. (2009) aqui citadas, deve-se mencionar que as mesmas não levam em consideração a influência da aeração ( $\phi_{ar}$ ) nas estimativas de

$\dot{\gamma}_m$ . Portanto, essas parecem ser incompletas e pode-se afirmar que a correlação proposta (Equação (5.7)), mostra-se mais apropriada e completa por considerar a influência de diversas variáveis em  $\dot{\gamma}_m$  como as variáveis de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) e as propriedades reológicas do fluido não-Newtoniano ( $K$  e  $n$ ) operando os biorreatores em regime altamente turbulento.

Na região II foi considerada a correlação obtida por Robertson e Ulbrecht (1987) apenas para conferir com valores máximos de cisalhamento, obtidas na ponta do impelidor, sendo estes valores superiores aos valores obtidos com a equação de previsão de  $\dot{\gamma}_m$  obtidas no presente trabalho.

**Figura 5.17. Comparação de correlações de  $\dot{\gamma}$  da literatura para fluidos não-Newtonianos em regímen turbulento utilizando o impelidor TR: I) Comportamento de  $\dot{\gamma}_m$  em (a, b, c) no presente trabalho para 0,40; 0,80 e 1,20 vvm; (d) Pérez et al. (2006); (e) Kelly e Gigas (2003); (f, g) Campesi et al. (2009) e, em II) Comportamento dos valores de  $\dot{\gamma}_{max}$  desenvolvida por Robertson e Ulbrecht (1987) considerando 0,40; 0,80 e 1,20 vvm.**



### 5.1.5. Potência dissipada

Foram realizados ensaios, a fim de determinar a potência imposta ao sistema ( $P$ ) pelos impelidores. Tal potência dissipada a partir do um impelidor é caracterizada pelo número de potência ( $N_p$ ). Os resultados de consumo de potência do sistema gaseificado ( $P_g$ ) normalizados pelo consumo de potência do sistema não gaseificado ( $P_0$ ), qual seja, ( $P_g/P_0$ ), e de número de potência ( $N_p$ ) são mostrados na Figura 5.18 à Figura 5.20 em função de  $N$  para água e solução de glicerol agitados pelos diferentes impelidores.

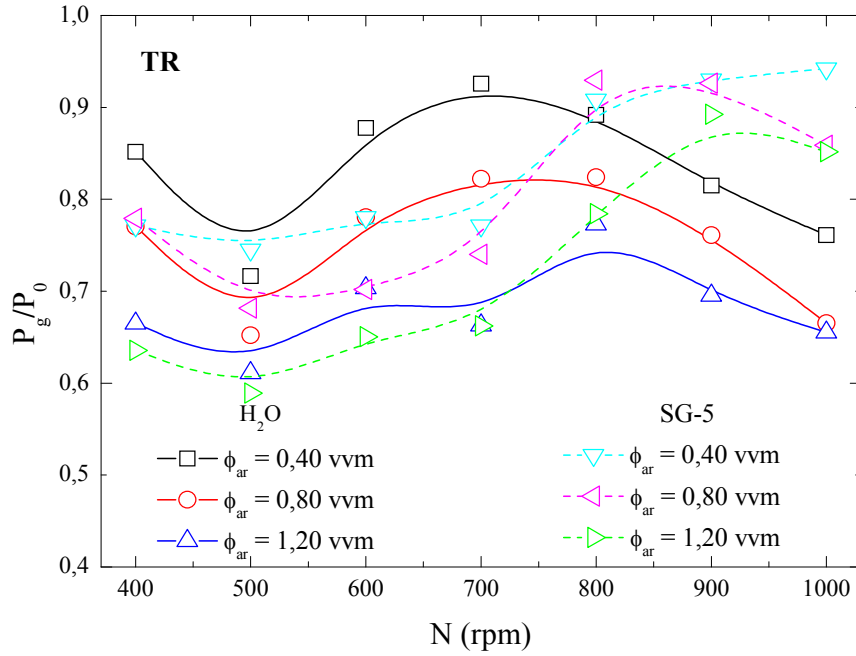
Observando as Figura 5.18 (a) e Figura 5.19 (a), nota-se elevados níveis de aeração não afetaram significativamente o consumo de potência dos impelidores RT e EEDP, isto é,  $P_g/P_0$  variou de 0,6 a 0,9 para o impelidor TR e de 0,7 a 1,0 para o impelidor EEDP. Por outro lado, o consumo de potência do sistema equipado com o impelidor EEUP foi levemente afetado pelo aumento de  $N$  para ambos os fluidos (água e SG-5) com variações de  $P_g/P_0$  entre 0,8 a 0,9, como pode-se observar na

Figura 5.20. Verificou-se também que para  $N \leq 600$  rpm, utilizando-se  $H_2O$  e altos valores de  $\phi_{ar}$  (= 1,20 vvm), o consumo relativo de potência do impelidor EEUP foi fortemente afetado.

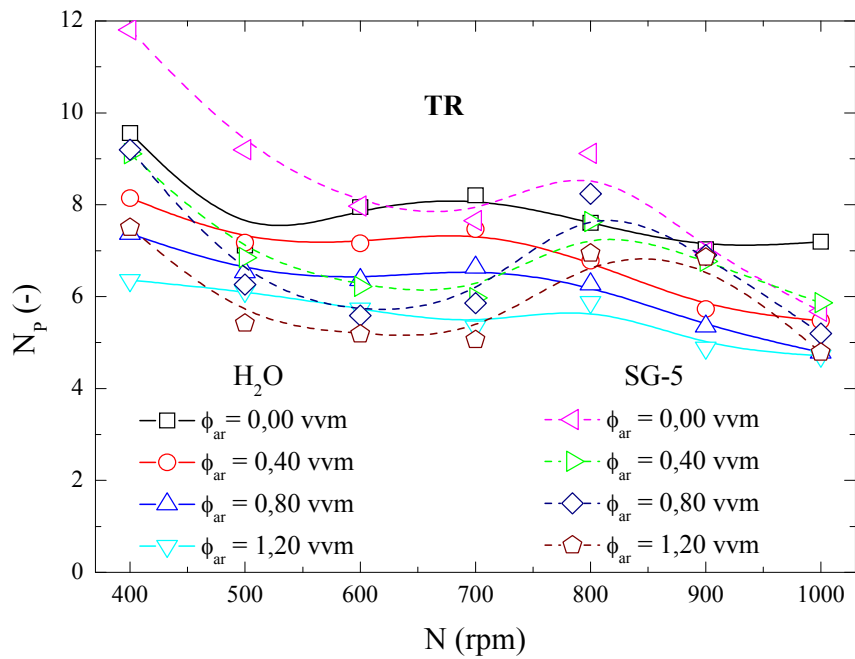
Nas Figuras 5.18 (b), 5.19 (b) e 5.20 (b) são apresentados os comportamentos do número de potência ( $N_p$ ) para cada impelidor em função de  $N$ , considerando as diferentes condições de aeração para os dois fluidos. Avaliando-se o comportamento de  $N_p$ , embora a literatura afirme que em regime turbulento ( $Re > 10^4$ ), este parâmetro é independente da viscosidade do fluido (KRESTA e BRODKEY, 2003), para o impelidor EEDP (Figura 5.19 (b)) observou-se uma variação significativa onde  $N_p$  para o fluido com maior viscosidade (SG-5).

Observando-se os valores de  $N_p$  para o impelidor TR que apresenta valores praticamente constantes para elevados valores de  $N$  (Figura 5.18 (b)) na faixa de 5 a 12, dependendo da condição de aeração empregada, em concordância com os resultados obtidos por Rushton et al. (1950). Além disso, conforme se aumenta  $\phi_{ar}$  (0,40; 0,80 e 1,20 vvm), os valores de  $N_p$  foram afetados diminuindo para cerca de 5. O  $N_p$  para esse impelidor mostrou-se indiferente com relação à viscosidade dos fluidos, uma vez que todos os valores de  $Re$  já se encontravam no regime turbulento. Porém, quando a solução SG-5 foi aerada, uma acentuada queda em  $N_p$  foi observada para  $N > 800$  rpm.

Figura 5.18. Consumo de potência para o sistema equipado com o impelidor TR em sistemas com H<sub>2</sub>O e SG-5 sob as diferentes condições de aeração ( $\phi_{ar}$ ): (a)  $P_g/P_0$  em função da frequência de rotação N. (b) número de potência ( $N_p$ ) em função da frequência de rotação N.

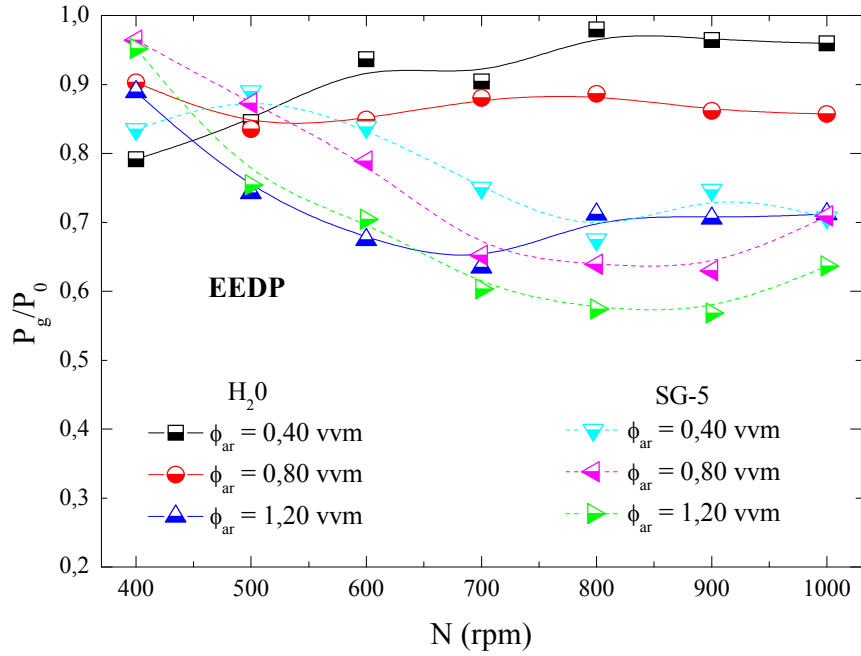


(a)

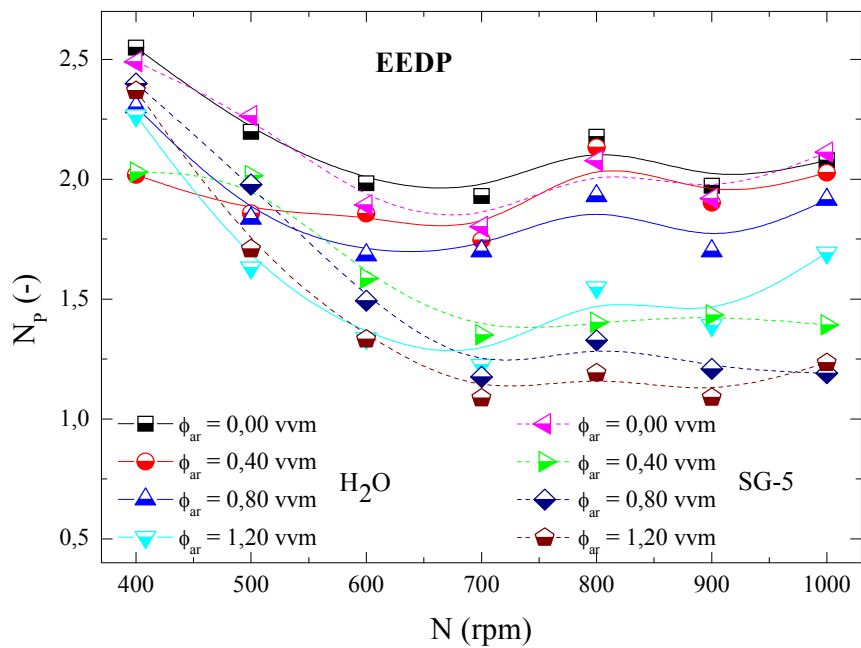


(b)

Figura 5.19. Consumo de potência para o sistema equipado com o impelidor EEDP em sistemas com H<sub>2</sub>O e SG-5 sob as diferentes condições de aeração ( $\phi_{ar}$ ): (a)  $P_g/P_0$  em função da frequência de rotação N. (b) número de potência ( $N_p$ ) em função da frequência de rotação N.

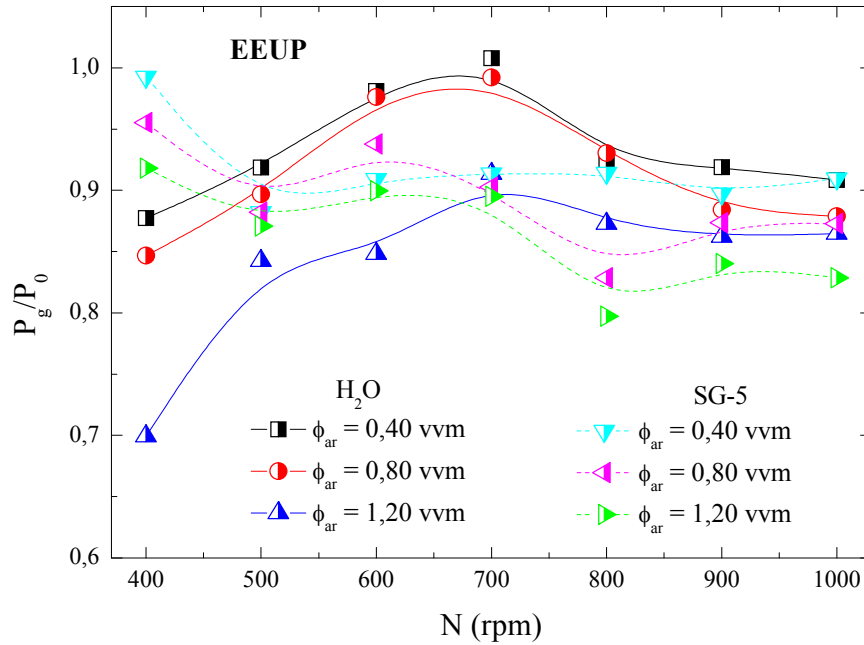


(a)

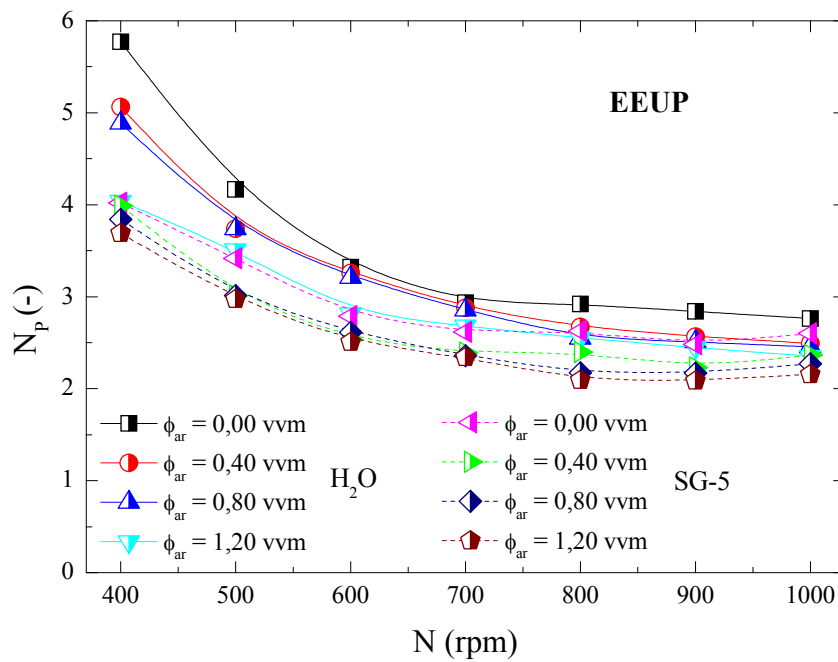


(b)

Figura 5.20. Consumo de potência para o sistema equipado com o impelidor EEUP em sistemas com H<sub>2</sub>O e SG-5 sob as diferentes condições de aeração ( $\phi_{ar}$ ): (a)  $P_g/P_0$  em função da frequência de rotação N. (b) número de potência ( $N_p$ ) em função da frequência de rotação N.



(a)



(b)

Os valores de  $N_p$  com relação ao impelidor EEDP mostrados na Figura 5.19 (b) para ambos os fluidos na ausência de ar foram próximos (2,6 para a água e 2,0 para a solução de glicerol SG-5). Porém, quando foram utilizados elevados valores de  $\phi_{ar}$  (= 1,20 vvm) utilizando  $H_2O$ , uma queda de aproximadamente 38% foi observada para  $N = 700$  rpm. O mesmo aconteceu para o fluido SG-5 quando foi aerado, mostrando valores entre 1,1 e 1,5. Resultados semelhantes foram observados por Zhu et al. (2009) mediante em ensaios com  $N < 600$  rpm. Os valores de  $N_p$  para  $N \geq 700$  rpm apresentaram tendência a evoluir com ausência e em presença da aeração para ambos os fluidos.

Para o impelidor EEUP na ausência de aeração, foram obtidos valores de  $N_p$  inferiores a 6, tanto para a água quanto para a solução SG-5, com  $N_p$  igual a 2,9 e 2,7, respectivamente, para  $N > 800$  rpm. Por outro lado, pela Figura 5.20 (b), observa-se que este impelidor  $N_p$  é influenciado por aumentos em  $\phi_{ar}$ , sendo obtidos valores mínimos para  $H_2O$  e para solução SG-5. Observando o comportamento de  $N_p$  para  $N > 800$  rpm, os valores foram relativamente constantes para ambos os fluidos, aerados ou não. Isso poderia explicar a eficiência deste impelidor com relação à transferência de massa e com decréscimo de  $\dot{\gamma}_m$  em comparação aos impelidores EEDP e RT.

Em todos os casos, quando o ar é introduzido no meio líquido agitado ocorre uma instantânea redução da potência transmitida pelo agitador, devido à diminuição da densidade aparente do meio, (BADINO e SCHMIDELL, 2001). No entanto, as propriedades físicas do fluido devem ser consideradas (MARTIN et al., 2010). Esta redução foi mais evidente quando se aumenta  $\phi_{ar}$ . Por exemplo, no sistema equipado com o impelidor EEDP (Figura 5.19 (b)) os resultados obtidos para o impelidor EEDP foram concordantes com os reportados por Zhu et al. (2009), onde o comportamento de  $N_p$  não foi afetado pelas menores vazões de alimentação de ar ( $\phi_{ar} = 0,01$  e  $0,005$  vvm), mas sim com  $\phi_{ar} = 0,5$  vvm.

Outra observação interessante é que a redução de potência para o impelidor EEUP (Figura 5.20 (a)) foi praticamente independente da vazão de ar ( $\phi_{ar}$ ), apresentando um máximo de  $P_g/P_0 \approx 0,95$  para  $N = 400$  rpm, muito próximo ao valor obtido por Zhu et al. (2009) sendo  $P_g/P_0 \approx 1$ . No entanto, com relação aos valores de  $N_p$  obtidos no presente trabalho (entre 2,4 e 2,9, vide Figura 5.20 (b)), foram superiores aos reportados por Zhu et al. (2009) ( $N_p = 1,7$ ) quando  $N < 700$  rpm. Deve ser considerado que o sistema utilizado por Zhu et al. (2009) foi diferente ao utilizado neste trabalho. Na Tabela 5.1 é apresentado em resumo dos resultados discutidos acima.



Tabela 5.1. Comparação do número de potência nos sistemas estudados nessa tese de doutorado.

Impelidor	N <sub>P</sub> (presente trabalho)		N <sub>P</sub> (na literatura)		Referência
	Sem ar	Redução com ar	Sem ar	Redução com ar (%)	
TR	≈ 7 - 8	25 -37,5 %	6,6		(Rushton et al., 1950)
EEDP	≈ 2,1 - 2,3	34,8 - 43%	2,1	30% ( $\phi_{ar} = 0,50$ vvm)	(Zhu et al., 2009)
			2,4		Sieck et al., 2013
EEUP	≈ 2,4 -2,9	22 - 27 %	1,7	Não é afetado	(Zhu et al., 2009)

Dos resultados ilustrados nas Figuras 5.18 até 5.20 podem-se classificar os impelidores estudados com base ao número de potência na seguinte ordem:

$$TR > EEUP > EEDP$$

Ainda, a influência efetiva do ar na redução dos valores de N<sub>P</sub> com aumentos da agitação foi a seguinte:

$$EEDP > TR > EEUP$$

Porém, deve-se considerar a presença de aeração pela superfície à medida que agitação foi aumentada em sistemas não aerados.

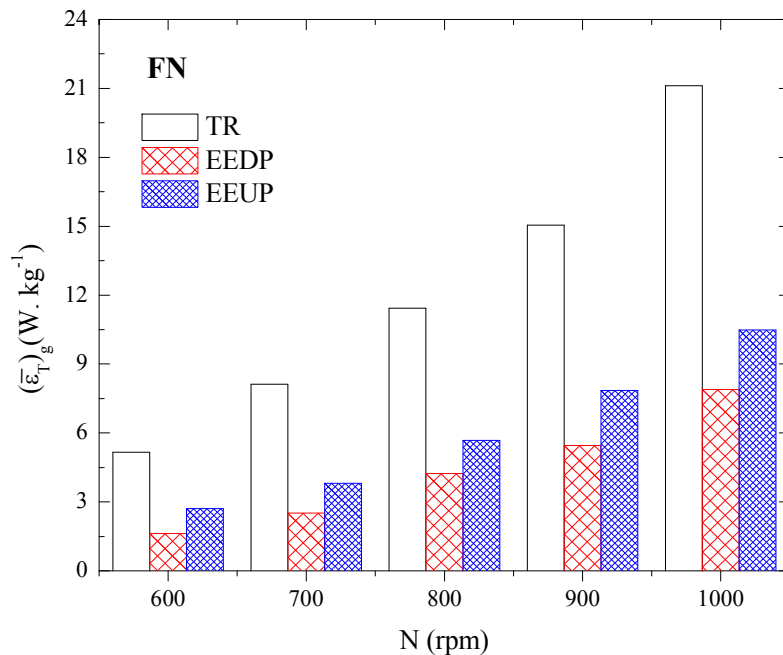
### 5.1.6. Dissipação de energia e microescala de turbulência de Kolmogorov ( $\eta_K$ )

Uma vez estudado o consumo de potência para os três sistemas, nesta seção foi avaliada a dissipação de energia  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  nos sistemas em diferentes condições de operação calculada pela Equação (2.49), e a microescala de turbulência de Kolmogorov calculada pela Equação 2.46 para tais sistemas.

Os sistemas estudados apresentam uma maior dissipação de energia quando o sistema não é aerado, especialmente operando o sistema com o impelidor TR (Figura 5.21), obtendo-se o valor de 21 W.kg<sup>-1</sup> na máxima condição de agitação. Já nos outros sistemas operando com os impelidores EE, foram obtidos valores inferiores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$ , mas apresentando o mesmo comportamento, sendo obtido para o impelidor EEDP 8,4 W.kg<sup>-1</sup> e para o impelidor EEUP 10,8 W.kg<sup>-1</sup> para a máxima condição de agitação (vide Tabela 5.2). Conforme relatado por

Kresta e Brodkey (2003), para a descarga típica desses impelidores EE foi obtido um valor de  $10 \text{ W.kg}^{-1}$ , muito semelhante aos valores obtidos no presente trabalho.

**Figura 5.21. Dissipação de energia  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  imposta aos sistemas com FN equipados com três impelidores sem aeração em diferentes níveis de agitação.**



A partir dos resultados obtidos referentes à soma das dissipações de energias por borbulhamento de ar no sistema  $(\bar{\epsilon}_T)_s$  Equação (2.50) e a gerada pela agitação em condições de aspersão  $(\bar{\epsilon}_T)_{Ig}$  Equação (2.51), os valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_s$  mostraram ser muito inferiores com valores entre  $0,0196$  e  $0,059 \text{ W.kg}^{-1}$ , mesmo com aumento de  $\phi_{ar}$  de  $0,40$  para  $1,20 \text{ vvm}$ . Concluindo, os valores obtidos da dissipação de energia gerada pelo impelidor quando o sistema foi aerado  $(\bar{\epsilon}_T)_{Ig}$  exibiu altos valores (Tabela 5.2) se comparados com os obtidos de  $(\bar{\epsilon}_T)_s$ , sendo desta forma o impelidor praticamente o único responsável pela a dissipação da energia aplicada ao sistema.

Na Tabela 5.2 são apresentados os comportamentos de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  para cada sistema com FN e FNN em função de  $\phi_{ar}$  e  $N$ , assim mesmo na Figura 5.22 se ilustra esse comportamento.

Deve-se ressaltar o aumento dos valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  com aumentos da agitação utilizando o impelidor radial TR.

**Tabela 5.2.** Valores da dissipação de energia  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  em função das condições de agitação e aeração para três sistemas agitados com impelidores TR, EEDP e EEUP, utilizando como fluidos H<sub>2</sub>O (FN) e SGX-5 (FNN).

Tipo Impelidor	Dissipação de Energia $(\bar{\epsilon}_T)_g$ (W. kg <sup>-1</sup> )			
	$\phi_{ar}$ (vvm)			
	FN	FNN		
	0,00	0,40	0,80	1,20
<b>TR</b>	5,17 – 21,12	4,56 – 16,09	4,07 – 14,09	3,69 – 13,89
<b>EEDP</b>	1,62 – 7,88	1,54 – 7,71	1,42 – 7,3	1,15 – 6,48
<b>EEUP</b>	2,72 – 10,48	2,69 – 9,47	2,67 – 9,34	2,37 – 8,97

\*Valores tabelados da dissipação de energia mínimos e máximos referente a 600- 1000 rpm..

Observa-se que os valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  obtidos para o impelidor EEUP são superiores que os obtidos para o impelidor EEDP que exibiu aumentos menores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  em função do aumento da agitação em comparação com os outros dois impelidores. Desta forma, podem-se classificar os impelidores estudados com base na dissipação de energia na seguinte ordem:

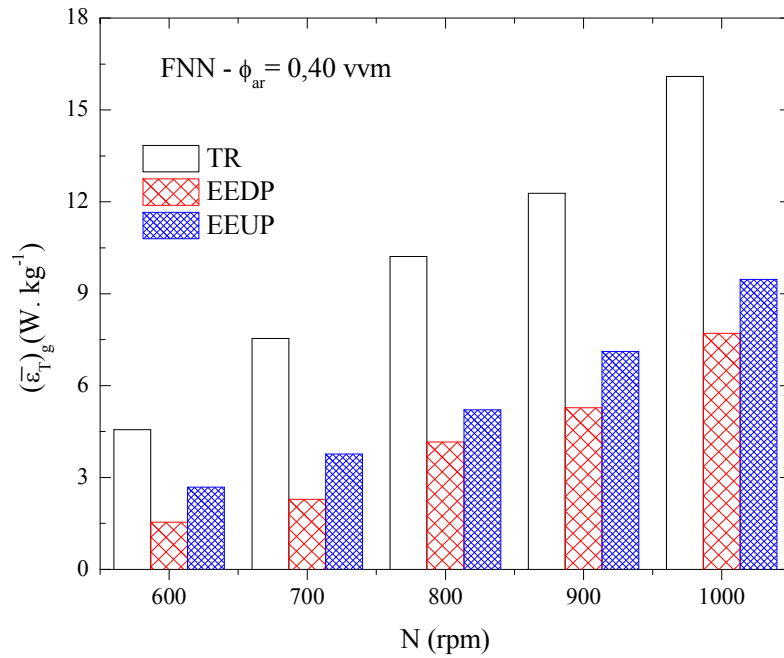
$$TR \ggg EEUP > EEDP.$$

Comportamento contrário aos valores obtidos por Zhu et al. (2009) utilizando os impelidores EE foi observado. Estes autores reportam valores menores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  operando com impelidor EEUP e valores maiores operando o sistema com o impelidor EEDP.

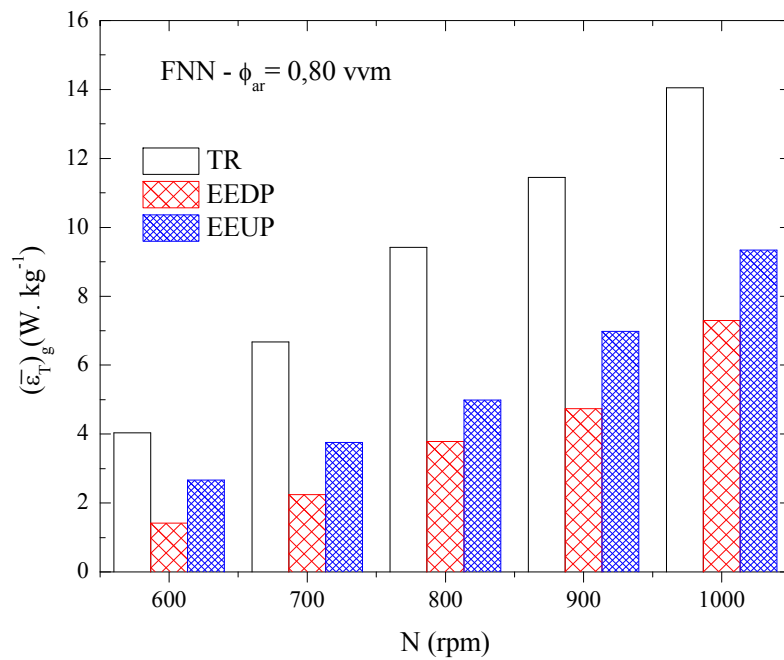
Quando é adicionado ar a um sistema agitado contendo um FNN, os valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  são atenuados (Tabela 5.2), evidenciando a diminuição da densidade aparente do meio e redução da transferência de quantidade de movimento, conforme o exposto por Badino e Schmidell (2001), sendo o impelidor EEUP o menos afetado a medida que foi alimentado ar no sistema, apresentando valores entre 2,37 e 9,47 W.kg<sup>-1</sup>. Os outros sistemas apresentaram valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  entre 3,69 e 16 W.kg<sup>-1</sup> (impelidor TR) e entre 1,15 e 7,71 W.kg<sup>-1</sup> (impelidor EEDP) com aumentos de N (Tabela 5.2).

A resposta dos impelidores TR e EEDP pode ser explicada devido ao fenômeno nomeado de *flooding* (afogamento do impelidor) (ZHU et al., 2009), fenômeno indesejado que implica na queda da eficiência do sistema quando o mesmo é aerado. Segundo Nienow e Bujalski (2004) os impelidores EE na configuração de escoamento descendente (*down-pumping*) são eficazes na suspensão de sólidos quando o sistema não é aerado e uma vez aerado, apresentam perdas na sua capacidade.

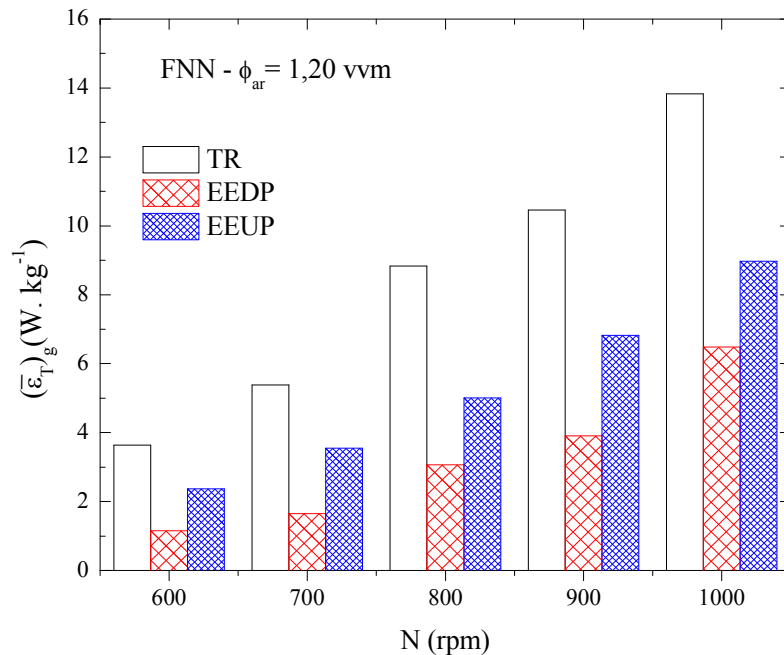
Figura 5.22. Níveis da dissipação de energia  $(\bar{\varepsilon}_T)_g$  impostos aos sistemas com fluido não-Newtoniano (SGX-5) variando N equipado com impelidores TR, EEDP e EEUP. Níveis de aeração: a)  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm, b)  $\phi_{ar} = 0,80$  vvm e c)  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm.



(a)



(b)



(c)

Esta é uma característica importante no desempenho deste tipo de impelidor em cultivos de células animais utilizando microcarregadores (COLLINGNON et al., 2010). Resultados similares também foram obtidos por Zhu et al. (2009) com os impelidores axiais EEDP e EEUP obtendo valores baixos de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  quando o sistema foi operado a 600 rpm utilizando como FN a H<sub>2</sub>O, mostrando-se o impelidor EEUP como a mais efetivo para sistemas aerados.

Com aumentos na vazão específica de ar ao meio nos três sistemas de impelidores, os mesmos apresentaram a seguinte relação em função aos níveis de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$ :

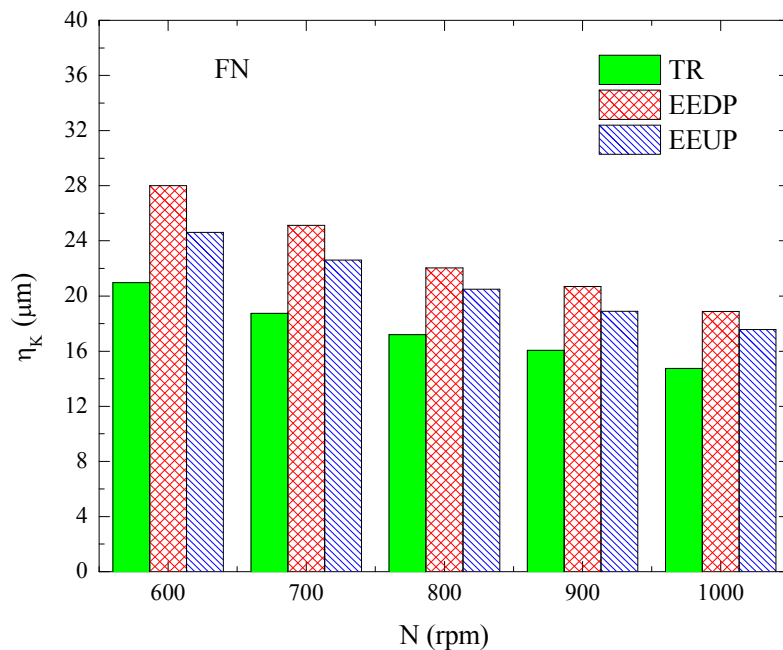
$$TR > EEDP > EEUP$$

A partir desses resultados, pode-se demonstrar que a dissipação de energia aumenta devido a aumentos na agitação do impelidor tanto em sistemas aerados como em não aerados para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos, sendo estes influenciados negativamente por aumentos na aeração. Além disso, deve-se considerar que a dissipação de energia não é uniforme no reator, devido à alta velocidade nas regiões próximas ao impelidor e às regiões estagnadas próximas às paredes do vaso.

A partir de valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  foi possível determinar valores da microescala de turbulência de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) de acordo com metodologia apresentada na seção 4.1.5, ou

seja, o tamanho do micro-turbilhão gerado no sistema altamente turbulento com ou sem aeração. Observando as Figura 5.23 e 5.24, pode-se afirmar que os micro-turbilhões em FN possuem dimensões menores em comparação aos micro-turbilhões obtidos em sistemas com FNN aerados.

**Figura 5.23. Valores da microescala de Kolmogorov ( $\eta_K$  em  $\mu\text{m}$ ) para um sistema com FN ( $\text{H}_2\text{O}$ ) não aerado, com diferentes níveis de agitação com impelidores TR, EEDP e EEUP.**



Observa-se que nos sistemas operados com FNN, os valores de  $\eta_K$  vão diminuindo conforme se aumenta a agitação nos três sistemas de impelidores, mas para um valor de N fixo com aumentos nos níveis de ar, aumentam as dimensões dos micro-turbilhões. De acordo com os valores apresentados na Tabela 5.3, observa-se que os valores de  $\eta_K$  encontram-se entre 45 e 127  $\mu\text{m}$  para o impelidor TR, entre 132 e 357  $\mu\text{m}$  para o impelidor EEDP e entre 80 e 123  $\mu\text{m}$  para EEUP. Nota-se, portanto, que foram menores os turbilhões gerados pelos impelidores TR e EEUP em comparação aos gerados com o impelidor EEDP. Segundo Bailey e Ollis (1986), em sistemas de biorreatores tipo tanque agitado os micro-turbilhões ou redemoinhos de menor tamanho se encontram na faixa de 10 e 100  $\mu\text{m}$ .

Pode-se classificar os impelidores em escala decrescente da microescala de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) de acordo como segue:

$$\text{EEDP} \gg \text{EEUP} > \text{TR}$$

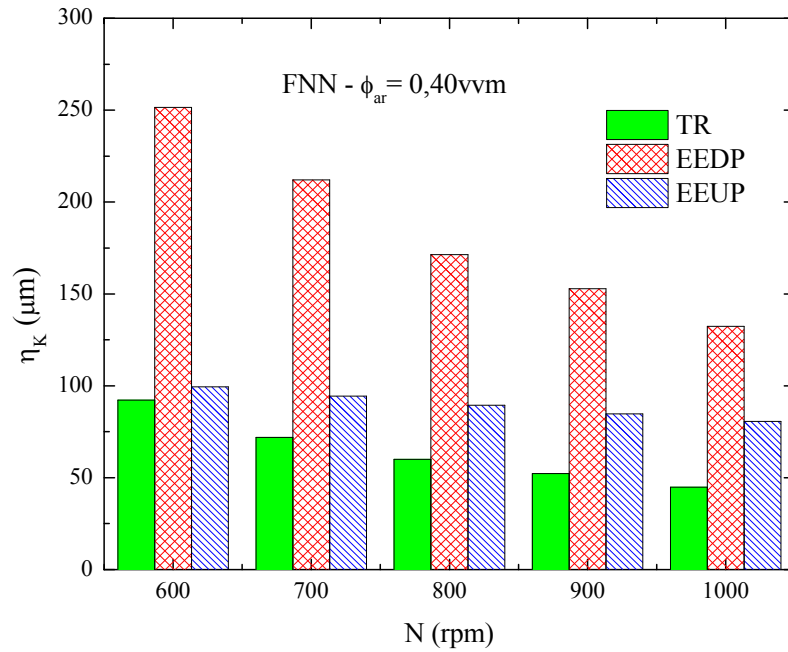
Esta classificação indica que o impelidor EEDP provoca altos valores de microescala de Kolmogorov e o impelidor TR é o mais cisalhante por formar micro-turbilhões de menor tamanho. No entanto, esta resposta (micro-turbilhões de menor tamanho) é prejudicial ao processo quando se utiliza este impelidor em cultivos de células altamente sensíveis ao cisalhamento, o que indica que o impelidor TR gera maior dano potencial às células. Já, diante desses resultados, observa-se que o impelidor EEDP é o mais adequado para uso em cultivos de microrganismos sensíveis ao cisalhamento. No entanto, deve também ser considerado o dano celular gerado pelas bolhas de ar nestas condições. Logo, a frequência de borbulhamento deve ser controlada, conforme relatado por Joshi (1996).

**Tabela 5.3. Valores da microescala de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) para frequências de agitação entre 600 e 1000 rpm nos sistemas equipados com os impelidores TR, EEDP e EEUP, utilizando FN ( $H_2O$ ) sem aeração e FNN (SGX-5) com diferentes níveis de aeração.**

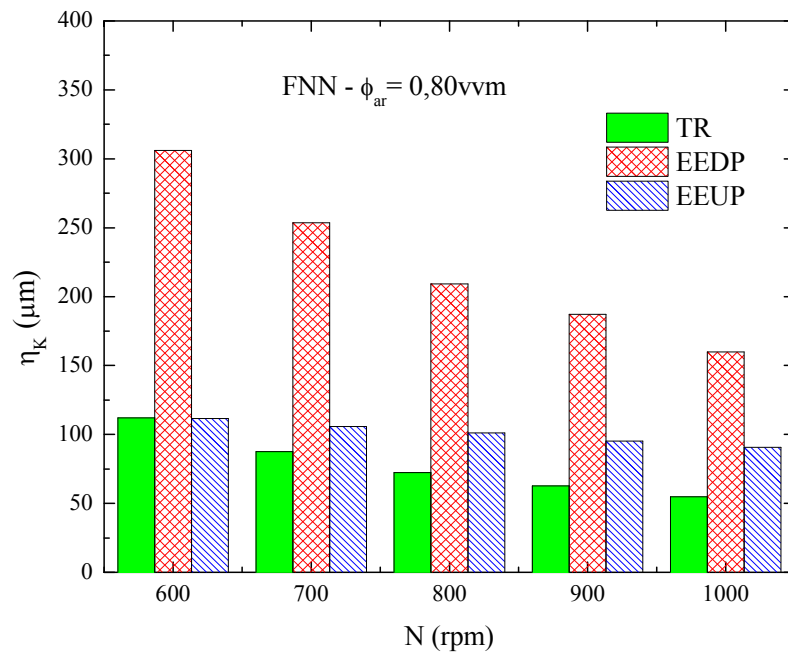
Tipo Impelidor	Escala de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) ( $\mu m$ )			
	$\phi_{ar}$ (vvm)			
	FN	FNN		
	0,00	0,40	0,80	1,20
<b>TR</b>	21 – 14,7	92 - 45	112,1 – 54,9	126,7 – 60,8
<b>EEDP</b>	28 – 18,9	251,6 – 132,4	306 – 160	357 – 182,5
<b>EEUP</b>	24,6 – 17,6	99,5 – 80,6	111,7 – 90,6	123 – 97,7

Deve-se também supor que a escala de micro turbulência de Kolmogorov não é constante no interior do tanque, resultando em variações de uma região a outra, muitas vezes apresentando valores menores ao valor médio no escoamento na descarga do impelidor como referido por Collignon et al. (2010), sendo o valor mínimo de  $\eta_K$  1/3 do valor médio obtido. Como consequência, os impelidores EE podem ser indicados como os mais adequados para operar em cultivos sensíveis ao cisalhamento por apresentar micro-turbilhões que originam menores valores de dissipação de energia ( $(\bar{\epsilon}_T)_g$ ). Conforme indica a literatura, altos valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  estão ligados ao dano celular (NIENOW, 2006). Analisando ambos os impelidores EEDP e o EEUP, pode-se notar que os valores da  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  obtidos para o impelidor EEUP foram relativamente maiores que os valores obtidos para o impelidor EEDP. Portanto, esta resposta foi positiva para o impelidor EEUP.

Figura 5.24. Microescala de Kolmogorov ( $\eta_K$ ) considerando para um FNN (SGX-5), agitado com diferentes níveis de agitação em impelidores TR, EEDP e EEUP. Condições de aeração: a)  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm b)  $\phi_{ar} = 0,80$  vvm e c)  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm.

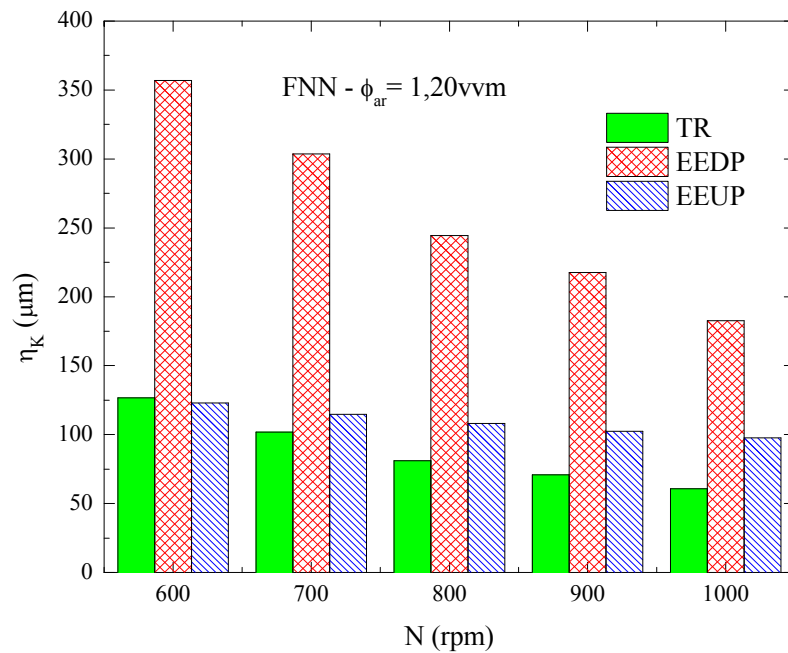


(a)



(b)





(c)

Este efeito também foi reportado por Zhu et al. (2009) que indicam que altos valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  e vazões de ar ( $\phi_{ar}$ ) são requeridos para satisfazer uma elevada transferência de oxigênio com aumentos na densidade celular, mostrando que o impelidor EEUP mostrou-se mais efetivo.

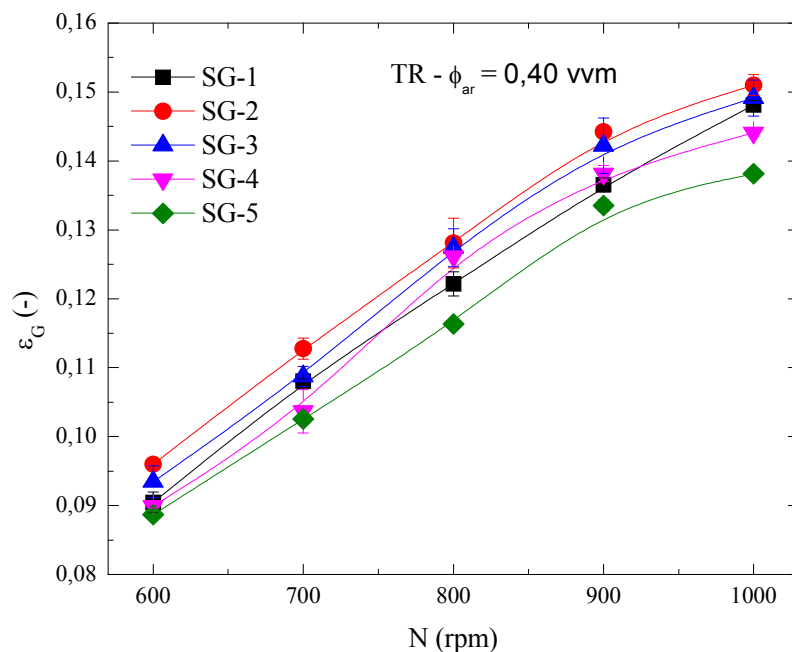
Portanto, um efeito negativo em microrganismos sensíveis ao cisalhamento ocorrerá num sistema operando com o impelidor TR, conforme os resultados experimentais obtidos nesta etapa.

### 5.1.7. Retenção gasosa global ( $\epsilon_G$ )

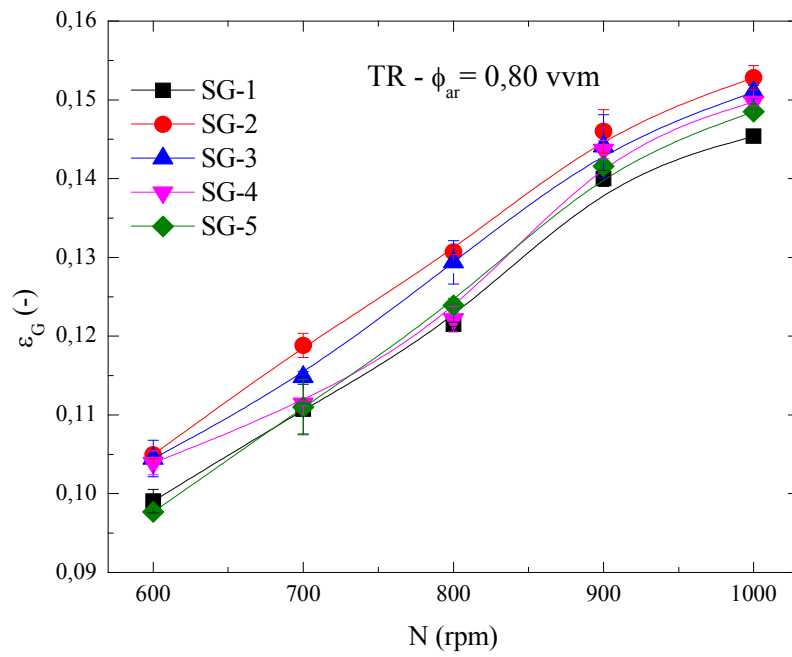
A fração volumétrica de gás no reator ou retenção gasosa global ( $\epsilon_G$ ), obtida pela Equação (2.30), é um parâmetro fundamental no projeto do biorreator, pois determina o tempo de permanência do gás no líquido, a área interfacial gás-líquido e, portanto, a transferência de massa da fase gasosa para a fase líquida. A análise realizada nesta etapa do trabalho baseou-se na avaliação da influência da viscosidade dos fluidos utilizados na retenção gasosa para cada tipo de sistema utilizado.

A elevada turbulência e a geração de espuma no sistema dificultou a tomada de medidas precisas de parâmetro  $\varepsilon_G$ , sendo todas as medidas obtidas em triplicata. Na sequência são apresentados os comportamentos obtidos de  $\varepsilon_G$  em função das condições de operação para os três sistemas de impelidores utilizados (Figuras 5.25, 5.26 e 5.27), operados com fluidos Newtonianos. Uma intensa turbulência foi encontrada ao se operar com o impelidor TR, comportamento já esperado. Ao se operar com impelidores de escoamento misto axial/radial (EE) seu comportamento foi característico, isto é, nos ensaios com o impelidor EEUP a turbulência mostrou-se mais atenuada. Mesmo com aumento da aeração e operando com fluidos de baixa viscosidade foi observado esse comportamento do escoamento misto, mas em fluidos mais viscosos o comportamento axial foi predominante. Inicialmente, no sistema com o impelidor EEDP operando com fluidos menos viscosos, este se mostrou muito favorável em termos de homogeneização do meio, favorecendo a transferência gás-líquido, além de uma turbulência moderada. No entanto, com altas viscosidades e aumentos de  $N$  e  $\phi_{ar}$ , este se mostrou um sistema instável e altamente caótico, o qual seria explicado pelo afogamento (*flooding*) do impelidor no sistema.

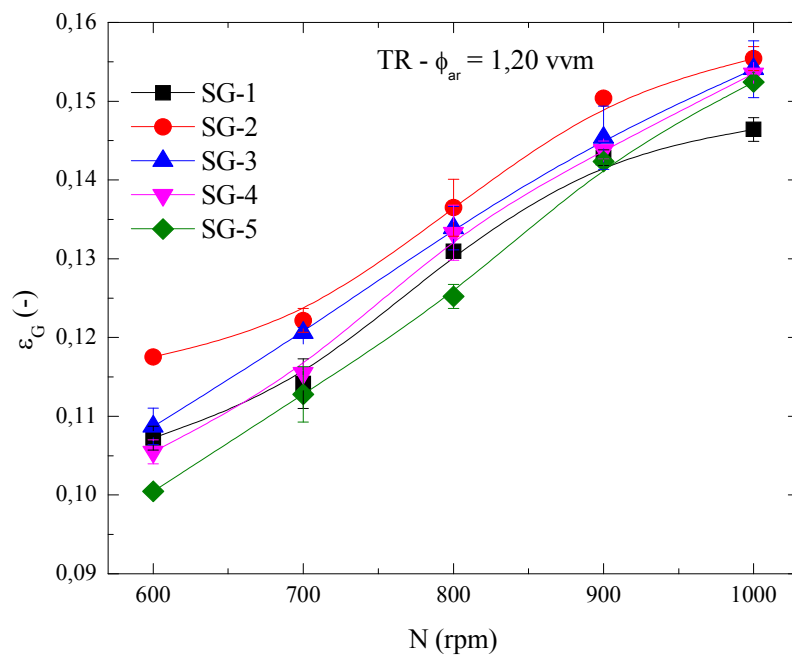
**Figura 5.25. Variação de  $\varepsilon_G$  em função da frequência de rotação ( $N$ ) no sistema com o impelidor TR operando com FN em diferentes níveis de aeração: a)  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm, b)  $\phi_{ar} = 0,80$  vvm e c)  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm.**



(a)

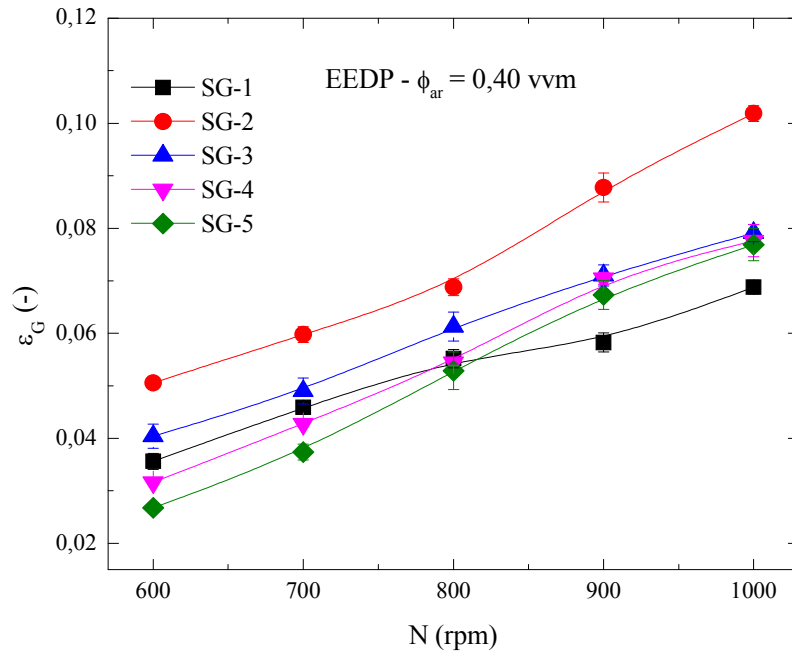


(b)

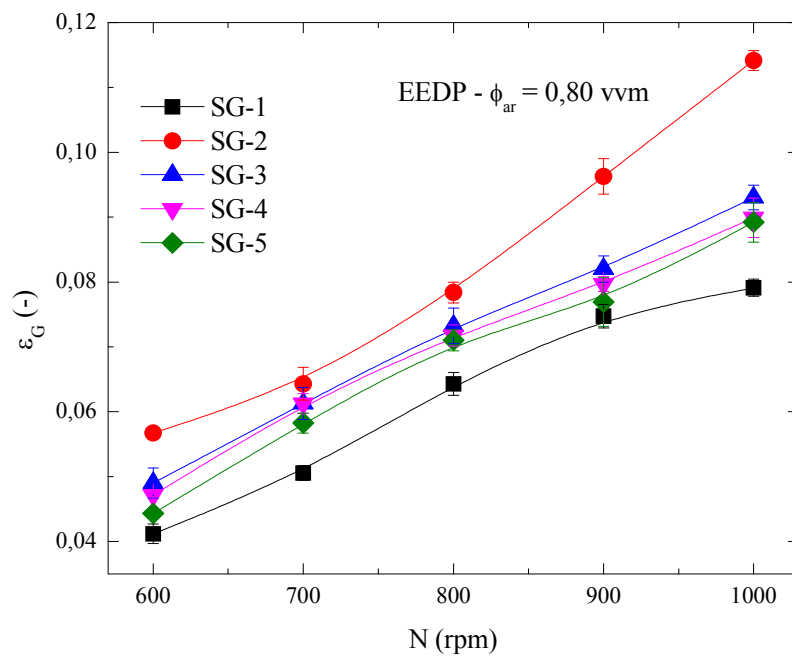


(c)

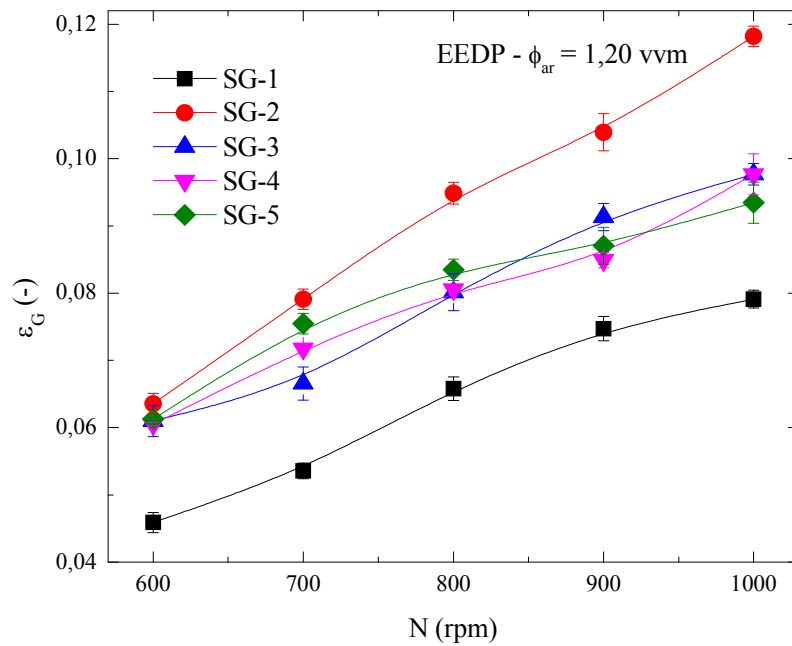
Figura 5.26. Variação de  $\varepsilon_G$  em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor EEDP operando com FN em diferentes níveis de aeração: a)  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm, b)  $\phi_{ar} = 0,80$  vvm e c)  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm.



(a)

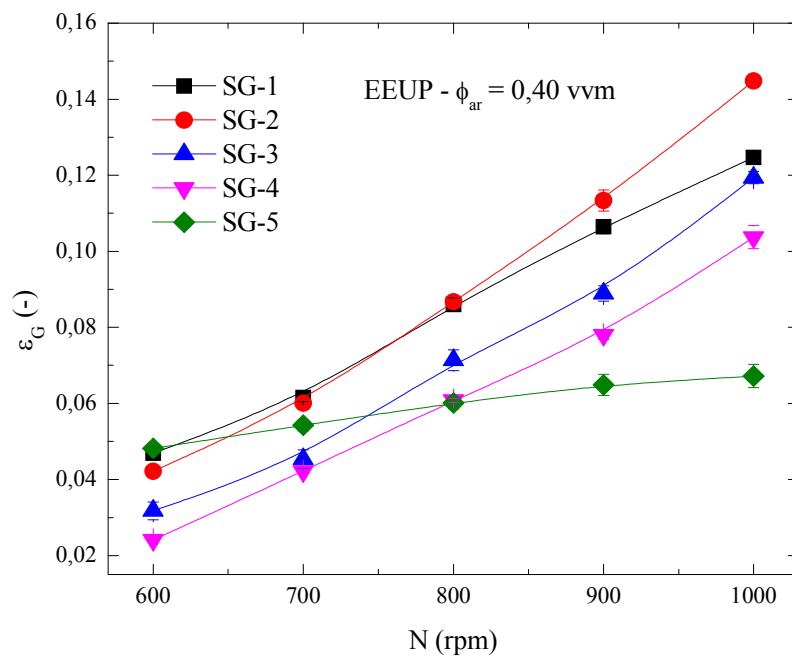


(b)

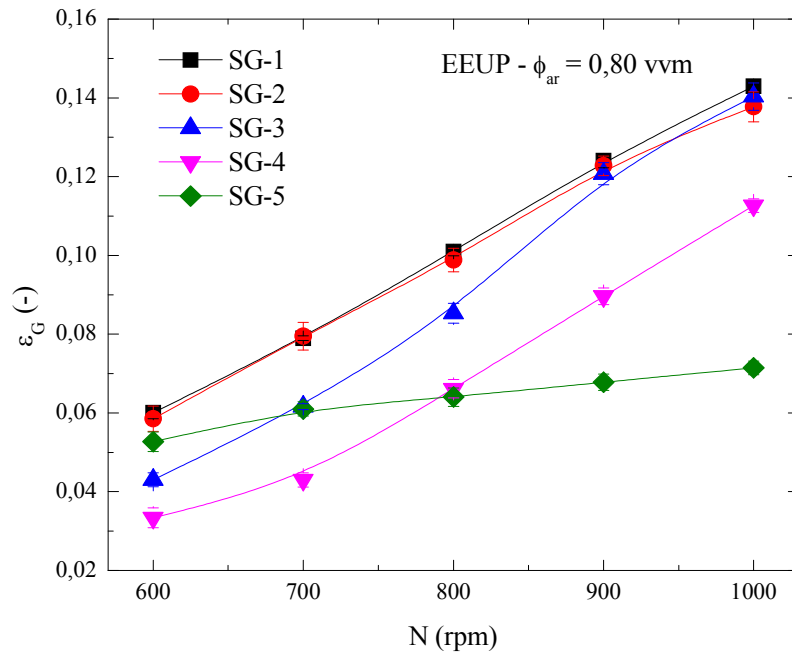


(c)

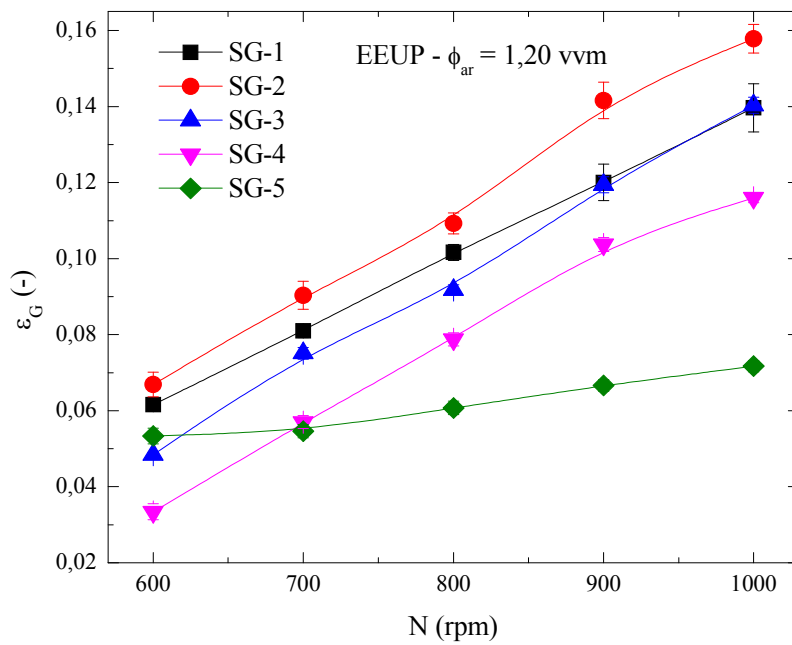
Figura 5.27. Variação de  $\varepsilon_G$  em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor EEUP operando com FN em diferentes níveis de aeração: a)  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm, b)  $\phi_{ar} = 0,80$  vvm e c)  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm.



(a)



(b)



(c)

Com base nos resultados obtidos, observa-se que  $\epsilon_G$  apresentou maiores valores nos sistemas Newtonianos (soluções de glicerol) em comparação aos valores obtidos com fluidos não-Newtonianos (soluções de goma xantana).

Quanto aos níveis de espuma, estes foram maiores nas soluções de glicerol, especialmente em altas concentrações (SG-2 a SG-5) em altos níveis de  $N$  e  $\phi_{ar}$ . Observou-se também que com aumentos na viscosidade dos fluidos, a retenção gasosa diminuiu mesmo com o aumento da velocidade de agitação, devido ao comportamento coalescente das bolhas nestes fluidos (SG-2 a SG-5). (NOCENTINI et al., 1993; CERRI, 2009).

Na Tabela 5.4, são apresentados a faixa dos valores de  $\epsilon_G$  obtidos para cada tipo de impelidor com aumentos sucessivos de  $\phi_{ar}$ .

**Tabela 5.4. Faixa de valores de  $\epsilon_G$  obtidos para cada tipo de impelidor operando com fluidos Newtonianos em diferentes condições de agitação e aeração.**

$\phi_{ar}$ vvm	Valores de $\epsilon_G$ para FN		
	TR	EEDP	EEUP
0,40	0,088 – 0,159	0,027 – 0,102	0,024 – 0,145
0,80	0,098 – 0,153	0,041 – 0,114	0,033 – 0,143
1,20	0,100 – 0,155	0,045 – 0,118	0,033 – 0,158

Dos resultados experimentais podemos concluir que os maiores valores de  $\epsilon_G$  foram obtidos utilizando a  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm em sistemas operando com fluidos Newtonianos, mostrando-se a seguinte ordem em função aos valores obtidos de  $\epsilon_G$ :

$$EEUP > EEDP > TR$$

Sendo que para essa baixa vazão de ar, os impelidores EE mostraram maiores dispersões gás-líquido ( $\epsilon_G$ ), comparado ao impelidor TR.

A retenção gasosa ( $\epsilon_G$ ) foi afetada negativamente no sistema equipado com o impelidor EEDP com os acréscimos da aeração ( $\phi_{ar}$ ), ver Figura 5.26 e Tabela 5.4, reduzindo desta forma a transferência de gás para a fase líquida. Os resultados obtidos são concordantes com o divulgado por Zhu et al. (2009), onde a maior retenção gasosa obtida para o impelidor EEUP (~6%) compara-se à obtida para o impelidor EEDP (~3%), trabalhando com água e baixas condições de agitação e aeração de 0,5 vvm.

Observa-se, nos sistemas utilizando o fluido com menor concentração de glicerol (SG-1), apesar de apresentar uma menor viscosidade, os níveis de  $\epsilon_G$  foram baixos, mas

verificando os valores obtidos de  $k_{LA}$  (seção 5.12), estes valores se mostraram elevados. Este comportamento pode ser observado em todos os sistemas sem exceção (Figura 5.25 à Figura 5.27), especialmente com maiores vazões de ar. Tal efeito obtido pode ser explicado devido ao comportamento não coalescente das bolhas presentes nas soluções com concentrações de glicerol menores que 50% m/v, que geram um aumento na área de contato gás-líquido, conforme relatado por Nocentini et al. (1993). Tal efeito foi constatado ao se observar uma grande quantidade de bolhas minúsculas dispersas em todo o vaso.

A partir dos ensaios utilizando fluidos não-Newtonianos, em todos eles observou-se uma diminuição nos valores de  $\epsilon_G$  com o aumento do índice de consistência (K), contrariamente ao observado nos fluidos Newtonianos, onde a retenção gasosa ( $\epsilon_G$ ) apresentou outro comportamento. Os dados experimentais de retenção gasosa para FNN são mostrados nas Figura 5.28 em função das condições de agitação para cada condição de aeração para cada impelidor, sendo os valores máximos e mínimos apresentados na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5. Valores máximos e mínimos de  $\epsilon_G$  obtidos para cada tipo de impelidor operando com fluidos não-Newtonianos.**

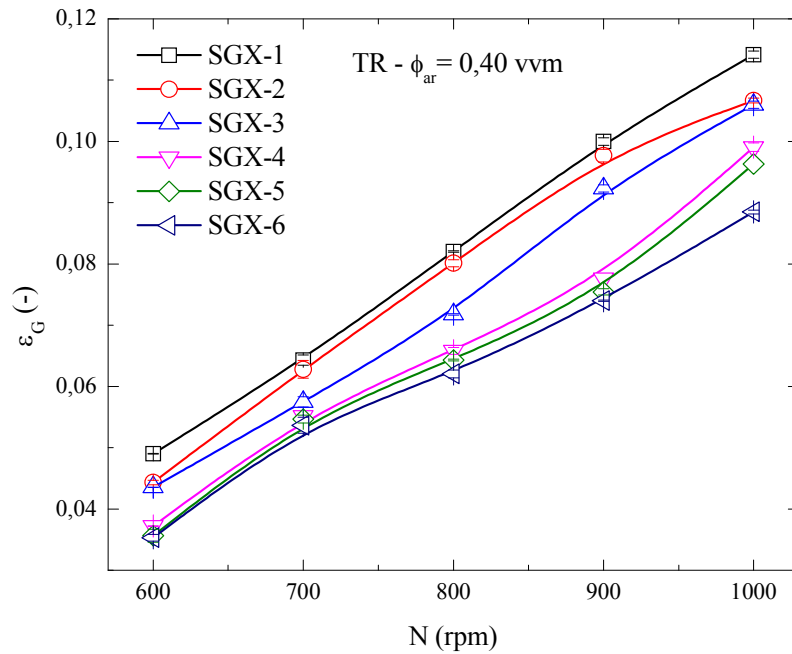
$\phi_{ar}$ vvm	Valores de $\epsilon_G$ para FNN		
	TR	EEDP	EEUP
0,40	0,035 - 0,114	0,011 - 0,062	0,014 - 0,063
0,80	0,037 - 0,115	0,0094 - 0,069	0,017 - 0,08
1,20	0,046 - 0,12	0,0153 - 0,063	0,017 - 0,082

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que o impelidor TR proporcionou quedas nos níveis de  $\epsilon_G$  entre 3,3 e 2,6 vezes conforme se aumentou  $\phi_{ar}$ , comportamento semelhante ao observado com FN. No caso do impelidor EEDP  $\epsilon_G$  apresentou quedas entre 7,3 e 4,8 vezes, sendo mais afetado pelas altas condições de aeração. Um comportamento diferente foi apresentado pelo sistema com o impelidor EEUP, onde as variações foram mínimas, com aumentos de  $\epsilon_G$  entre 4,5 e 4,8 vezes de acordo com  $\phi_{ar}$  imposta ao meio. A partir destes resultados, operando com FNN define-se a seguinte relação:

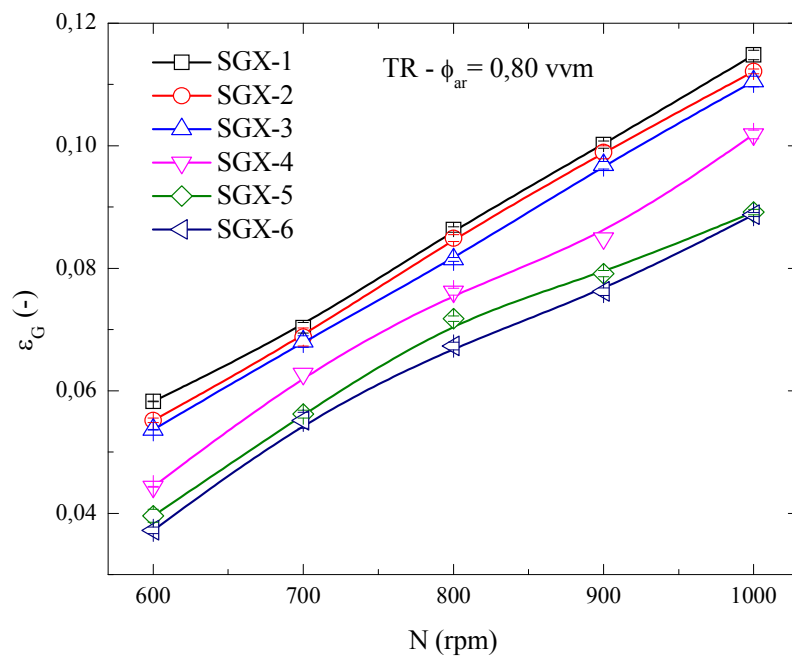
$$EEDP \geq EEUP > TR$$



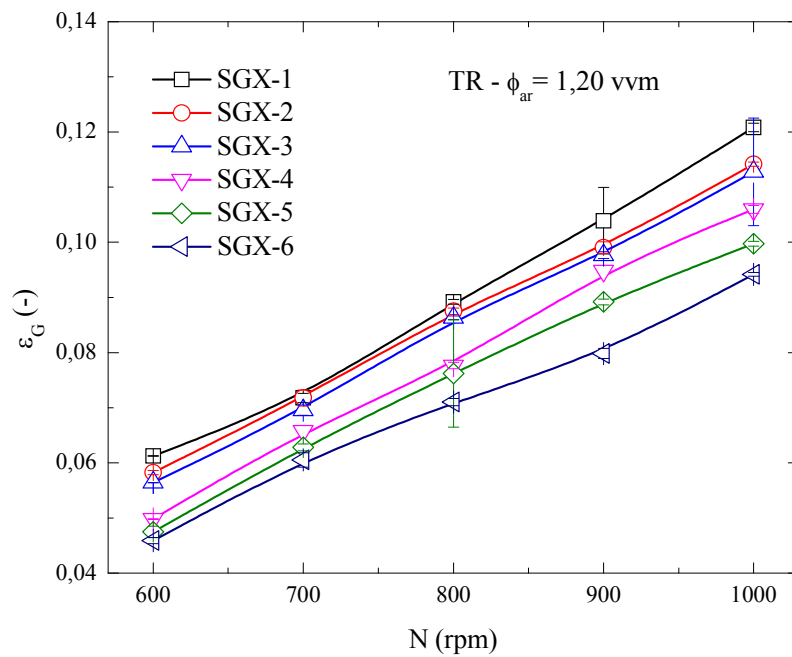
Figura 5.28. Variação de  $\varepsilon_G$  em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor TR operando com FNN em diferentes níveis de aeração: a)  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm, b)  $\phi_{ar} = 0,80$  vvm e c)  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm.



(a)

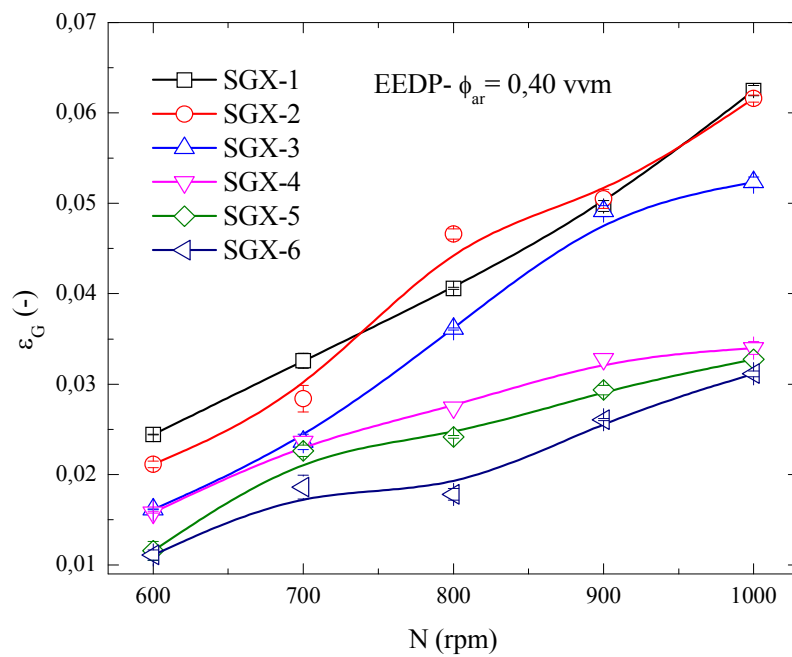


(b)

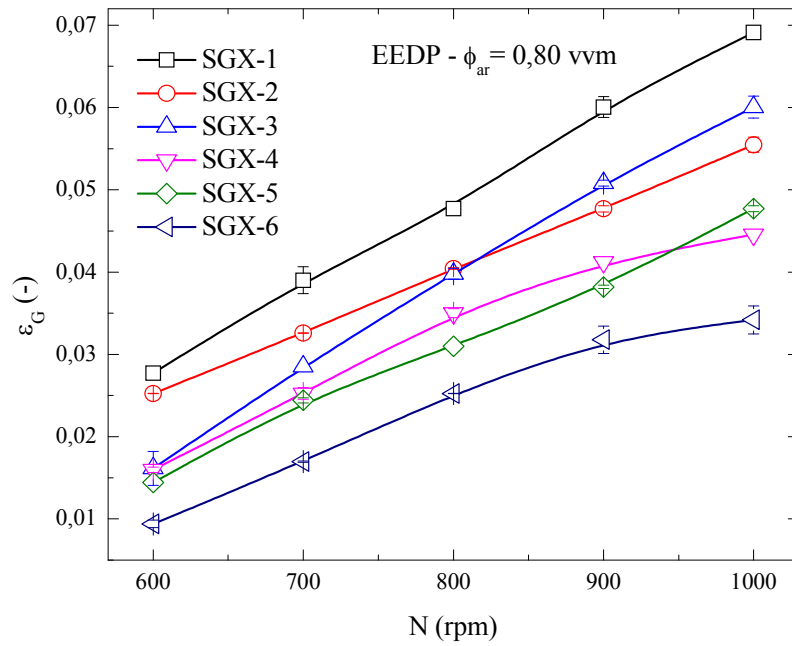


(c)

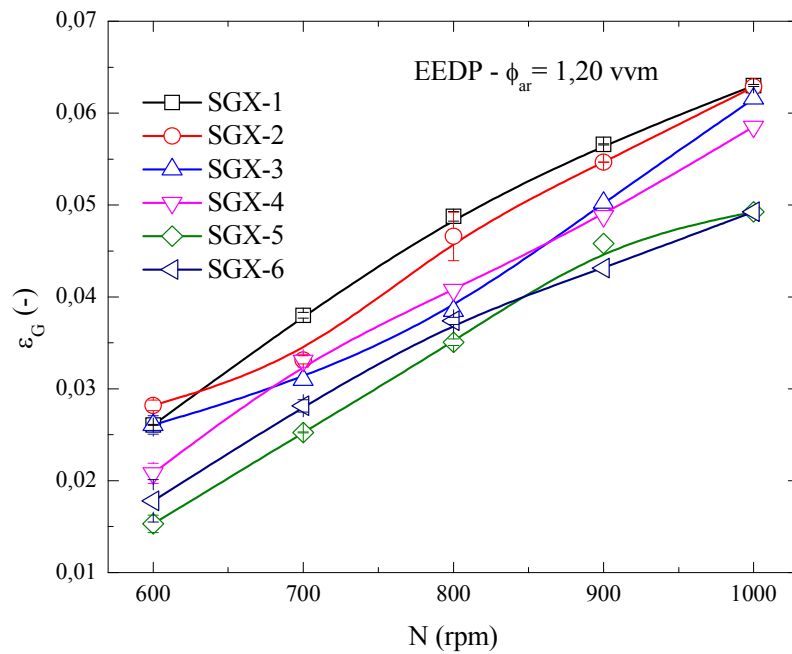
Figura 5.29. Variação de  $\varepsilon_G$  em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor EEDP operando com FNN em diferentes níveis de aeração: a)  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm, b)  $\phi_{ar} = 0,80$  vvm e c)  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm.



(a)

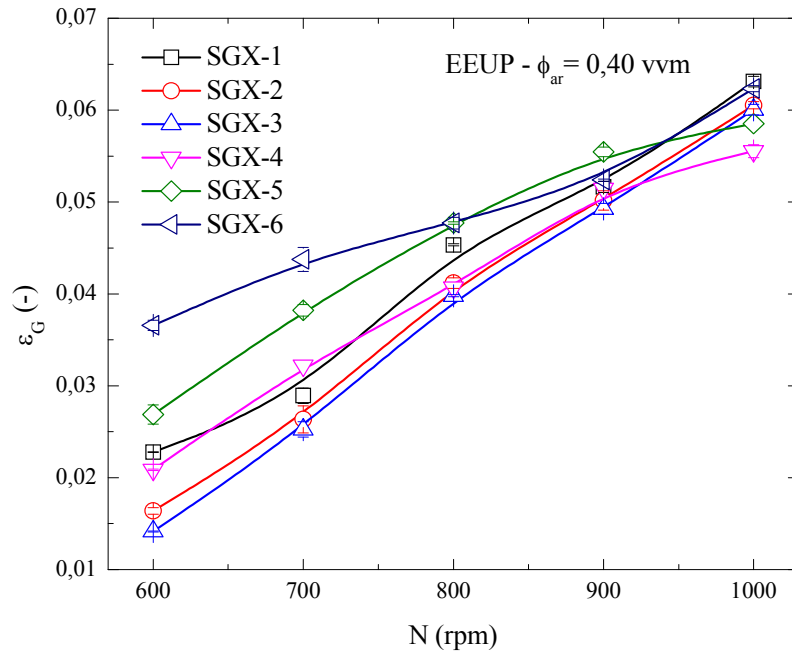


(b)

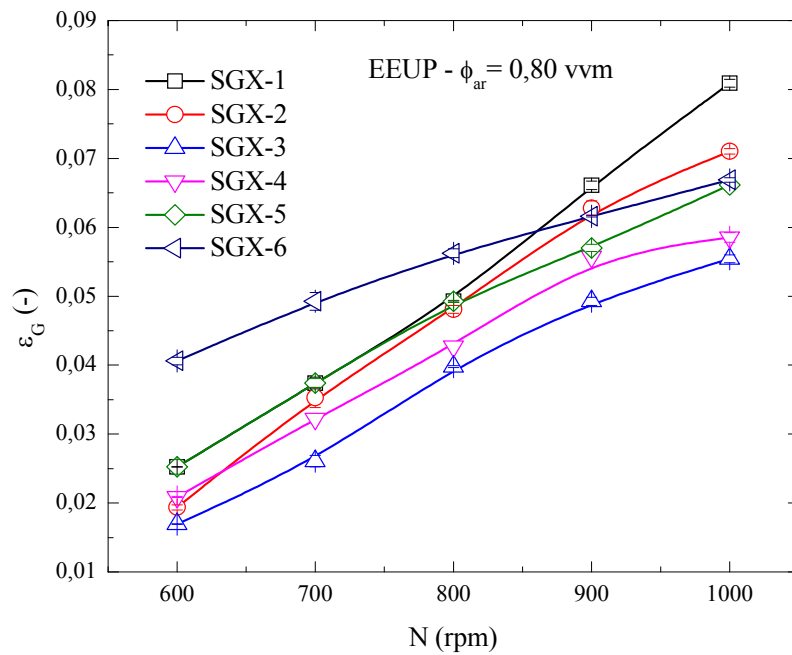


(c)

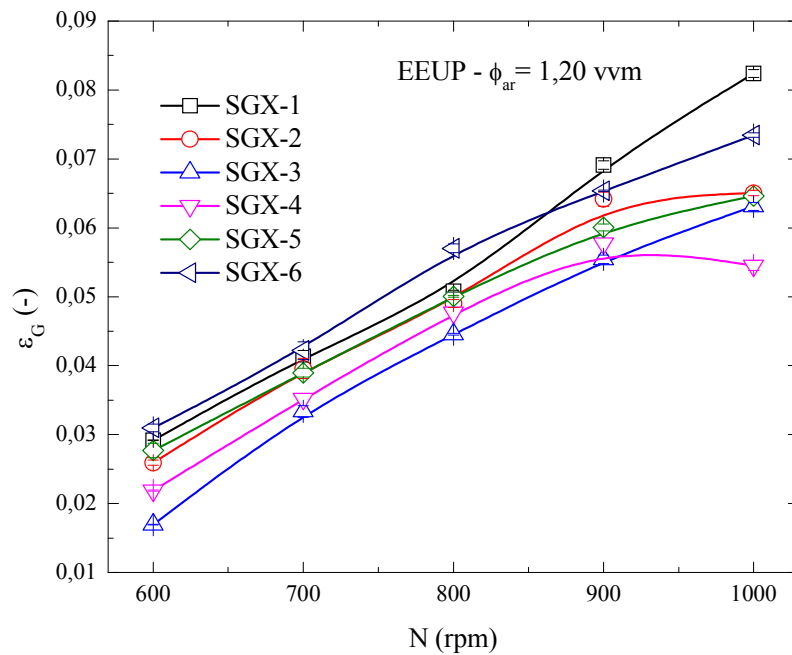
Figura 5.30. Variação de  $\varepsilon_G$  em função da frequência de rotação (N) no sistema com o impelidor EEUP operando com FNN em diferentes níveis de aeração: a)  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm, b)  $\phi_{ar} = 0,80$  vvm e c)  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm.



(a)



(b)



(c)

Devemos mencionar que na determinação de  $\varepsilon_G$  deve-se considerar que medidas das alturas de líquido de forma a calcular o volume (Equação (2.30)) são propensas a erro experimental significativo, conforme mencionado por Zhu et al., (2009).

### 5.1.8. Avaliação do diâmetro de bolha ( $D_B$ ) por análise de imagem

As imagens digitais do comportamento hidrodinâmico de um fluido Newtoniano ( $H_2O$ ) em cada sistema de impelidores TR, EEDP e EEUP são apresentadas nas imagens digitais expostas, sendo evidente uma diferenciada distribuição das bolhas em cada sistema. Os diâmetros médios das bolhas foram avaliados em mm (Figura 5.31 e 5.33), e estas são apresentadas na Figura 5.36.

Considerando-se cultivos de microrganismos filamentosos altamente aeróbios que necessitam de elevada transferência de  $O_2$  e, portanto, elevados valores de  $N$  (600 a 1000 rpm) com  $\phi_{ar} = 0,40$ ; 0,80 e 1,20 vvm, a partir das condições experimentais testadas, tem-se que conforme se aumenta a agitação no vaso as bolhas de ar são mais fragmentadas (ou cisalhadas) no médio líquido. Sendo assim, define-se duas regiões no vaso a fim de determinar a distribuição das bolhas, uma região próxima dos impelidores onde uma grande quantidade de bolhas de ar é fragmentada e outra região longe do impelidor com bolhas mais

dispersas. Uma grande concentração de bolhas de menor tamanho permanece próxima ao impelidor e, conforme se distancia dele, a maioria das bolhas são irregulares e de maior tamanho. Isto se deve à baixa fragmentação das bolhas adicionada à coalescência do sistema ar-água (BLAŽEJ et al., 2004). Assim, os valores do coeficiente de transferência de massa serão maiores nesta região (próxima ao impelidor), devido às pequenas bolhas formadas pela fragmentação, além de ser favorecida pela alta turbulência (KRESTA e BRODKEY, 2003).

Analisando o comportamento do sistema com o impelidor TR (Figuras 5.31, 5.32 e 5.33 - a', a'' e a'''), pode-se observar uma grande quantidade de bolhas de menor tamanho em comparação às apresentadas com os outros impelidores (Figuras 5.31, 5.32 e 5.33 - b', b'' e b''' e c', c'' e c'''). As Figura 5.31, 5.32 e 5.33 (a') verifica-se que a distribuição das bolhas é quase uniforme em todo o sistema, com maior predominância nas regiões próximas aos impelidores quando operado no impelidor TR com  $N = 600$  rpm. A partir da análise das imagens foram obtidos valores do diâmetro médio de bolha ( $D_{BM}$ ) de 1,85 a 1,66 mm para o impelidor TR com aumentos na aeração em 600 rpm. Para maiores valores de  $N$  foi difícil de avaliar as fotografias pela complexidade do sistema, pois com aumentos na velocidade de agitação com o impelidor a distribuição de bolhas dentro do sistema tornou-se altamente caótica, formando uma espécie de nuvem, onde pequenas bolhas de ar não puderam ser mais distinguidas. Esta dificuldade torna-se mais visível quando o sistema é operado nas mais altas velocidades da agitação (800 e 1000 rpm).

Com incrementos na aeração foram observados o mesmo comportamento, mas com maior intensidade. No entanto, pode-se visualizar uma diminuição no tamanho das bolhas.

Com base nos dados obtidos, observa-se para o impelidor TR que com o aumento de  $N$  são obtidos valores elevados de  $k_L a$  provocado pelo aumento da área superficial das bolhas de gás em contato com o líquido. Isto foi corroborado pelas imagens digitais das Figuras 5.31, 5.32 e 5.33 (a'), (a'') e (a'''), as quais mostram uma grande quantidade de bolhas dispersas no meio provocando aumento nos valores de  $\dot{\gamma}_m$  devido à colisão entre bolhas, bolhas e o impelidor, bolhas e a parede do vaso.

Dando continuidade à análise das imagens digitais, para o sistema operado com o impelidor EEDP agitado a 600 rpm (Figuras 5.31, 5.32 e 5.33 b') observa-se uma menor quantidade de bolhas sendo estas de maiores dimensões, comparadas às bolhas geradas pelos impelidores TR e EEUP, situando-se estas bolhas em torno do impelidor e nas regiões próximas à parede e à base do tanque, enquanto outra pequena fração de bolhas ascende para a superfície do líquido.

Figura 5.31. Imagens digitais do comportamento hidrodinâmico de H<sub>2</sub>O agitada com três impelidores com  $\phi_{ar} = 0,40$  vvm em diferentes condições típicas de agitação empregadas em cultivos de microrganismos filamentosos altamente aeróbios.

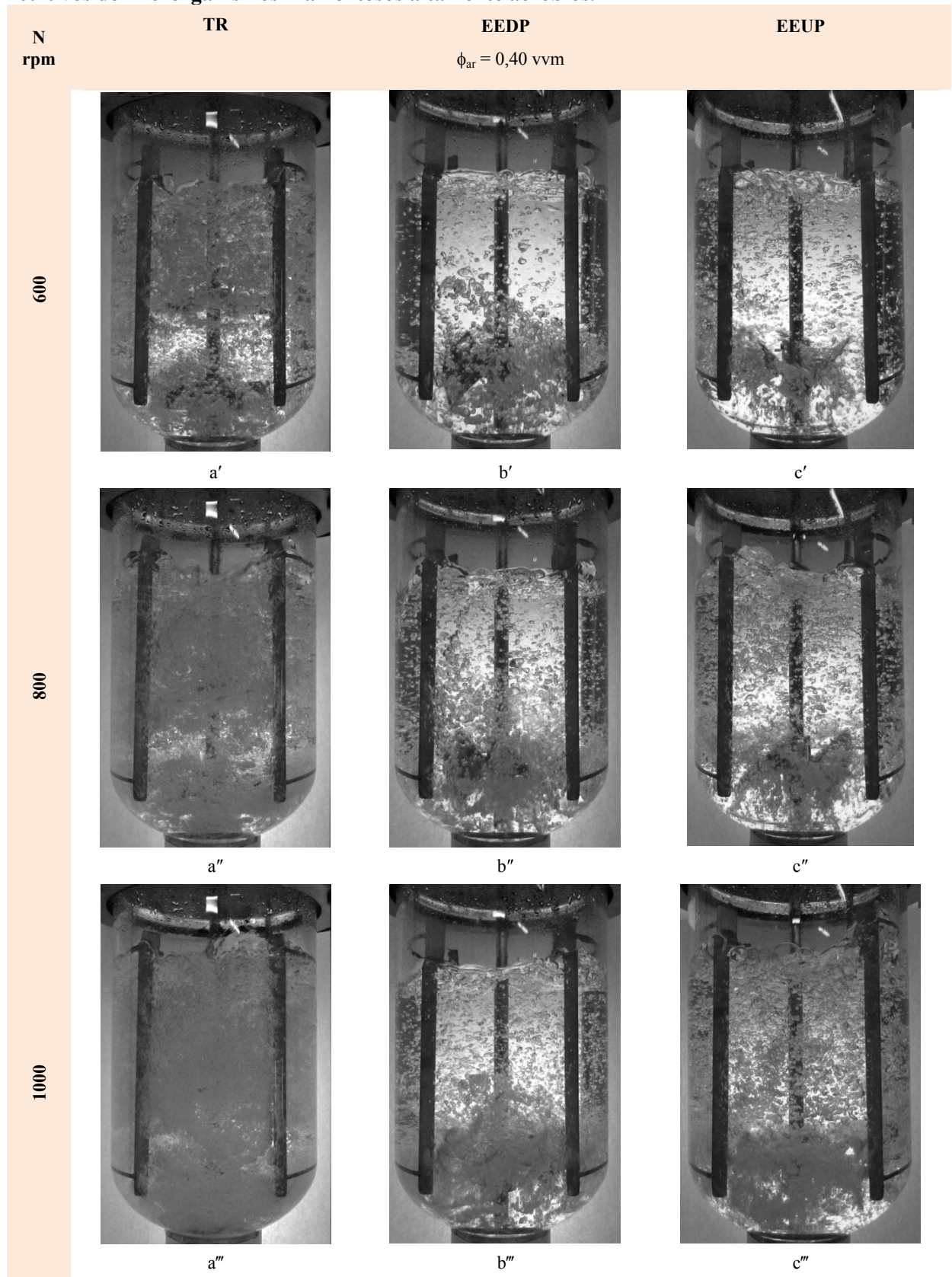


Figura 5.32. Imagens digitais do comportamento hidrodinâmico de H<sub>2</sub>O agitada com três impelidores com  $\phi_{ar} = 0,80$  vvm em diferentes condições típicas de agitação empregadas em cultivos de microrganismos filamentosos altamente aeróbios.

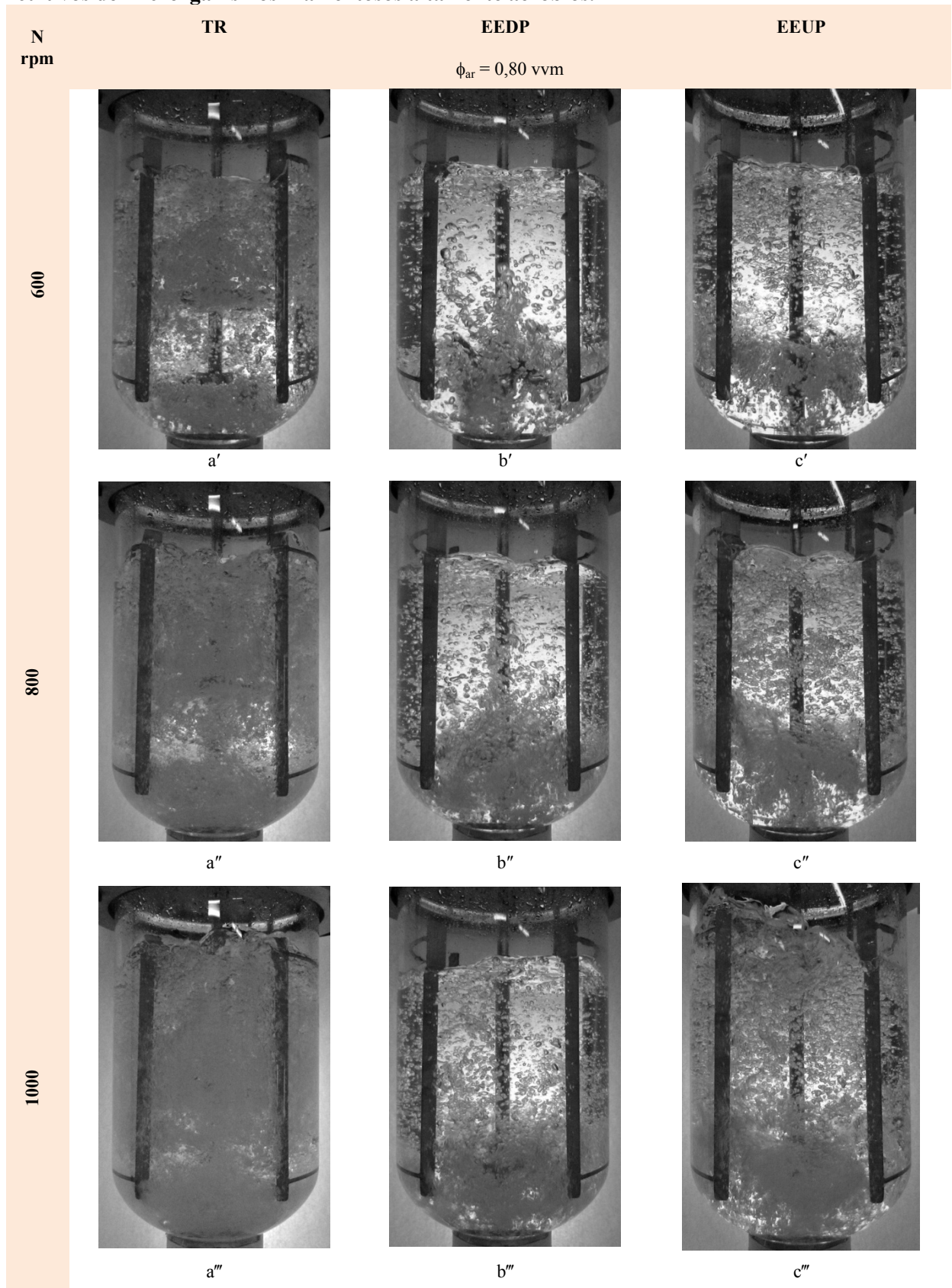
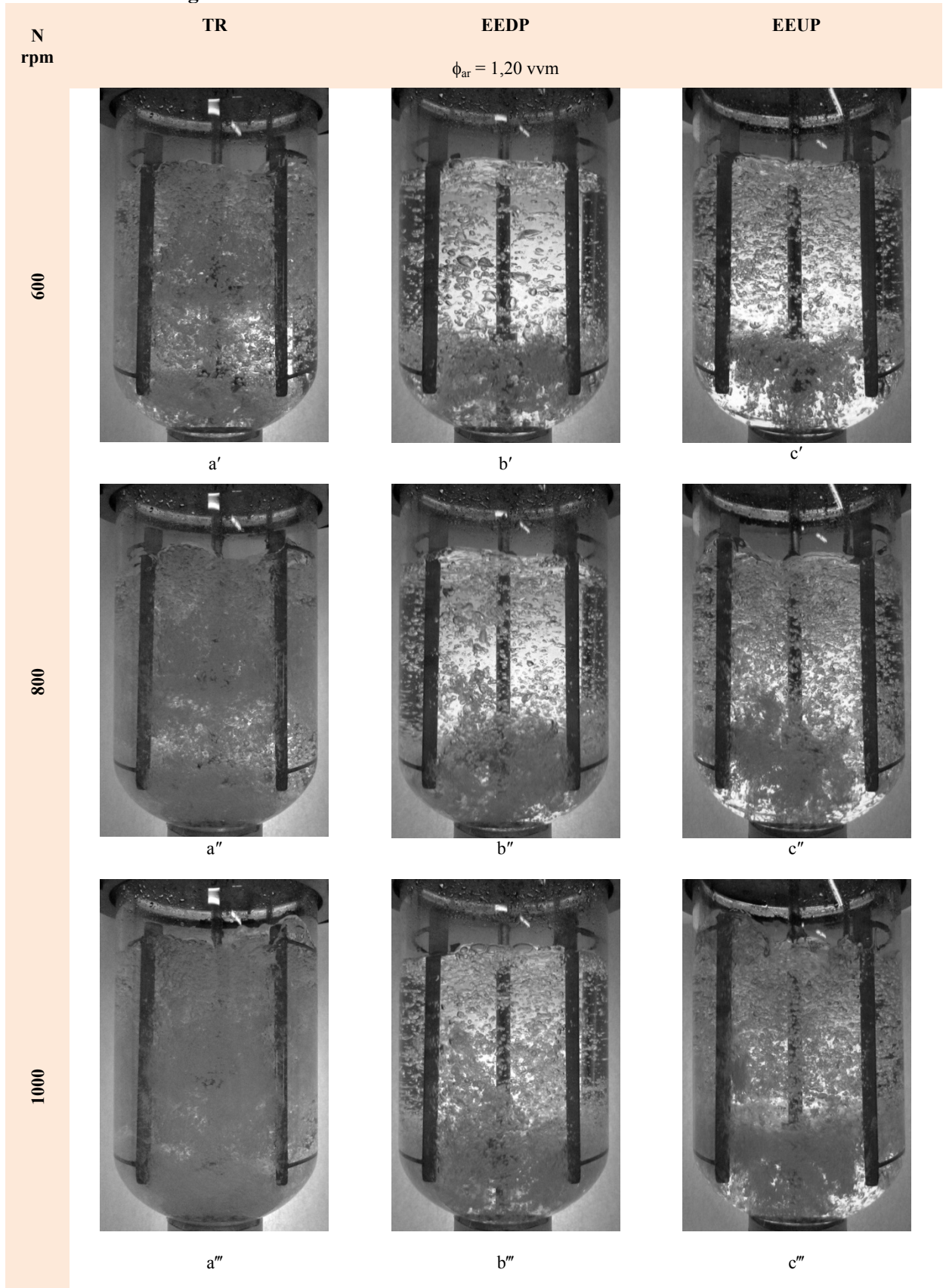




Figura 5.33. Imagens digitais do comportamento hidrodinâmico de H<sub>2</sub>O agitada com três impelidores com  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm em diferentes condições típicas de agitação empregadas em cultivos de microrganismos filamentosos altamente aeróbios.



Valores de  $DB_M$  obtidos no sistema com o impelidor EEDP foram entre 2,82 e 1,91 mm quando  $N$  variou de 600 para 1000 rpm, com aumentos na vazão de alimentação de ar (Figura 5.36 (a)-(c)).

Uma explicação a este comportamento, observada nas imagens digitais nas Figura 5.31, Figura 5.32 e Figura 5.33 (b'), (b''), (b'''), é devido ao tipo de escoamento gerado, no caso axial descendente (*down-pumping*). Neste tipo de escoamento as bolhas são empurradas para a base do reator não atingindo a fragmentação desejada, pois para um  $N$  fixo, as bolhas nesse sistema (EEDP) mostram-se maiores em comparação às outros dois sistemas (RT e EEUP). Operando com o impelidor EEDP quando a agitação foi aumentada, um número maior de bolhas ascende para a região superior, sendo então dispersadas, mas esta distribuição não é uniforme no vaso, concentrando-se em sua maioria entre o impelidor e a base do vaso. Podemos concluir, portanto, que o impelidor EEDP não é eficiente na fragmentação das bolhas e com o aumento de  $N$  não se mostrou muito eficiente em comparação aos impelidores TR e EEUP. Nesse caso, mesmo os aumentos nos níveis de aeração não foram bem aproveitados.

Para o impelidor EEUP (Figura 5.31, Figura 5.32 e Figura 5.33 (c'), (c'') e (c''')), pode-se observar uma melhor distribuição das bolhas no sistema, onde as dimensões das bolhas mostram-se mais uniformes (mais esféricas) e apresentaram uma melhor distribuição das bolhas em todo o sistema mesmo com a mudança dos parâmetros ( $N$ ,  $\phi_{ar}$ ). Os tamanhos de  $DB_M$  ficaram na faixa de 2,54 a 2,02 mm. Conseqüentemente, com aumentos dos níveis de agitação num valor fixo de alimentação de ar, tem-se um aumento da concentração de bolhas em torno desse impelidor o que explica o comportamento de  $\dot{\gamma}_m$  apresentado na secção 5.1.3. Esta característica também foi relatada por Venkat et al. (1996) mediante estudos utilizando a técnica 3-D PTV (*velocimetry tracking velocimetry*) utilizada para caracterizar os campos de escoamento na região do impelidor utilizando microcarregadores, observando-se a formação de um vórtice entre a seção anterior da pá e o eixo do impelidor originando regiões estagnadas. Este comportamento pode ter gerado menor transferência de quantidade de movimento ao líquido à medida que se aumentou  $N$ .

A partir dos resultados obtidos nesta etapa do trabalho podem-se classificar estes impelidores em função do tamanho de bolha gerado em regime turbulento:

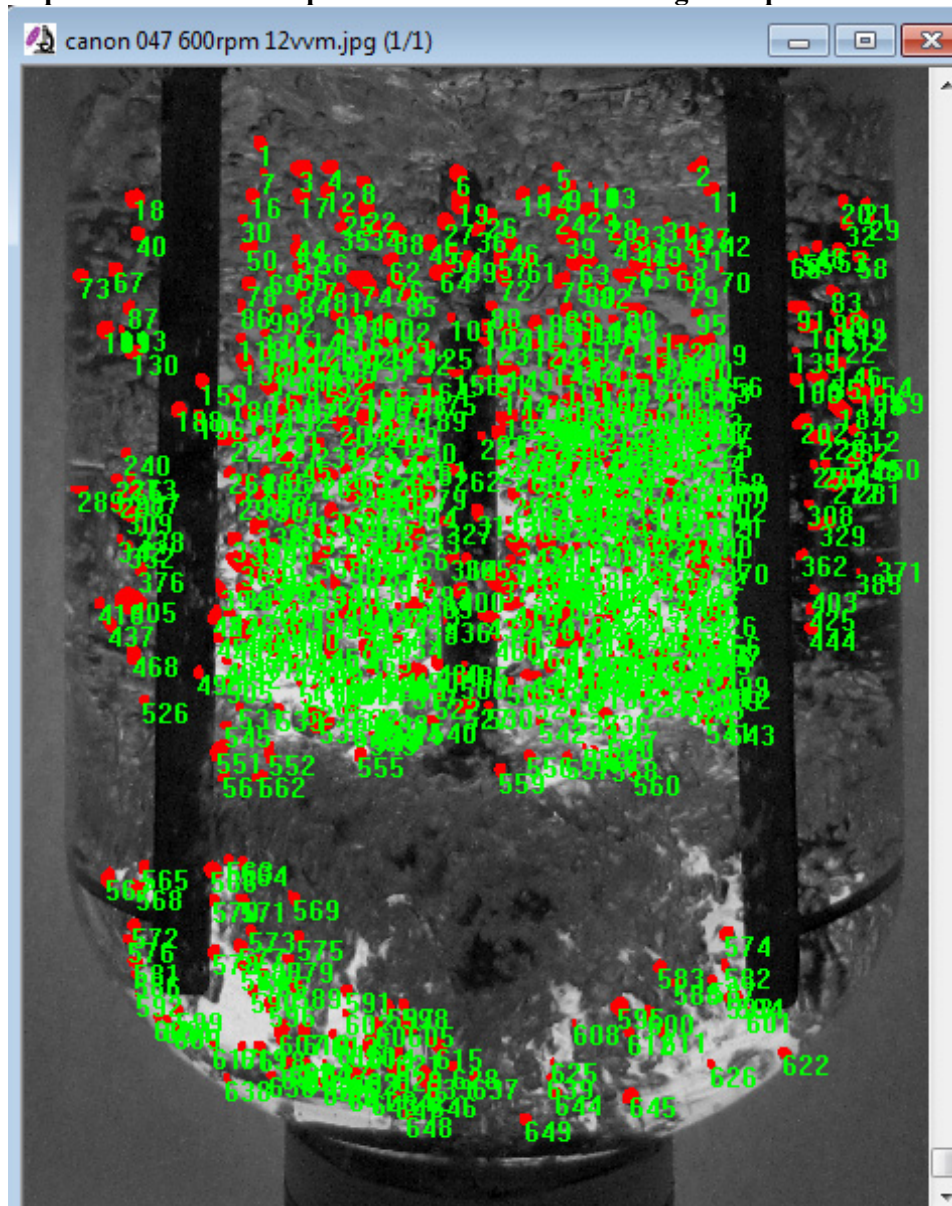
$$TR < EEUP < EEDP$$

Sendo que o impelidor TR gera bolhas de menor tamanho, isto está de acordo com sua resposta altamente cisalhante e influenciada por altos valores de  $N_p$ , provocando altos níveis

de dissipação de energia ao meio. Por outro lado, o impelidor EEUP se mostra menos cisalhante mantendo uma excelente dispersão das bolhas em todo o sistema sem variações drásticas no tamanho e, finalmente, o impelidor EEDP se apresenta como um impelidor menos cisalhante por mostrar um tamanho maior de bolhas sendo afetado negativamente pela aeração.

Dando continuidade à análise, para fins ilustrativos na Figura 5.34 é mostrada uma imagem padrão na qual foi efetuado o tratamento das imagens no Image Pro-plus para contagem das bolhas. Posteriormente avaliadas conforme apresentada na Figura 5.35.

Figura 5.34. Ilustração do tratamento de imagem visando a contagem das bolhas no sistema agitado com o impelidor EEUP a 600rpm utilizando o software Image Pro-plus.



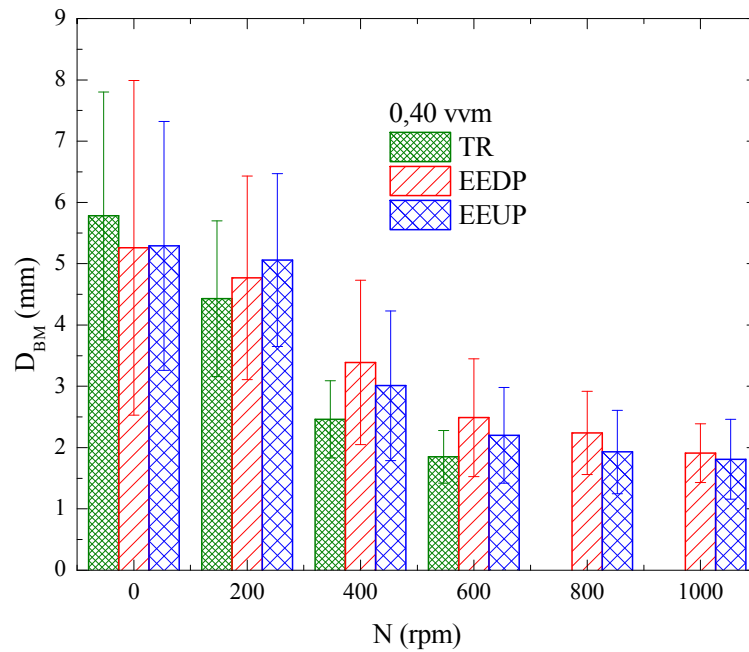
Na Figura 5.36 (a)-(c) são apresentados os diâmetros médios das bolhas obtidos mediante análise das imagens digitais obtidas para cada sistema de impelidores e diferentes níveis de ar. As barras representam o diâmetro de bolha acompanhado de seus desvios padrão de cada população de dados tratados.

Ademais dos parâmetros estudados nos impelidores, realizamos caracterizações pelo seu padrão de escoamento, ou seja, radial e axial. Com ajuda das imagens digitais e vídeo (ver seção 3.1.1.12 e 4.1.6, foi obtido o padrão de escoamento para cada sistema de impelidores no biorreator Bioflo IIC tipo tanque agitado aerado, ver Figura 5.37. Esse sistema foi uma adaptação dos estudos realizados por Venkat e Chalmers (1996), Kresta and Brodkey (2003), Zhu et al. (2009). Mediante as observações é evidente o alto poder do escoamento radial gerado pelo impelidor TR, assim como o escoamento gerado pelos impelidores EE em meio Newtoniano variando a agitação e diferentes níveis de ar.

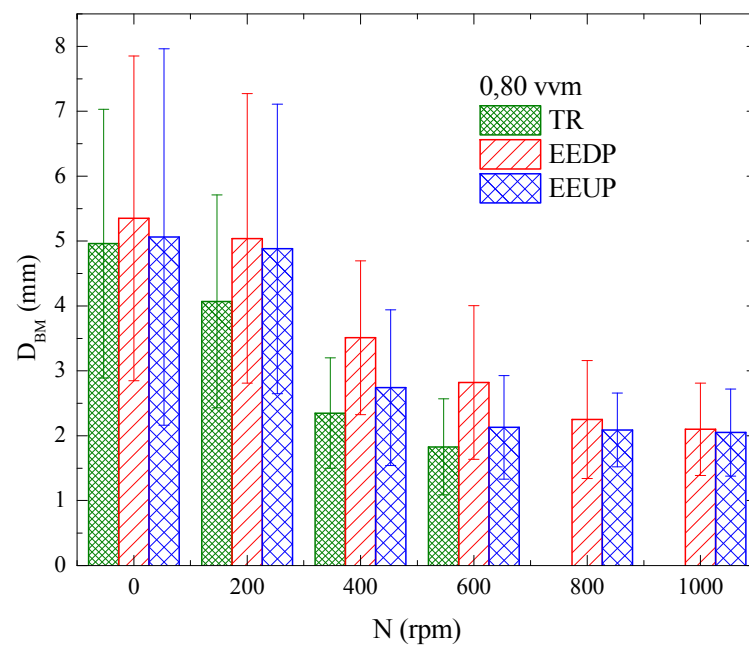
**Figura 5.35. Dados obtidos a partir do tratamento no Image Pro-plus para posterior avaliação.**

Obj#	Area	Aspect	Area/Box	Box X/Y	Center-X	Center-Y	Density (n	Angle	Hole Area	Hole Ratio	Axis (maj)	Axis (min)	Diameter	Diameter	Diameter	Radius (m	Radius (m	Holes	Perim
1	5.348892	1.20525	0.813095	0.933333	41.58281	98.25704	105.5139	156.5048	0	1	2.868321	2.379855	2.88935	2.169496	2.520609	1.460118	1.078549	0	8.223
2	6.077218	1.861033	0.686119	1.344828	118.5353	102.1315	90.97552	60.56718	0	1	3.811768	2.048201	3.722078	1.822235	2.674499	1.974056	0.791042	0	9.370
3	9.405591	1.422355	0.798537	1.46875	48.88913	102.7097	106.5096	92.63551	0	1	4.1369	2.908486	4.061166	2.74479	3.355976	2.168206	1.361681	0	11.19
4	5.317565	1.44491	0.832108	1.416667	53.75135	102.4706	103.299	76.17524	0	1	3.134131	2.169084	3.078323	2.035398	2.501467	1.592269	0.966766	0	8.380
5	2.506069	1.148052	0.808081	1.222222	93.8349	102.531	111.5031	84.58741	0	1	1.918968	1.6715	1.891819	1.504425	1.697229	1.05398	0.743954	0	5.56
6	7.549533	1.220055	0.789517	1.121212	76.29485	103.6116	84.93776	116.5768	0	1	3.431456	2.812543	3.561878	2.756179	3.071135	1.857242	1.255931	0	9.909
7	1.754248	1.184745	0.875	1	42.11678	103.2925	99.16071	142.2822	0	1	1.63372	1.378964	1.699944	1.276301	1.434546	0.874844	0.579308	0	4.621
8	4.322969	1.293867	0.865204	1.318182	59.68257	105.005	94.16123	96.88582	0	1	2.672876	2.065805	2.602733	1.858407	2.249645	1.349456	0.924957	0	7.430
9	4.847678	1.137678	0.849108	1	95.88031	105.8962	104.5784	38.32805	0	1	2.655453	2.3341	2.70889	2.131256	2.393349	1.399912	1.029541	0	7.847
10	0.626517	1.307936	0.808081	0.818182	99.625	105.6538	104.8125	162.5816	0	1	1.024086	0.782979	0.923921	0.644258	0.79356	0.496825	0.295708	0	2.711
11	4.777194	1.343716	0.756824	1.192308	120.8536	106.339	102.1148	59.30915	0	1	2.86163	1.229639	2.777408	2.002426	2.396244	1.437558	0.955597	0	7.695
12	4.761531	1.01841	0.804233	0.964286	53.28292	106.5366	101.4457	173.2791	0	1	2.486238	2.441294	2.535672	2.300885	2.381797	1.304869	1.111755	0	7.575
13	0.563866	1.454764	0.818182	0.727273	102.3304	105.767	112.1806	174.3803	0	1	1.023212	0.703353	0.923921	0.691173	0.863551	0.480423	0.25758	0	2.530
14	2.72535	1.202735	0.832536	1.157895	91.41771	106.51	96.02586	96.69701	0	1	2.047356	1.70225	1.988691	1.59292	1.776901	1.101417	0.746619	0	5.89
15	4.456104	1.250625	0.784828	1.16	87.63908	107.0484	105.9701	62.79916	0	1	2.674145	2.138247	2.675436	2.01801	2.295377	1.482713	0.94644	0	7.435
16	5.106116	1.068338	0.775268	1	40.22056	107.5366	108.4755	144.1669	0	1	2.639493	2.470654	2.614741	2.56593	2.464995	1.393696	1.089274	0	7.933
17	7.056151	1.142924	0.858095	1.166667	48.84995	107.5253	105.6937	107.2456	0	1	3.21551	2.813407	3.206667	2.580067	2.925717	1.704068	1.242082	0	9.456
18	8.86522	1.22711	0.792717	1.235294	19.5927	107.9741	89.02385	90.53268	0	1	3.725809	3.036248	3.806339	2.881207	3.30168	1.922544	1.40683	0	10.65
19	11.33996	1.203059	0.866029	0.863636	76.71417	108.6728	85.71339	160.279	0	1	4.175408	3.47066	4.237635	3.285082	3.706059	2.145987	1.581432	0	12.09
20	3.336205	1.05038	0.841897	0.956522	143.9137	108.4449	90.50704	1.883917	0	1	2.116282	2.014777	2.140422	1.824383	1.960044	1.118416	0.875487	0	6.349
21	2.044013	1.28253	0.80805	1.117647	147.9982	108.618	78.15709	60.49841	0	1	1.829574	1.426535	1.756587	1.257758	1.555879	0.893193	0.602849	0	4.948

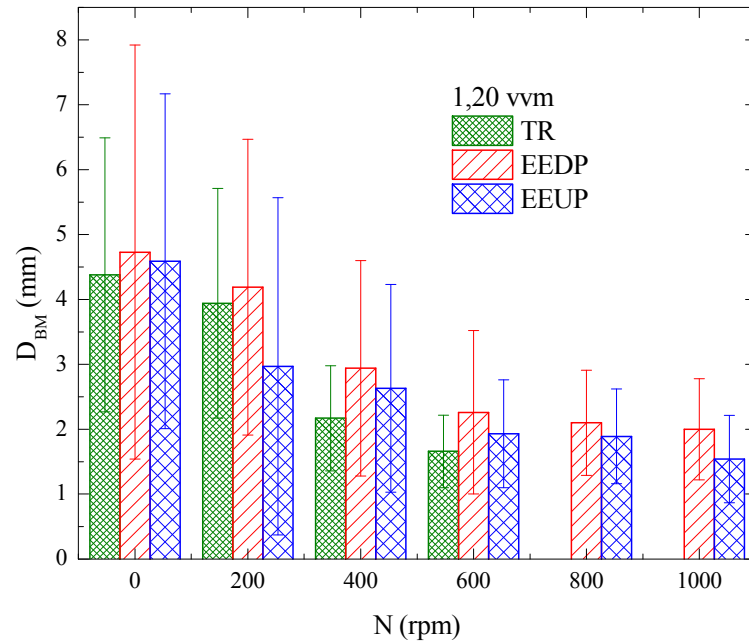
Figura 5.36. Diâmetro de bolha média ( $D_{BM}$ ) em mm para os três sistemas de impelidores (TR, EEDP, EEUP) e diferentes condições de agitação e aeração. A)  $\phi_{ar} = 0,40$ ; B)  $\phi_{ar} = 0,80$ ; C)  $\phi_{ar} = 1,20$  vvm.



(a)



(b)

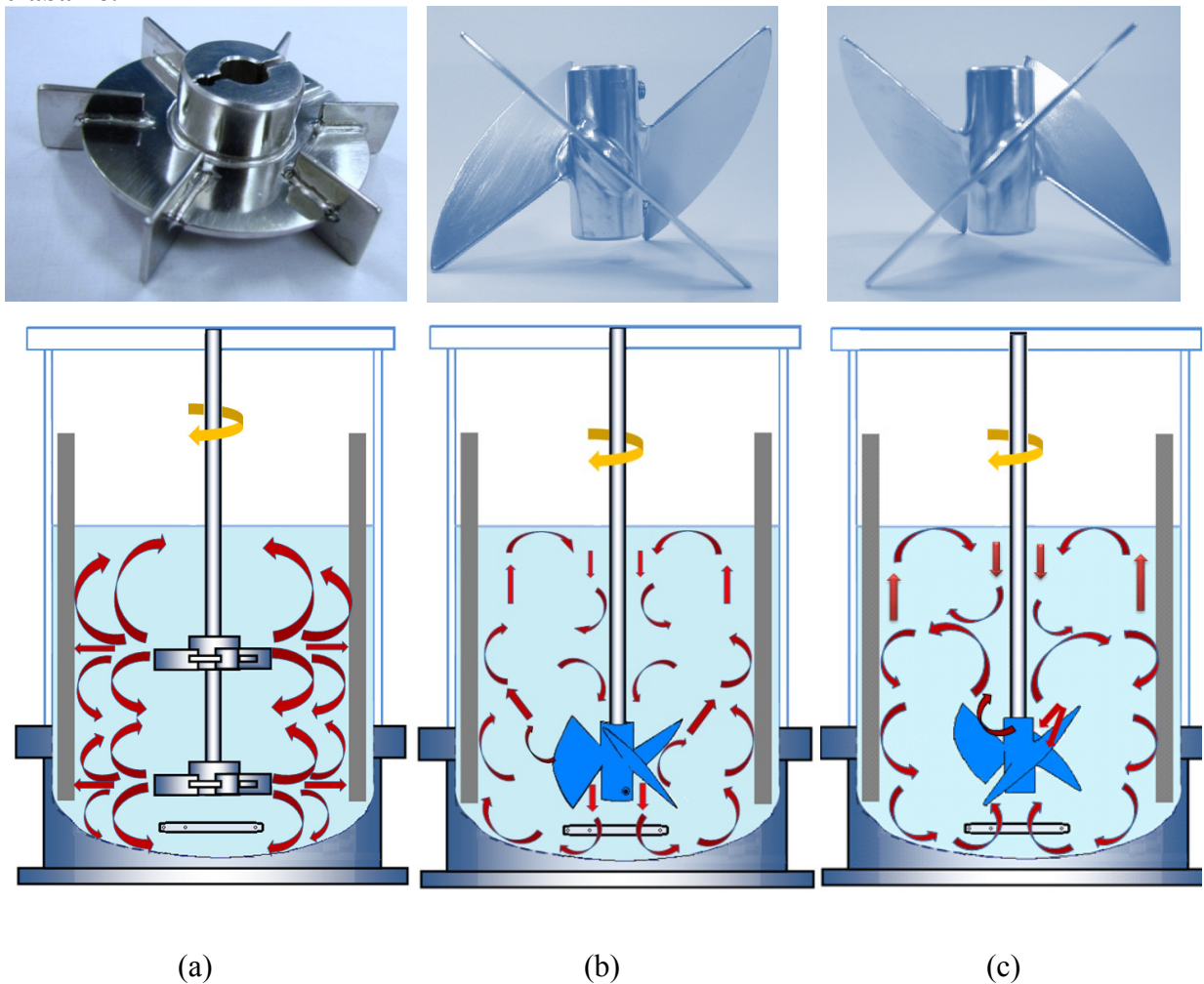


(c)

A Figura 5.37 apresenta o comportamento para cada tipo de impelidor estudado aqui, sendo estes:

- a) Duas turbinas de Rushton gerando um escoamento radial unidirecional
- b) Elephant Ear no modo *down-pumping*
- c) Elephant Ear no modo *up-pumping*. Sendo que B e C geram um padrão de escoamento axial e radial.

Figura 5.37. Padrão de escoamento para os três sistemas de impelidores utilizados neste trabalho.



Fonte: Arquivo próprio

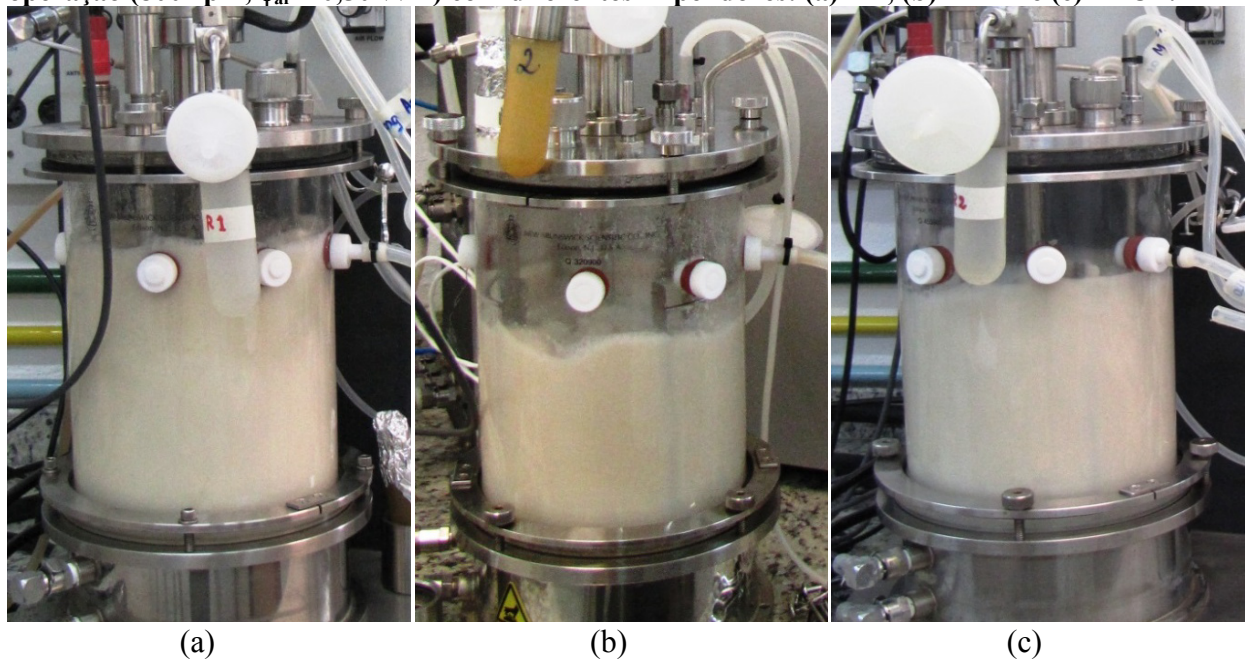
## 5.2. Avaliação das condições de cisalhamento em cultivos de *Streptomyces clavuligerus* com diferentes impelidores

Com o objetivo de avaliar a influência da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) *in vivo*, foram realizados cultivos submersos utilizando a bactéria filamentosa *S. clavuligerus*, nos quais foram monitoradas as alterações morfológicas, bem como a  $\dot{\gamma}_m$  de forma a avaliar o seu efeito na produção de ácido clavulânico, composto de alto valor na indústria farmacêutica.

Foram realizados três cultivos em duplicata em biorreatores tipo tanque agitado e aerado equipados com três impelidores estudados, TR, EEDP e EEUP, já que estes apresentam diferenças nos padrões de escoamento e de cisalhamento. Para fins comparativos

foram definidas mesmas condições de operação típicas utilizadas em cultivos, ou seja, composição de meio de cultura,  $\text{pH} = 6,8$ , temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vazão específica de alimentação de ar  $\phi_{\text{ar}} = 0,50\text{ vvm}$ ; frequência de rotação do eixo  $N = 800\text{ rpm}$ ;  $V = 4\text{ L}$ . Os sistemas em operação nas primeiras horas de cultivo estão ilustrados na Figura 5.38, mostrando-se todos os sistemas em condição turbulenta de agitação. Porém, pode ser ressaltada a extrema turbulência gerada no sistema equipado com TR na Figura 5.38 (a). Sendo que no transcurso dos cultivos foram gerados altos níveis de espuma como apresentado na Figura 5.39.

**Figura 5.38. Biorreatores tipo tanque agitado durante cultivos sob as mesmas condições de em operação ( $800\text{ rpm}$ ,  $\phi_{\text{ar}} = 0,50\text{ vvm}$ ) com diferentes impelidores: (a) TR, (b) EEDP e (c) EEUP.**



**Fonte: Arquivo próprio.**

Na Figura 5.38 (b) é apresentado o sistema equipado com o impelidor EEDP, no qual podemos observar nitidamente que o nível de caldo de cultivo sob operação foi mais baixo em comparação aos outros sistemas. Na Figura 5.38 (c), observa-se que o sistema com o impelidor EEUP transpareceu como menos turbulento e mais estável em relação aos demais sistemas.



**Figura 5.39.** Imagem do caldo de cultivo com o impelidor TR em 10 horas de cultivo, com destaque para a grande formação de espuma.



Fonte: Arquivo próprio.

### **5.2.1. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) e velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) em biorreator nos cultivos com diferentes impelidores**

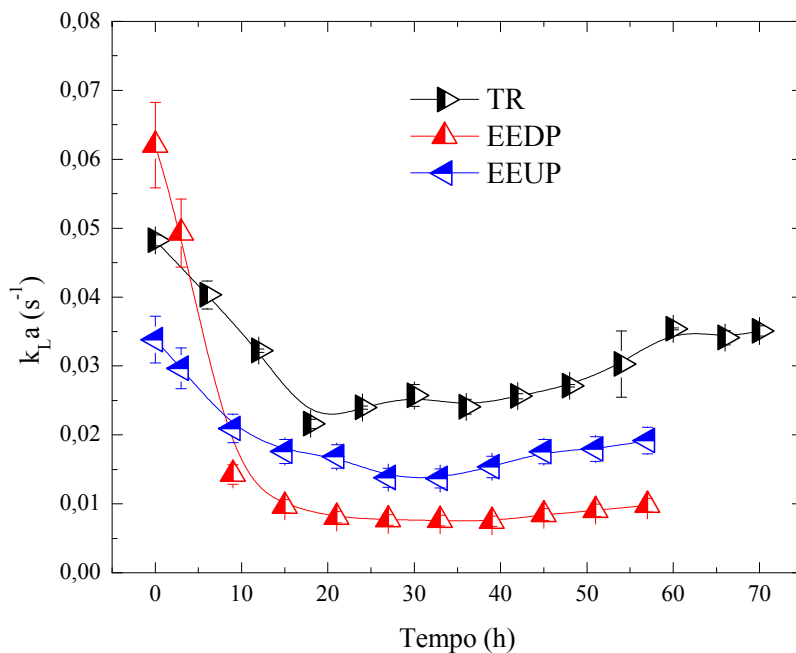
Valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) ao longo dos cultivos realizados com os impelidores TR, EEDP e EEUP foram obtidos pelas Equações 5.4, 5.5 e 5.6 e os valores da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) pelas Equações 5.7, 5.8 e 5.9, considerando os parâmetros reológicos ( $K$  e  $n$ ) obtidos a partir das amostras dos caldos de cultivo e as condições de operação previamente estabelecidas,  $N = 800$  rpm e  $\phi_{ar} = 0,50$  vvm.

Na Figura 5.40 podem ser observados os perfis de  $k_{La}$  ao longo dos cultivos, sendo evidente a maior transferência de oxigênio no sistema operado com o impelidor TR, seguido do impelidor EEUP e uma menor transferência obtida com o impelidor EEDP. Nas primeiras horas de cultivo observa-se altos valores de  $k_{La}$  operando com o impelidor EEDP, seguido pelos impelidores TR e EEUP. A boa transferência do impelidor EEDP no início dos cultivos talvez seja devido ao excelente comportamento que esse impelidor apresenta com fluidos Newtonianos. No entanto, na sequência do cultivo, observa-se que nas primeiras 15 h uma

queda brusca nos valores de  $k_{L,a}$  no sistema operado com o impelidor EEDP. Para o impelidor TR a queda nos valores do  $k_{L,a}$  foi menos acentuada até as 18 h de cultivo. Para o sistema operando com o impelidor EEUP a queda dos valores de  $k_{L,a}$  foi ainda mais suave prolongando-se até as 27 horas de cultivo.

Os valores obtidos de  $k_{L,a}$  para o sistema operado com o impelidor TR foram similares aos valores obtidos por Campesi (2009), ressaltando a não existência na literatura de trabalhos que avaliam valores de  $k_{L,a}$  ao longo de cultivos de microrganismos filamentosos para sistemas com impelidores EE.

**Figura 5.40.** Perfis do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ) nos cultivos operando com os impelidores TR, EEDP e EEUP e condições de  $N=800\text{rpm}$  e  $\phi_{ar}=0,50\text{ vvm}$ .



Comparando os comportamentos de  $K$ ,  $k_{L,a}$  e  $\dot{\gamma}_m$  ao longo dos cultivos nas Figura 5.41 à Figura 5.43, podemos observar uma grande variação dessas variáveis entre os diferentes impelidores utilizados, ficando evidente a diferença entre os impelidores estudados, sendo o impelidor TR o que exibiu maiores valores de  $\dot{\gamma}_m$ , seguido do impelidor EEUP, sendo estes impelidores os mais cisalhantes.

Também pode ser observado que valores de  $k_{L,a}$  diminuem conforme os níveis de  $K$  aumentam, sendo o impelidor EEDP o mais afetado em função da menor transferência de oxigênio (Figura 5.42).

Figura 5.41. Variações de  $K$ ,  $k_L a$  e de  $\dot{\gamma}_m$  ao longo dos cultivos com impelidor turbina de Rushton (TR) operando com  $N=800\text{rpm}$  e  $\phi_{ar}=0,50\text{ vvm}$ . As barras indicam os desvios padrão.

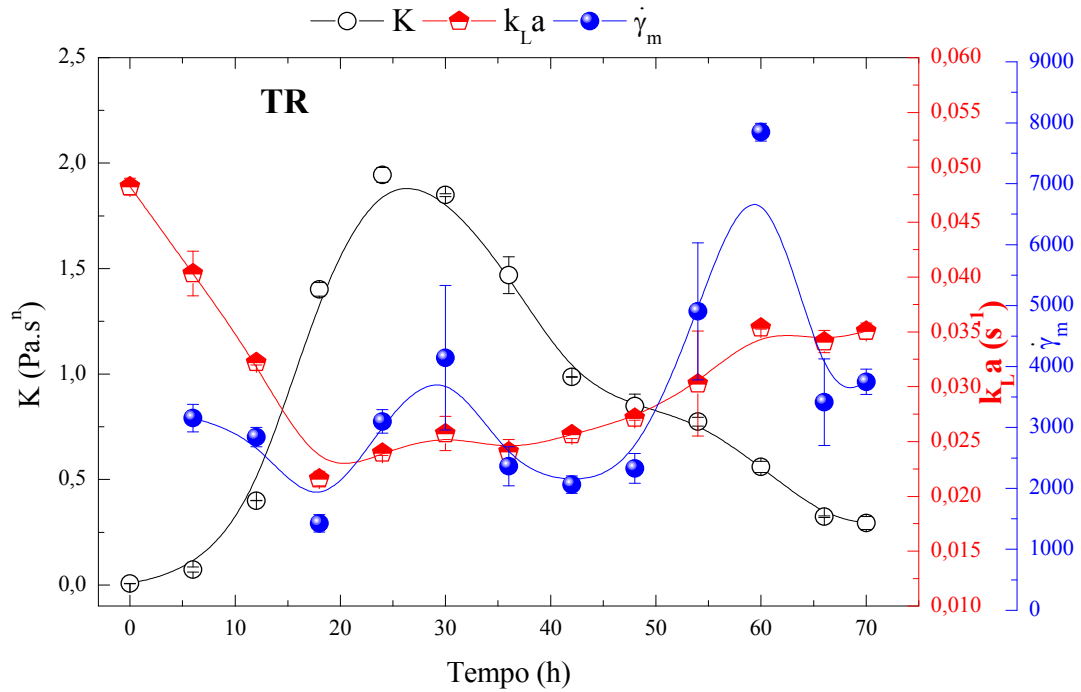


Figura 5.42. Variações de  $K$ ,  $k_L a$  e de  $\dot{\gamma}_m$  ao longo dos cultivos com o impelidor EEDP operando com  $N=800\text{rpm}$  e  $\phi_{ar}=0,50\text{ vvm}$ . As barras indicam o desvio padrão.

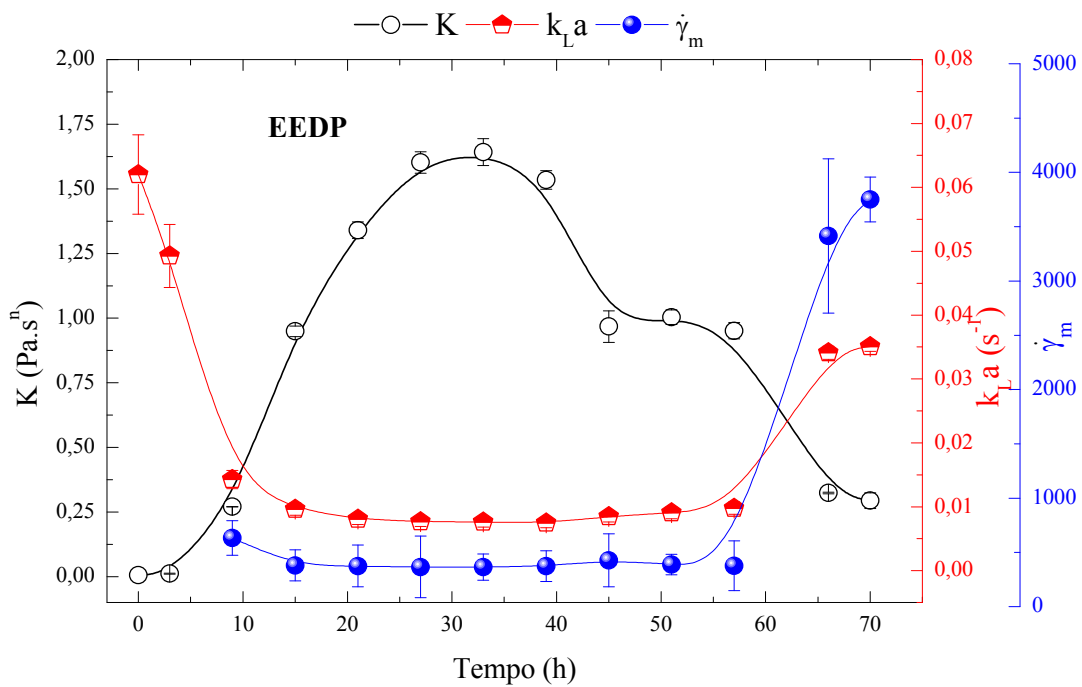
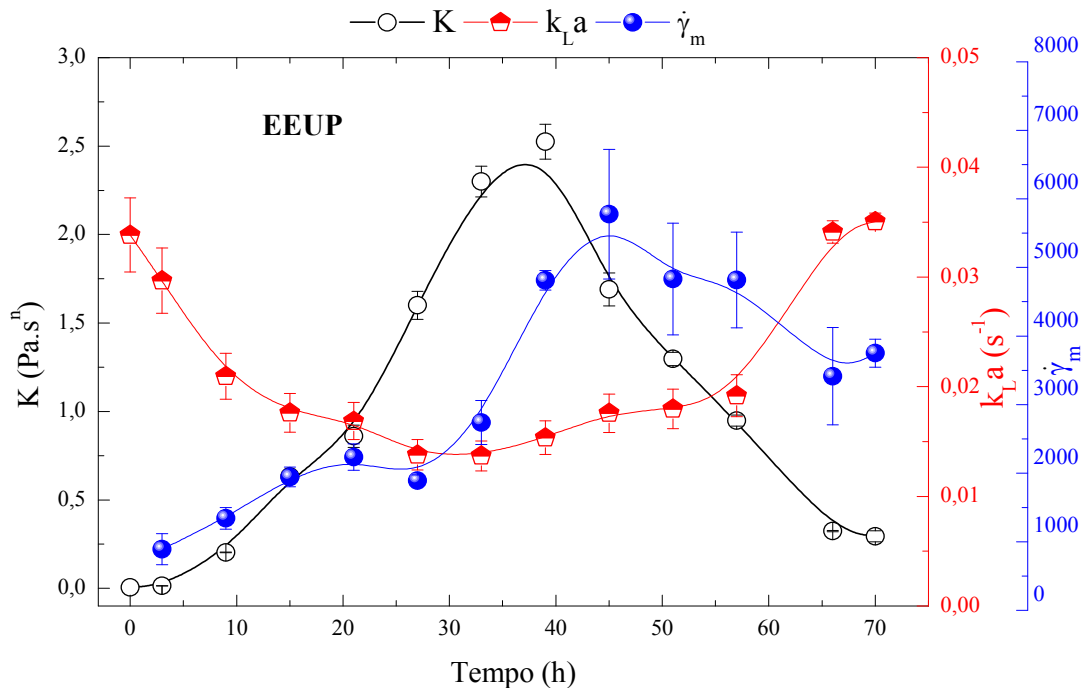


Figura 5.43. Variações de  $K$ ,  $k_L a$  e de  $\dot{\gamma}_m$  ao longo dos cultivos com o impelidor EEUP operando com  $N=800\text{rpm}$  e  $\phi_{ar}=0,50\text{vvm}$ . As barras indicam o desvio padrão.



No sistema equipado o impelidor TR (Figura 5.41), observa-se uma lenta diminuição de  $\dot{\gamma}_m$  até às 18 horas. Posteriormente  $\dot{\gamma}_m$  manteve-se oscilante em torno de  $3000\text{ s}^{-1}$ , atingindo um valor máximo de  $7800\text{ s}^{-1}$  em 60 horas de cultivo. Para o impelidor EEUP (Figura 5.43), os valores de  $\dot{\gamma}_m$  apresentaram um aumento constante atingindo um máximo ( $5778\text{ s}^{-1}$ ) em 45 horas de cultivo e depois se manteve quase constante em torno de  $4800\text{ s}^{-1}$ . Operando o sistema com o impelidor EEDP (Figura 5.42), o mesmo ofereceu uma resposta “menos agressiva” em termos de cisalhamento, observando no início do cultivo altos níveis de  $\dot{\gamma}_m$ , mantendo-se constantes após das 12 h de cultivo, em torno de  $370\text{ s}^{-1}$ , mesmo com um aumento nos níveis de  $K$ . A queda da resposta cisalhante relacionou-se a um valor máximo do índice de consistência menor em relação aos outros impelidores ( $K_{\text{max-TR}} = 1,94\text{ Pa.s}^n$ ,  $K_{\text{max-EEUP}} = 2,50\text{ Pa.s}^n$  e  $K_{\text{max-EEDP}} = 1,64\text{ Pa.s}^n$ ). Posteriormente os valores de  $K$  decrescem ao longo do tempo de cada cultivo devido à lise gerada no microrganismo, observando-se um aumento da velocidade de cisalhamento. No entanto, o impelidor EEDP mesmo operando com caldo apresentando baixos níveis de  $K$ , apresentou dificuldade na homogeneização do mesmo, sendo observadas grandes regiões estagnadas denominadas de zonas mortas,

próximas às paredes do vaso, o que indica uma redução das transferências de massa e calor no interior do tanque durante a homogeneização (AMANULLAH et al., 1998). Portanto, o sistema com o impelidor EEDP foi afetado negativamente pelo incremento da viscosidade do caldo, o que indica que o uso deste impelidor é inadequado para cultivos de microrganismos filamentosos. Que geram caldos de cultivo viscosos com comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, além da configuração do sistema utilizado (EEDP ou EEUP), é dizer, poderiam ser incrementados os valores do *clearance* ( $C_l$ ), como o indicado por Kresta e Brodkey (2003). Esta resposta está de acordo com os resultados obtidos por Collignon et al. (2010), que avaliaram diferentes impelidores nas configurações *down pumping* em biorreator de 10 L, sendo que os impelidores EEDP e TTP apresentaram uma resposta menos cisalhante quantificada por técnicas de derivada espacial utilizando a técnica PIV, em baixas rotações (50 e 20 rpm) para uma suspensão completa de microcarregadores.

Avaliando a resposta do impelidor EEUP, observa-se que o mesmo foi menos cisalhante que o impelidor TR, oferecendo melhores condições de cultivo e permitindo um aumento nos valores de K, isto é, oferecendo condições para o crescimento celular. Esta relação direta entre o índice de consistência (K) e a concentração celular em diferentes condições de cisalhamento também foi apresentada por Campesi (2007), mediante a avaliação da resposta cisalhante do impelidor TR em diferentes graus de agitação de 600 até 1000 rpm em biorreator de 4 L. Cabe ressaltar que nestes cultivos não foi possível medir a massa seca das células devido à presença de insolúveis no meio de cultura devido à presença de proteína isolada de soja.

De acordo estes resultados esperados, conforme a avaliação realizada na seção 5.1.3, os impelidores são classificados em função do grau de cisalhante da seguinte forma:

$$TR > EEUP > EEDP$$

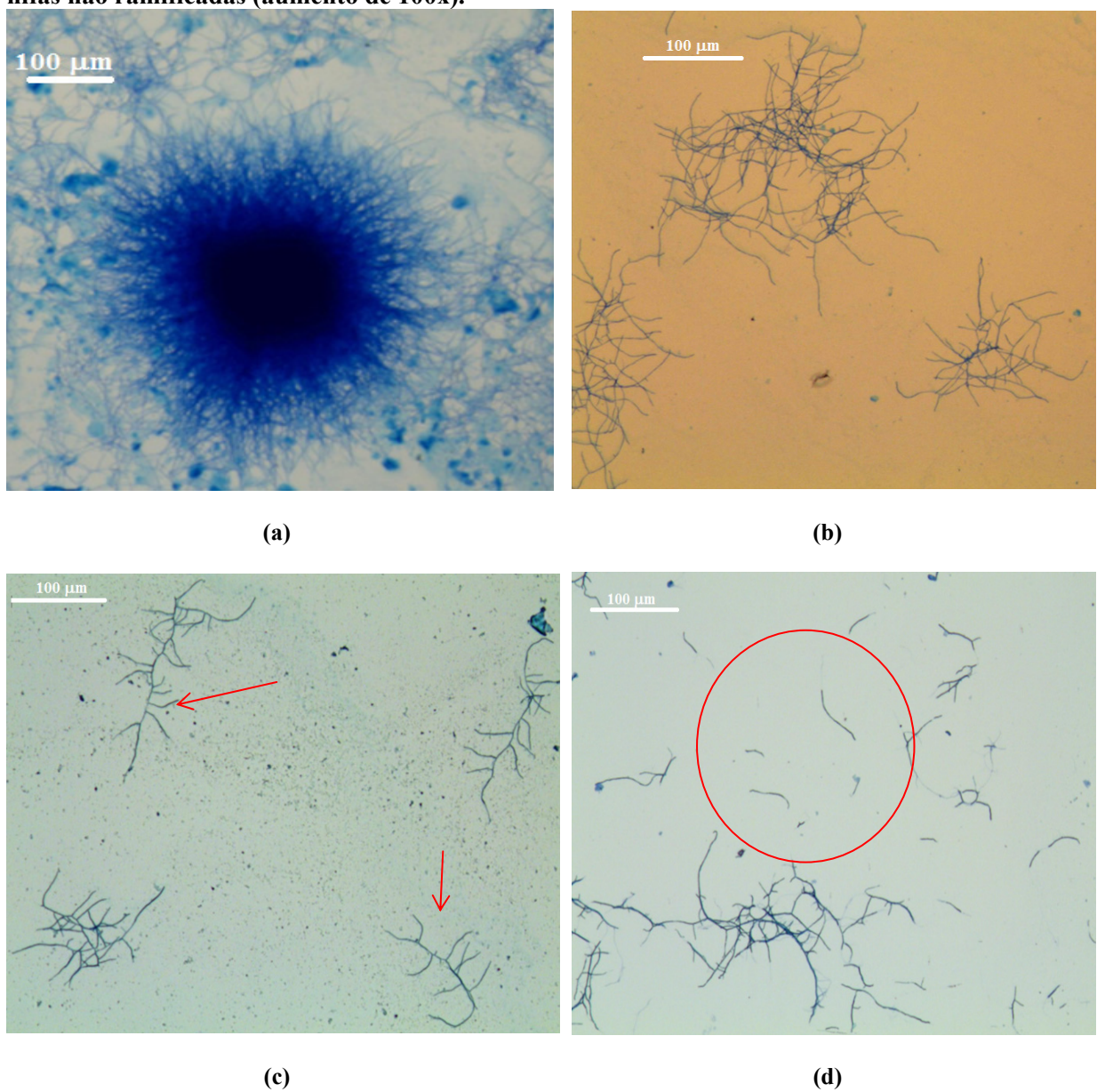
Demonstrando-se assim, o baixo poder cisalhante dos impelidores EE, sendo necessário salientar que estes resultados são os primeiros encontrados na literatura que ratifica a resposta menos cisalhante dos impelidores EEs em relação ao impelidor TR em cultivos de microrganismos filamentosos altamente aeróbios.

### **5.2.2. Análise da morfologia celular durante cultivos com diferentes impelidores**

Com relação ao efeito das condições de cisalhamento na morfologia celular, foram caracterizadas e quantificadas quatro classes morfológicas de *S. clavuligerus* em cada sistema de impelidores. Foram determinadas as porcentagens referentes a cada classe morfológica,

sendo também determinadas algumas dimensões características ao longo de cada cultivo, como área média (AM), diâmetro médio (DM), comprimento médio (CM) e perímetro convexo médio (PCM). Foram tratadas aproximadamente 2400 imagens (fotografias digitais), consumindo um tempo de trabalho de mais de 2 meses. Como ilustração, algumas dessas fotografias estão apresentadas na Figura 5.44, onde se encontra os tipos de estruturas ou classes morfológicas encontradas ao longo de cada cultivo. São elas:

**Figura 5.44.** Fotografias alusivas às diferentes classes morfológicas apresentadas por *S. clavuligerus* no caldo de cultivo: a) *pellet* (aumento 40x); b) *clumps*; c) hifas ramificadas e d) hifas não ramificadas (aumento de 100x).



Pellets: formações bastante compactas de hifas conforme observado na Figura 5.44 (a). Também pode ser notada uma grande quantidade de hifas emaranhadas e fragmentos de proteína de soja utilizados no meio de cultura como fonte de nitrogênio, que também foi corada pelo azul de metileno, dificultando o tratamento das imagens.

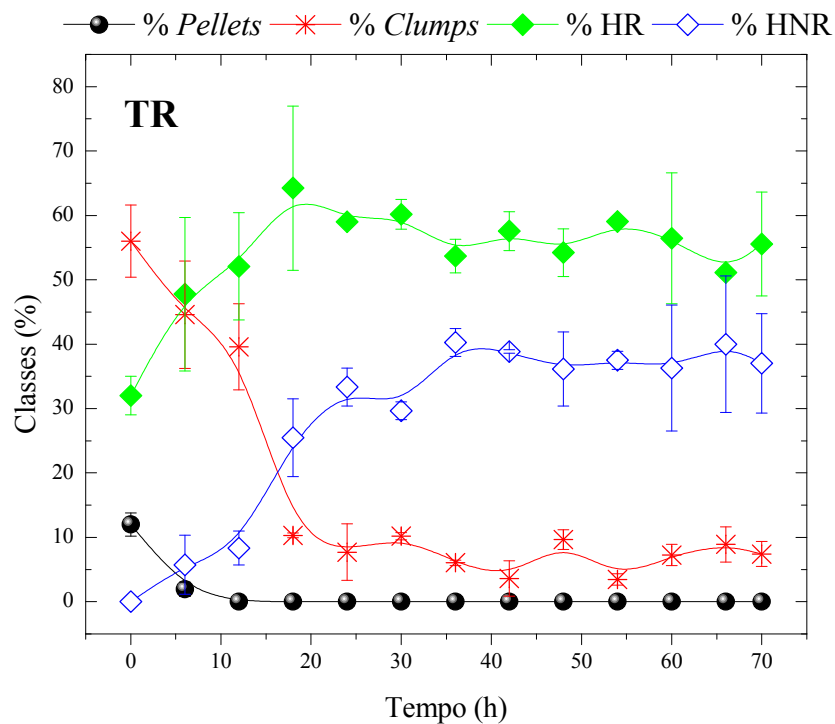
Clumps: aglomerados de hifas ilustrados na Figura 5.44 (b). São menos compactos que os *pellets*.

Hifas ramificadas (HR): formações lineares com ramificações, que apresentam mais de duas pontas (Figura 5.44 (c)).

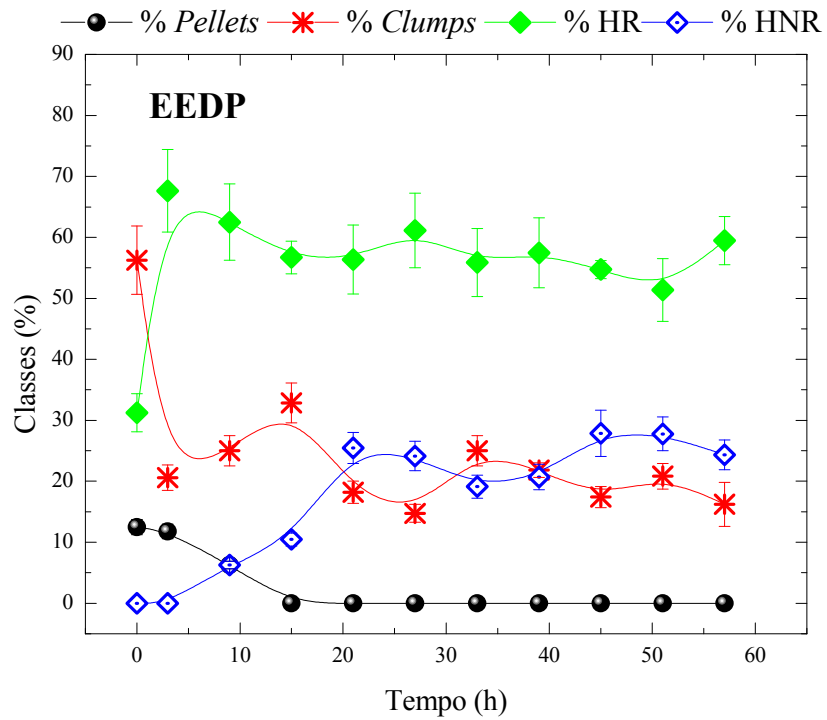
Hifas não ramificadas (HNR): formações lineares sem ramificações que apresentam duas pontas (Figura 5.44 (d)), sendo estas estruturas de menor tamanho.

Salienta-se que nos inóculos encontram-se formas celulares de *pellets*, *clumps* e hifas ramificadas, apresentando alterações em termos destes parâmetros morfológicos. As porcentagens de cada classe são expostas na Figura 5.45 para os impelidores TR, EEDP e EEUP, observando-se a predominância das hifas ramificadas nos três cultivos, assim como a geração de hifas não ramificadas, produto do cisalhamento.

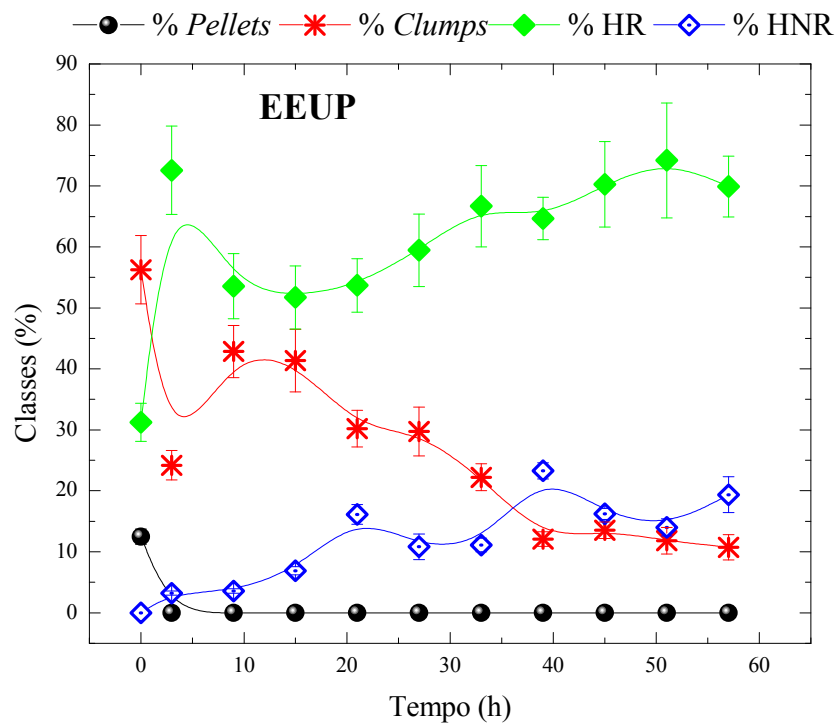
Figura 5.45. Porcentagens de classes morfológicas ao longo dos cultivos com diferentes impelidores: (a) TR, (b) EEDP e (c) EEUP.



(a)



(b)



(c)



As dimensões de cada classe morfológica foram avaliadas em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) no transcurso dos cultivos estando esses valores acompanhados de seus respectivos desvios padrão, onde se tem que:

***Pellets (P)***: os valores médios referentes a esta classe são mostrados nas Figura 5.46 a 5.49, onde é possível observar as grandes dimensões apresentada por essa classe morfológica ( $AM_p$ ,  $DM_p$ ,  $CM_p$  e  $PCM_p$ ). Os *pellets* são de maior tamanho em comparação aos *clumps* e hifas livres.

Figura 5.46. Área média de *pellets* ( $AM_p$ ).

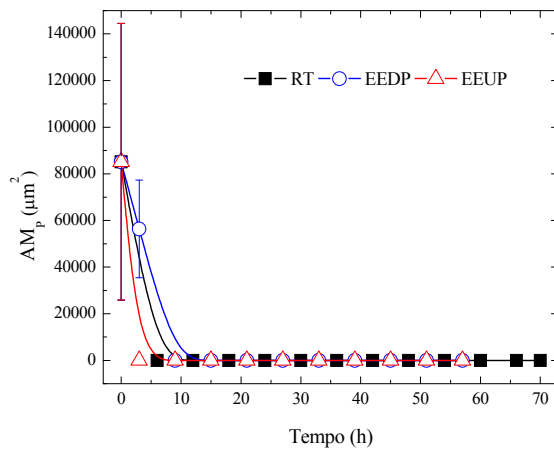


Figura 5.47. Diâmetro médio de *pellets* ( $DM_p$ ).

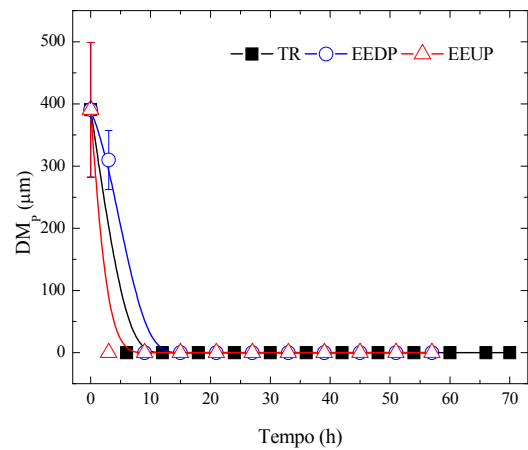


Figura 5.48. Comprimento médio de *pellets* ( $CM_p$ ).

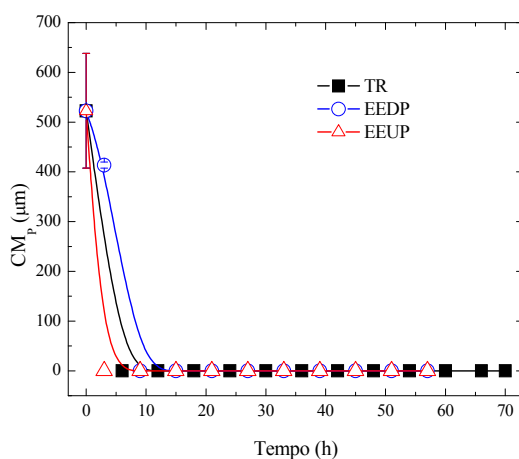
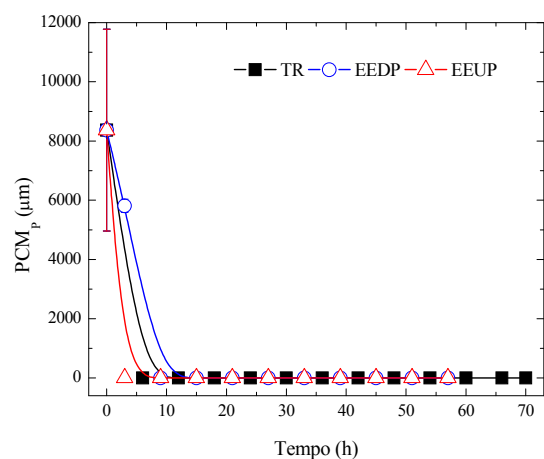


Figura 5.49. Perímetro convexo médio de *pellets* ( $PCM_p$ ).



Por exemplo, os *pellets* apresentaram uma área média ( $AM_p$ ) de 85.154  $\mu\text{m}^2$  enquanto os *clumps* apresentaram  $AM_c$  de 6.041,7  $\mu\text{m}^2$  (Figura 5.46 e 5.51). Posteriormente, no decorrer do processo, observa-se que os *pellets* desaparecem em poucas horas de cultivo

devido alta fragmentação causada pelas condições de cisalhamento a que foram submetidos.

Esta resposta se manifestou principalmente nos cultivos operando com os impelidores TR e EEUP. Já em 6 h de cultivo, não foi mais detectada esta classe morfológica. No cultivo operado com o impelidor EEDP os *pellets* desaparecem aproximadamente após das 9 h. A partir desses resultados pode-se afirmar que o impelidor EEDP parece ser menos cisalhante no início do cultivo que os impelidores TR e EEUP.

**Clumps (c):** suas dimensões ( $AM_C$ ,  $DM_C$ ,  $CM_C$ ,  $PCM_C$ ) são mostradas nas Figura 5.50 a 5.53. Foi observada uma rápida fragmentação de *clumps* no cultivo com TR antes de 20 h de cultivo.

Figura 5.50. Área média de *clumps* ( $AM_C$ ).

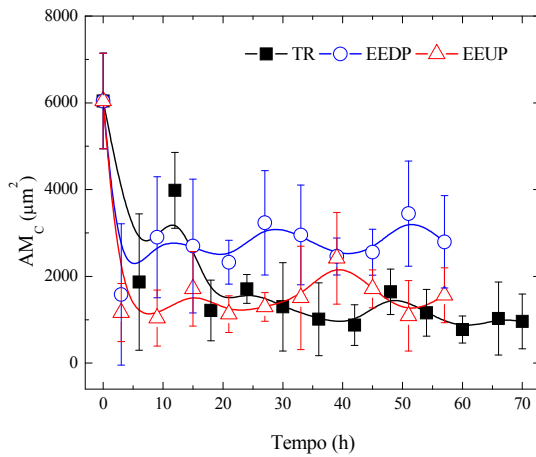


Figura 5.51. Diâmetro médio de *clumps* ( $DM_C$ ).

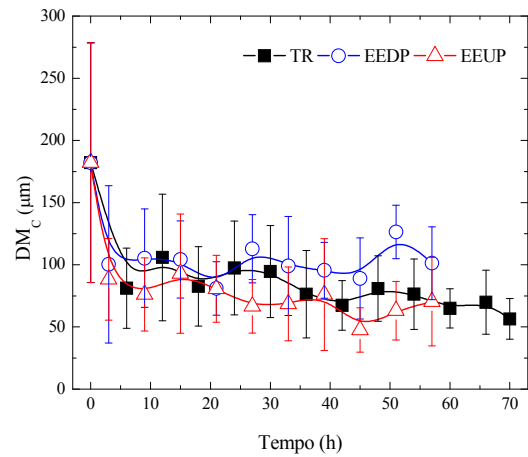


Figura 5.52. Comprimento médio de *clumps* ( $CM_C$ ).

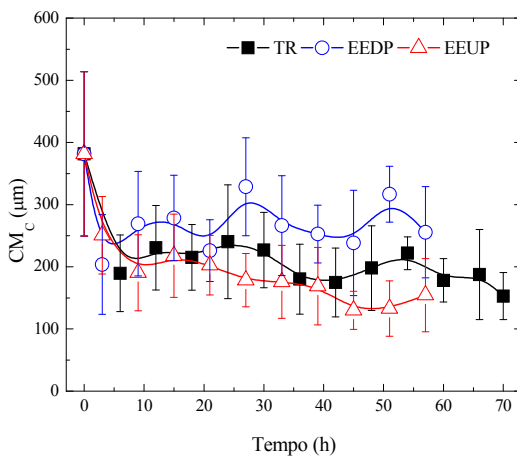
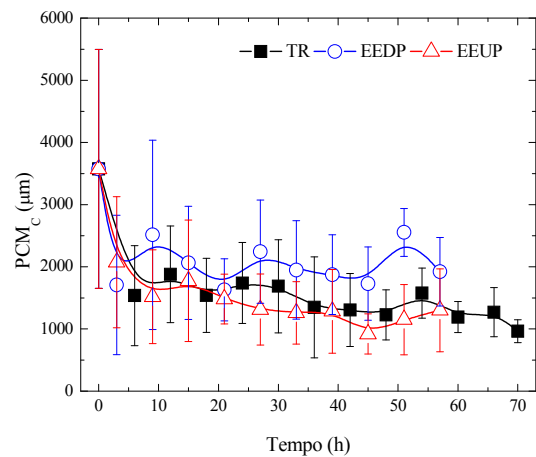


Figura 5.53. Perímetro convexo médio de *clumps* ( $PCM_C$ ).



Sua proporção apresentou maior diminuição em torno de 40%, mantendo-se em torno de 10% do total após 18 h de cultivo operando o sistema com o impelidor TR, ao contrário do observado nos cultivos com impelidores EE.

Nos cultivos com os impelidores TR e o EEUP os *clumps* apresentaram menores dimensões, com diâmetros médios na faixa de  $DM_{C(TR)} = 182,1$  a  $56,4 \mu\text{m}$  e  $DM_{C(EEUP)} = 182,1$  a  $47,0 \mu\text{m}$ , sendo estes menores em comparação com os obtidos com o impelidor EEDP ( $DM_{C(EEDP)} = 182,1$  a  $89,0 \mu\text{m}$ ), mostrando ser este impelidor EEDP o menos cisalhante.

A fragmentação dos *clumps* no cultivo com o impelidor EEUP foi lenta em comparação aos outros impelidores, diminuindo gradualmente em termos de porcentagem. Após 33 h de cultivo suas proporções se mantiveram praticamente constantes durante todo o cultivo (Figura 5.45 (c)). Com base nesses resultados, pode-se afirmar que esse impelidor gera um ambiente mais adequado para o desenvolvimento do microrganismo, talvez devido ao tipo de escoamento gerado mantendo o meio uniforme durante a agitação. Contrariamente, uma agitação não uniforme pode gerar efeitos negativos para o ambiente fermentativo devido à alta densidade micelial, provocando limitação de nutrientes e prejudicando a transferência de oxigênio ao núcleo de *pellet* e *clumps*, afetando negativamente a produção do metabólito de interesse, assim como gerando danos físicos e até mesmo a morte do microrganismo conforme relatado na literatura (PINTO et al., 2001; GARCIA-OCHOA e GOMES, 1998). A Figura 5.54 ilustra uma fotografia de um *clump* típico do microrganismo *S. clavuligerus*, mostrando regiões não viáveis maioritariamente no centro do *clump* e algumas hifas laterais (em vermelho) e uma fração de membranas intactas ou viáveis (em verde).

**Hifas ramificadas (HR):** os resultados de  $AM_{HR}$ ,  $DM_{HR}$ ,  $CM_{HR}$ ,  $PCM_{HR}$  ao longo dos cultivos para esta classe morfológica estão mostrados nas Figura 5.55 a Figura 5.58. Nas cinco primeiras horas, esta classe foi gerada pela fragmentação de *pellets* e *clumps* e, por esta razão, a diminuição desta classe morfológica foi mais lenta no cultivo com TR (Figura 5.45 (a)), sendo mais acentuada nos cultivos com os impelidores EE.

Cabe salientar o predomínio de HR próximo de 70% do total nas primeiras horas de cultivo com os impelidores EE, indicando que esses impelidores se mostraram mais cisalhantes no início do cultivo quando o caldo apresenta um comportamento próximo ao Newtoniano. Logo entre as 9 e 15 h de cultivo o número de HR diminui levemente tendo nesse instante um aumento no número *clumps*. Esse efeito é mais notório com o impelidor EEUP (Figura 5.45 (c)). Nesse período de cultivo, o maior número desses *clumps* parece ser

gerado a partir dos HR (hifas ramificadas), mas estes *clumps* apresentaram também menor área para o impelidor EEUP, em comparação aos impelidores EEDP e TR.

**Figura 5.54. Fotografia de um *clump* durante um cultivo de *S. clavuligerus*.**

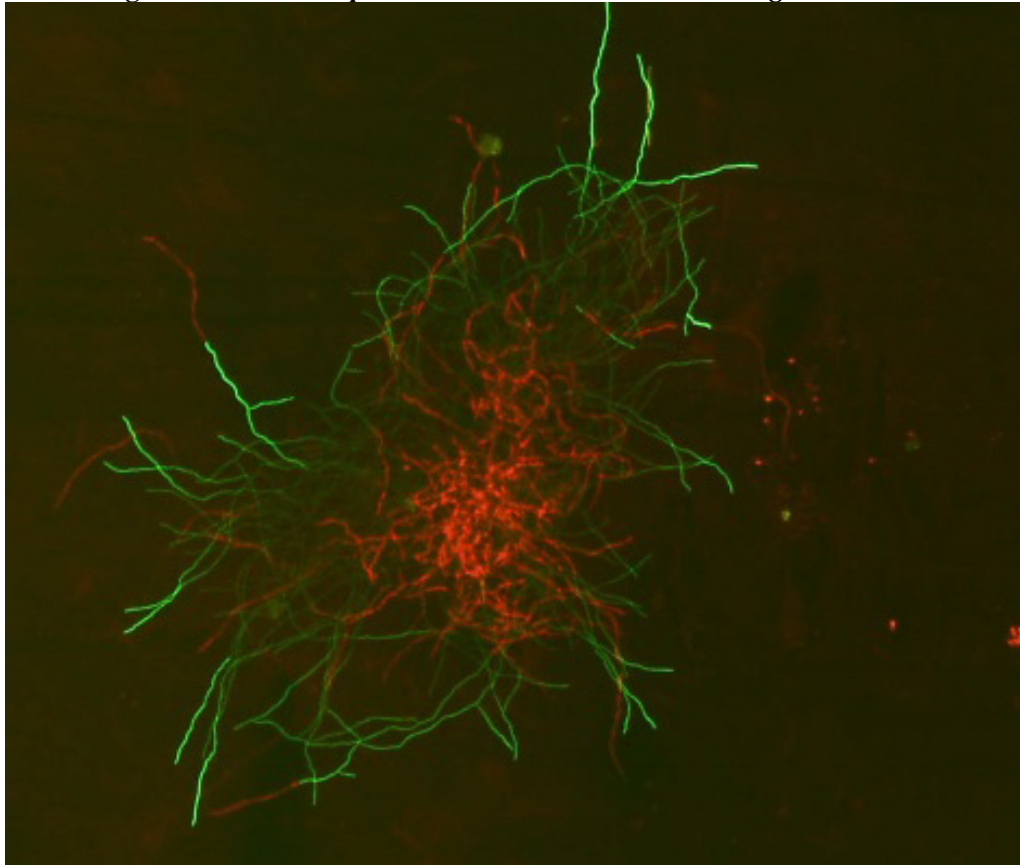


Foto com permissão Brittes (2012).

Em termos de área média de *clumps* até 15 h de cultivo, foram observadas variações nas seguintes faixas:  $(AM_C)_{EEUP} = 1.163,7$  a  $1.712,6 \mu\text{m}^2$ ;  $(AM_C)_{TR} = 1.869,3$  a  $3.983,8 \mu\text{m}^2$  e  $(AM_C)_{EEDP} = 1.581,6$  a  $2.902,0 \mu\text{m}^2$ . A partir desses resultados, define-se a seguinte classificação em função de  $AM_C$ :

$$TR > EEDP > EEUP$$

Caso os resultados sejam analisados em função do comprimento médio de HR ( $CM_{HR}$ ), estes apresentaram menores valores para o impelidor EEUP em comparação aos resultados obtidos para o impelidor EEDP. Esta diferença pode ser explicada pela abundante ramificação apresentada nos cultivos pelo EEUP. Em cultivos operando com impelidores TR as HR apresentaram menores comprimentos antes das 20 h de cultivo em comparação aos impelidores EE, obedecendo a classificação em termos de comprimento médio ( $CM_{HR}$ ):

EEDP>EEUP>TR.

Resultados similares foram observados por Dion (1954), citado por Kresta e Brodkey (2003), relatando estas mudanças na morfologia em cultivos de *Penicillium chrysogenum* para a produção de penicilina, utilizando condições ótimas de agitação e aeração, sendo que a agitação afetou o crescimento dos micélios, gerando fragmentos curtos, grossos e bem ramificados, denominando as hifas como “hifas jovens”.

Figura 5.55. Área média de hifas ramificadas ( $AM_{HR}$ ).

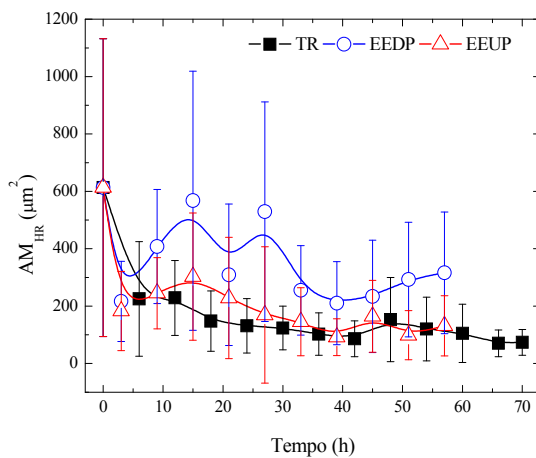


Figura 5.56. Diâmetro médio de hifas ramificadas ( $DM_{HR}$ ).

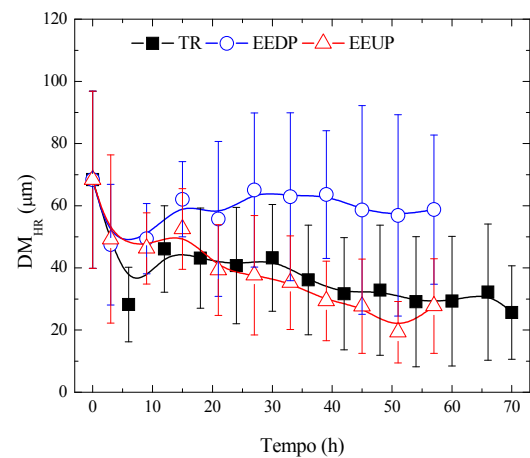


Figura 5.57. Comprimento médio de hifas ramificadas ( $CM_{HR}$ ).

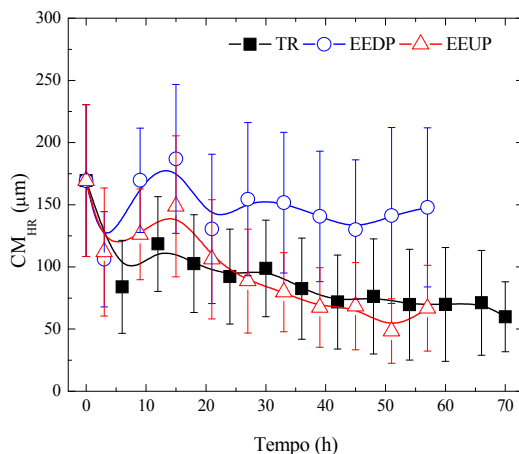
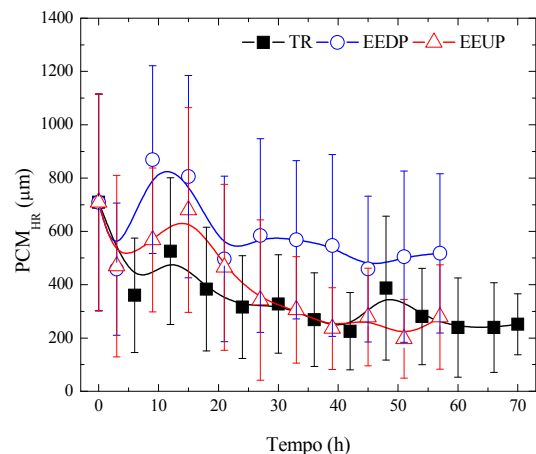


Figura 5.58. Perímetro convexo médio de hifas ramificadas ( $PCM_{HR}$ ).



O comportamento observado nas primeiras horas do cultivo pode ser explicado a partir da literatura. Em um meio líquido agitado, o inoculo dá origem a colônias com diferentes densidades e tamanhos de micélio, dependendo da linhagem, do meio e condições de aeração

entre outras condições de operação. Onde a agitação durante estas fermentações submersas pode levar a fragmentação de *pellets*, mas também à ruptura de fragmentos de hifas, muitas vezes resultando na renovação do crescimento celular a partir desses fragmentos. Logo, esses fragmentos podem agir como novos centros de crescimento (origem de novas microcolônias). Por outro lado, em muitos casos o micélio finalmente se desintegra e sofre autólise, porém pouco se sabe a respeito deste fenômeno (BALLOWS, 2004; PAPAGIANNY, 2004).

Nesse sentido, no início dos cultivos os sistemas mostraram condições altamente favoráveis para este tipo de microrganismo, sendo determinante no aumento da concentração celular traduzida em termos de valores de K quando utilizados os EE.

Avaliando o sistema equipado com o impelidor EEDP, este parece ser o mais afetado negativamente pelo aumento da viscosidade, interferindo como barreira à transferência do oxigênio e homogeneização do meio, provocando limitações drásticas ao cultivo, sendo que os números de *clumps* e HR se mantiveram praticamente constantes após as 20 h de cultivo, não sendo mais fragmentados (Figura 5.45 (b)).

De maneira geral nos cultivos com o impelidor EEUP houve uma maior fragmentação de *clumps* nas primeiras h do cultivo, mas entre 10 e 18 h sua proporção aumentou, parecendo ser gerados a partir de HR. Depois das 20 h de cultivo pode notar-se o decréscimo na quantidade de *clumps* e o aparecimento de HR em maior proporção que HNR.

Com base nos resultados obtidos, o impelidor EEUP ofereceu melhores condições de cultivo, devido ao fato que o cisalhamento ocorreu de forma gradual sem afetar de maneira drástica as estruturas morfológicas. Assim, os microrganismos se adaptaram melhor ao ambiente hidrodinâmico gerado por este impelidor no início de cultivo, sendo o impelidor EEUP o mais adequado ao tipo de cultivo.

Ao longo dos cultivos os comprimentos das HR foram diminuindo, quando o sistema foi operado com os impelidores TR e EEUP, mantendo-se praticamente constantes para o sistema equipado com o EEDP. Em geral, os comprimentos das HR variaram nas seguintes faixas para cada impelidor:  $CM_{HR(TR)} = 169,4$  a  $59,9 \mu\text{m}$ ,  $CM_{HR(EEDP)} = 169,4$  a  $130,0 \mu\text{m}$  e  $CM_{HR(EEUP)} = 169,4$  a  $48,4 \mu\text{m}$ .

**Hifas não ramificadas (HNR):** grandes quantidades de HNR surgem nos cultivos utilizando os impelidores TR e EEDP. Suas dimensões ( $AM_{HNR}$ ,  $DM_{HNR}$ ,  $CM_{HNR}$ ,  $PCM_{HNR}$ ) são apresentadas nas Figura 5.59 à Figura 5.62. HNR nos cultivos com o impelidor TR apresentam menores dimensões em relação às obtidas com os impelidores EE, atingindo um máximo de 35% do total às 18 h de cultivo.

Figura 5.59. Área média de hifas não ramificadas ( $AM_{HNR}$ ).

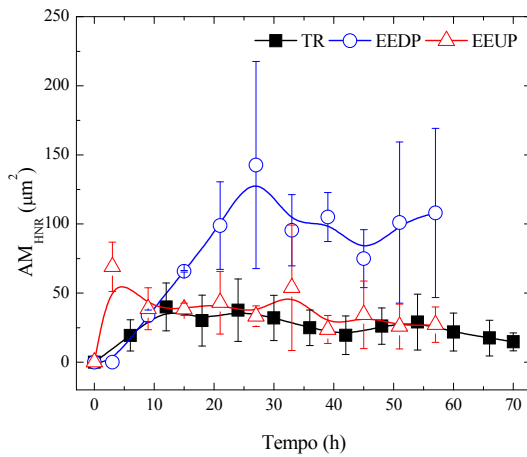


Figura 5.60. Diâmetro médio de hifas não ramificadas ( $DM_{HNR}$ ).

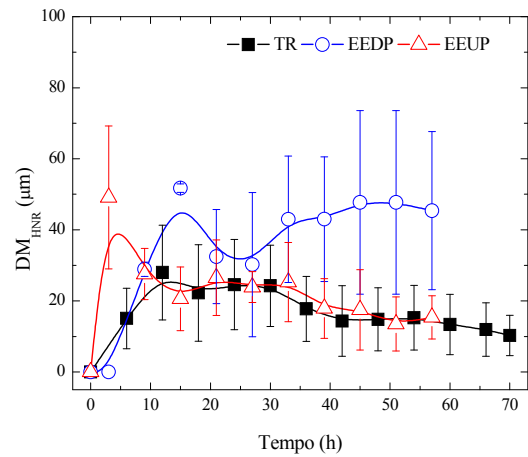


Figura 5.61. Comprimento médio de hifas não ramificadas ( $CM_{HNR}$ ).

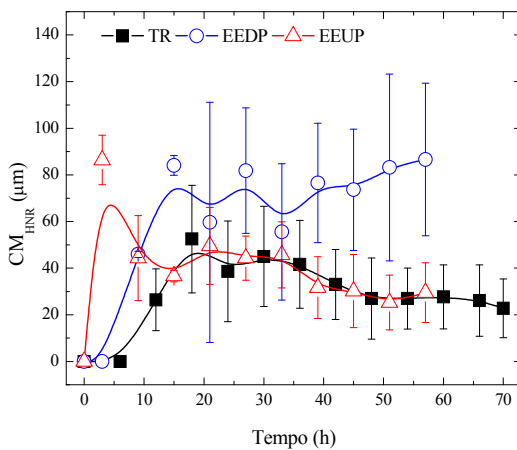
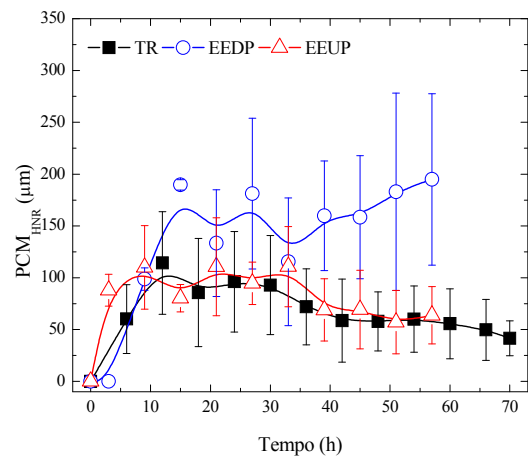


Figura 5.62. Perímetro convexo médio de hifas não ramificadas ( $PCM_{HNR}$ ).



Para o impelidor EEDP, o surgimento de hifas isoladas foi gradual, atingindo um máximo de 30% em 20 horas de cultivo, mantendo-se constante a partir desse instante. No entanto, as HNR geradas em sistemas com o impelidor EEDP apresentaram maiores dimensões comparadas aos outros impelidores, com comprimento médio em torno de 80,0  $\mu m$  após 30 h de cultivo.

Nos cultivos com o impelidor EEUP, as HNR apareceram paulatinamente, conforme os *clumps* foram sendo fragmentados. No impelidor EEUP, a máxima quantidade de HNR observada foi a menor dentre os três impelidores testados, em torno de 20% do total. Curiosamente, as HNR geradas no sistema com o EEUP apresentaram maiores comprimentos, entre 40,0 e 86,4  $\mu m$ , antes das 9 h de cultivo em relação á resposta obtida para os outros

impelidores, o que sugere que o impelidor EEUP fornece um ambiente menos agressivo. Para fins comparativos, considera-se o comprimento médio (CM) das HNR ao longo dos cultivos, obtendo as seguintes faixas de valores:  $CM_{HNR(TR)}=52,5$  a  $22,8 \mu\text{m}$ ,  $CM_{HNR(EEDP)}=45,0$  a  $86,0 \mu\text{m}$  e  $CM_{HNR(EEUP)}=86,4$  a  $25,5 \mu\text{m}$ .

Cabe salientar que, independentemente do tipo de impelidor, o aumento do número de HNR está relacionado ao cisalhamento das demais classes morfológicas.

De modo a resumir a grande quantidade de resultados obtidos, apresenta-se a Tabela 5.6 para melhor comparação dos resultados.

A partir dos resultados apresentados nas Figura 5.63 e Figura 5.64 referentes ao número de extremidades de hifas ramificadas ( $NE_{HR}$ ) e à unidade de crescimento hifal (UCH) nos cultivos realizados, para o impelidor TR foi obtido um valor médio de  $(NE_{HR})_{TR}=6,0$  pontas no início do cultivo, apresentando um valor de  $UCH=15 \mu\text{m}$ . No entanto, ao longo do cultivo as HR apresentaram em média 5 pontas e, como consequência, valor de UCH variou na faixa de  $20,0$  a  $13,0 \mu\text{m}$ . Ou seja, o sistema dotado do impelidor TR não se apresentou como um ambiente favorável desde o início do cultivo para o microrganismo, talvez pelo excesso de turbulência submetendo o microrganismo a um estresse pelo elevado cisalhamento.

Operando o sistema com o impelidor EEDP, foi obtido um valor médio de  $(NE_{HR})_{EEDP}=9,5$  pontas no início do cultivo com  $UCH=10,0 \mu\text{m}$ , mostrando-se como um ambiente ideal para o microrganismo, não existindo limitações de nutrientes nem de oxigênio, mas esse comportamento foi positivo apenas enquanto o sistema apresentou baixa viscosidade. Com o incremento da população micelial o ambiente se mostrou desfavorável com esta configuração de impelidor, pois no transcurso do cultivo o número de pontas diminuíram sensivelmente variando na faixa de  $(NE_{HR})_{EEDP}=5,0$  a  $6,0$  pontas, com grande aumento nos valores de UCH entre  $26,0$  e  $29,0 \mu\text{m}$ .

Para o impelidor EEUP foi obtido um valor médio de  $(NE_{HR})_{EEUP}=7,5$  pontas nas primeiras horas de cultivo. No entanto, ao longo do cultivo o número de pontas diminuiu para o intervalo entre  $6,0$  e  $7,0$  pontas, mantendo valores de UCH entre  $17,0$  e  $10,0 \mu\text{m}$ . Desta forma, obteve-se a seguinte classificação em função do número de extremidades de hifas ramificadas ( $NE_{HR}$ ).

$$EEUP > TR > EEDP$$



Tabela 5.6. Valores máximos e mínimos das dimensões médias obtidas, referente a cada classe morfológica nos cultivos em biorreatores de *S. clavuligerus* com os três impelidores utilizados nessa pesquisa.

Tipo de Impelidor	Dimensões (µm)	<i>Pellets</i>	<i>Clumps</i>	HR	HNR
TR	AM (µm <sup>2</sup> )	85154,9	6041,7 - 958,5	612,8 - 70,3	40,0 - 14,8
	DM	390,53	182,1 - 56,4	68,4 - 25,6	28,0 - 11,9
	CM	522,66	381,7 - 152,8	169,4 - 59,9	52,5 - 22,8
	PCM	8373	3573,9 - 963,4	708,8 - 239,0	114,0 - 41,6
	NE <sub>HR</sub> (-)	~ 6 < 15 h < ~5 pontas			
	UCH	Às 6 h ~15µm no transcurso do cultivo diminui, de 20 h até 13 µm			
EEDP	AM (µm <sup>2</sup> )	85154,9 - 56403,9	6041,7 - 2457,0	612,9-210	142,7 - 75,0
	DM	390,5 - 309,7	182,1 - 89,0	68,38-55,72	47,7 - 28,0
	CM	522,0 - 413,0	381,7 - 252,0	169,4 - 130,0	45,0 - 86,0
	PCM	8373,0 - 5813,4	3573,9 - 1629,0	708,8-458,7	99,0 - 194,0
	NE <sub>HR</sub> (-)	~ 9,5 às 3h e depois das 15 h ~5-6 pontas			
	UCH	10 µm 3h → logo ~ 26 - 29 µm			
EEUP	AM (µm <sup>2</sup> )	85154,9	6041,7 - 1089,0	612,9 - 91,6	69,0 - 23,7
	DM	390,5	182,1 - 48,0	68,38 - 19,3	49,0 - 13,5
	CM	522,7	381,7 - 130,0	169,4 - 48,4	86,4 - 25,3
	PCM	8373,0	3573,9 - 1150,0	708,8 - 196,0	110,7 - 57,0
	NE <sub>HR</sub> (-)	~ 7,5 às 3h →logo ~ 6-7 pontas			
	UCH	~ 17 - 10 µm			

\*Dimensões médias para *pellets*, *clumps* e hifa ramificada no t=0 é dizer apenas inoculado o médio.

Verificando a excelente resposta apresentada pelo impelidor EEUP, neste tipo de cultivo que geram caldos altamente viscosos, pode-se observar na Figura 5.63 que o maior número de extremidades de hifas ramificadas ( $NE_{HR}$ ) geradas com o impelidor EEUP é superior aos observados para os impelidores EEDP e TR. Validando essa resposta pelos valores baixos de valores de UCH em comparação aos resultados obtidos para o impelidor TR. Esta resposta indica que o impelidor EEUP ofereceu melhores condições no cultivo, já que forneceu condições favoráveis ao ambiente hidrodinâmico, isto é, menor cisalhamento associado a uma excelente transferência de oxigênio para este tipo de fluido, como foi demonstrado nas secções 5.1.3.; 5.1.8. e 5.2.1. Uma possível explicação desses resultados vem do padrão de escoamento gerado, o qual define um ambiente nutricional uniforme aos microrganismos filamentosos, favorecendo o aumento da ramificação do micélio ao se reduzir o comprimento da UCH. Em condições limitantes de nutrientes, o micélio tende a ser menos ramificado para maximizar a disponibilidade de nutrientes. Nesse caso, tem-se a resposta apresentada pelo impelidor EEDP onde a ramificação decresceu entre maior foi a unidade de crescimento hifal (UCH), conforme proposto por Prosser e Tough (1991).

Figura 5.63. Número de extremidades de hifas ramificadas ( $NE_{HR}$ )

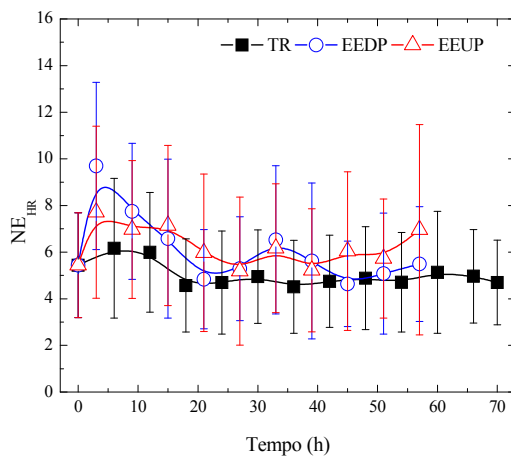
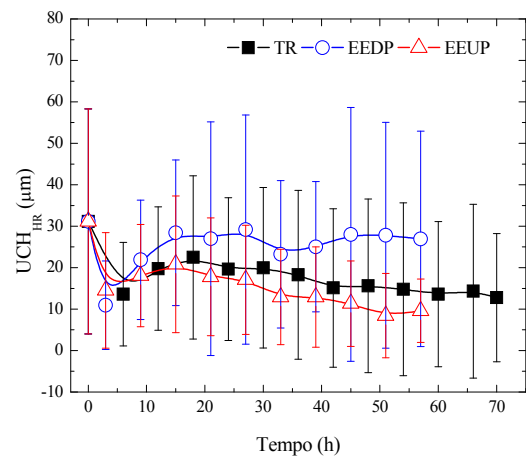


Figura 5.64. Unidade de crescimento hifal de hifas ramificadas ( $UCH_{HR}$ ).



A literatura indica que modificando a transferência da massa gás-líquido e calor mediante a agitação, dependendo do tipo de impelidor, isto conduz a diferenças em termos de crescimento celular, mudança na morfologia e produtividade em cultivos envolvendo microrganismos filamentosos (ROLLINS et al., 1988; MAKAGIANSAR et al., 1993;

JÜSTEN et al., 1996). Porém, deve ser considerado o tipo de escoamento gerado pelos impelidores, já que isso está diretamente relacionado com as propriedades cisalhantes no meio fermentativo que influenciam nos parâmetros morfológicos (tamanho e forma dos agregados miceliares), modificando a reologia dos caldos em todo o processo, como foi demonstrado nos resultados desta etapa.

### 5.2.3. Dissipação de energia $(\bar{\epsilon}_T)_g$ e escala de Kolmogorov $\eta_K$ nos cultivos com diferentes impelidores

Foram calculados valores da dissipação de energia média  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  ao longo de cada cultivo realizado B-1, B-2, B-3 (vide Figura 5.65, Figura 5.66 e Figura 5.67, respectivamente) e a partir deste parâmetro foram calculadas as dimensões dos micro-turbilhões gerados ( $\eta_K$ ) em cada sistema ao longo dos cultivos com os diferentes impelidores. Este parâmetro indica a transferência de energia para o sistema a partir das dimensões dos micro-turbilhões sendo estes últimos também calculados.

Figura 5.65. Dissipação de energia e tamanho de micro-turbilhões gerados nos cultivos com o impelidor TR.

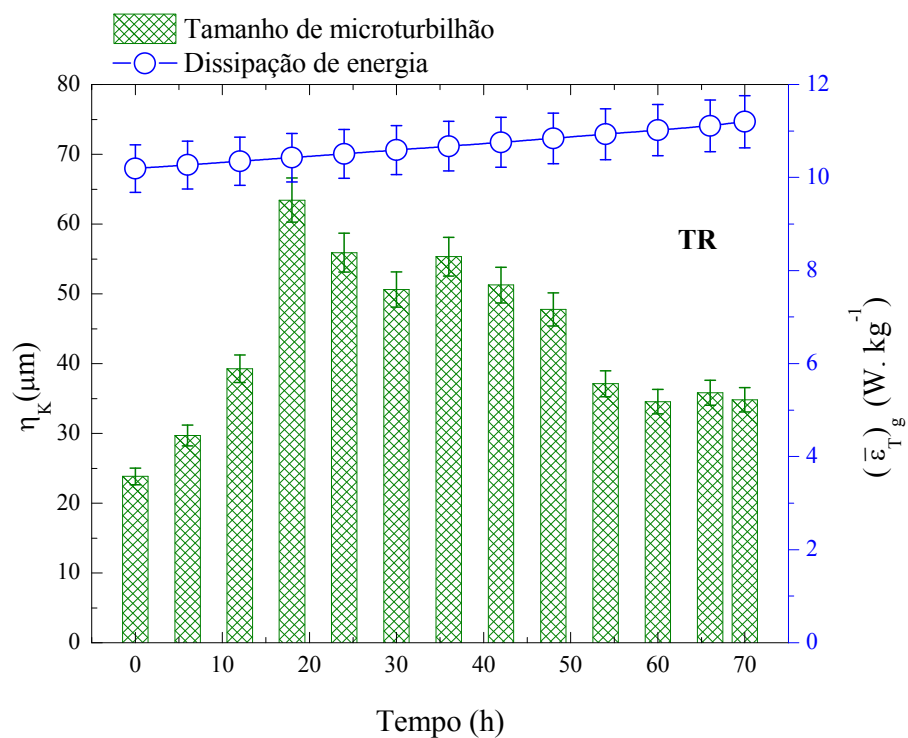


Figura 5.66. Dissipação de energia e tamanho de micro-turbilhões gerados nos cultivos com o impelidor EEDP.

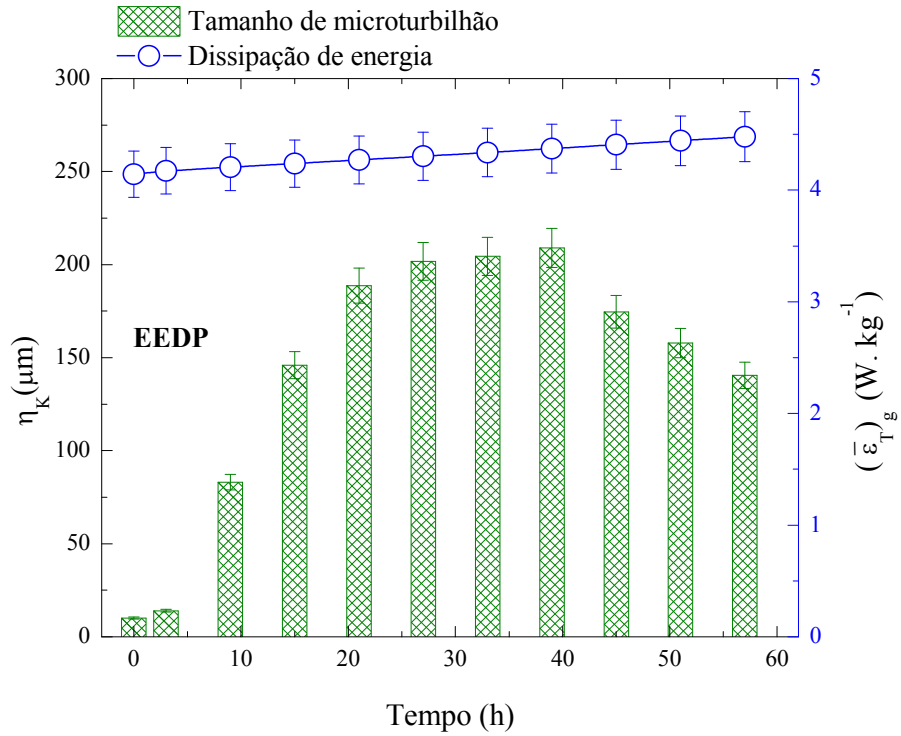
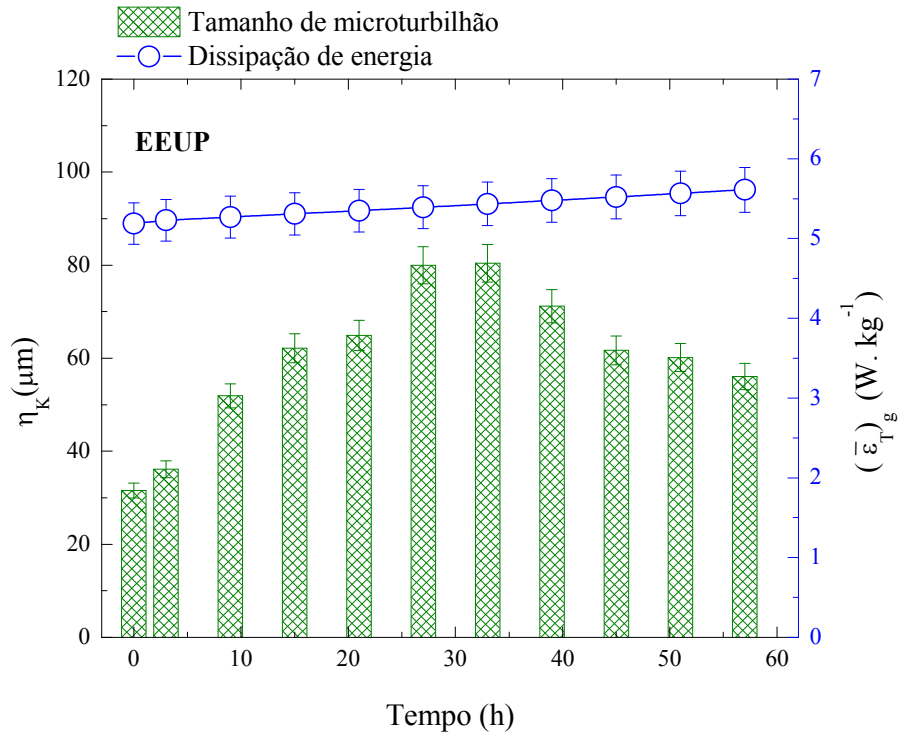


Figura 5.67. Dissipação de energia e tamanho de micro-turbilhões gerados nos cultivos com o impelidor EEUP.



Os resultados mostraram valores muito altos de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  entre 10,2 e 11,2  $\text{W.kg}^{-1}$  no sistema operando com o impelidor TR, em comparação aos impelidores EE,  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  entre 4,1 e 4,5  $\text{W.kg}^{-1}$  para o impelidor EEDP e  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  entre 5,2 e 5,6  $\text{W.kg}^{-1}$  para o impelidor EEUP. A partir desses resultados podem-se classificar os sistemas em termos de dissipação de energia da seguinte forma:

$$\text{TR} \gg \text{EEUP} > \text{EEDP}$$

Nota-se que a resposta apresentada pelo impelidor TR em termos de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  foi mais que duas vezes superior à obtidas pelos sistemas com impelidores EEs, sendo o EEDP quem apresentou menores valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$ . Segundo Chisti (2000), a dissipação de energia durante a ruptura das bolhas depende do tamanho destas, sendo maiores os valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  em bolhas de menor tamanho conforme mostrado nos resultados com o impelidor TR, interferindo na morfologia celular.

Por outro lado, os valores de  $\eta_K$  ficaram na faixa de 23,8 a 63,4  $\mu\text{m}$  para o impelidor TR, entre 10,0 e 208,9  $\mu\text{m}$  para o impelidor EEDP e entre 31,5 e 80,4  $\mu\text{m}$  operando o sistema com impelidor EEUP. Estes resultados demonstram a resposta altamente cisalhante gerada pelo impelidor radial TR ao cultivo, gerando turbilhões de menor tamanho seguido pelo impelidor EEUP, mostrando-se menos cisalhante o impelidor EEDP por gerar micro-turbilhões de maiores dimensões. Ao longo dos cultivos, pode classificar os impelidores de acordo com o tamanho dos micro-turbilhões gerados de maior a menor, da seguinte forma:

$$\text{EEDP} \gg \text{EEUP} > \text{TR}$$

A partir da classificação desses impelidores em termos de dissipação de energia e de tamanho de micro-turbilhões, pode-se constatar que conforme se aumenta a velocidade de cisalhamento, os valores de  $\eta_K$  decrescem. Como foi indicado na Seção 2.12., os valores de  $\eta_K$  são usualmente utilizados como indicador potencial de dano celular, sugerindo que os valores da dissipação de energia não são uniformes no caldo de cultivo. Além disso,  $\eta_K$  depende do tipo de impelidor utilizado, tornando-se então um parâmetro importante, devido às variações irregulares no escoamento em todas as coordenadas e no tempo (HO e OLDSHUE, 1987).

Com base nos resultados obtidos, pode-se considerar o impelidor TR como o mais cisalhante, já que esse impelidor fragmenta os *pellets* e *clumps* no início do cultivo, bem como geram micro-turbilhões de menor tamanho (Figura 5.65). Sendo estes altamente destrutivos como se pode comprovar pela grande quantidade de HR e HNR com menores dimensões encontradas no caldo de fermentação com o impelidor TR (Figura 5.45).

O impelidor EEUP gerou valores de  $\eta_K$  relativamente mais altos que o impelidor TR. Isto é confirmado pelos resultados da análise morfológica, obtendo menores dimensões de HR e grandes quantidades destes nos caldos.

Pode-se observar que com o aumento da viscosidade do caldo o tamanho dos micro-turbilhões aumenta e vice-versa, conforme mostrado em todos os sistemas, sendo então que os níveis de cisalhamento diminuem com aumento da viscosidade. Por exemplo, nas primeiras horas de cultivo, onde o caldo apresenta um comportamento próximo de fluido Newtoniano, o impelidor EEUP mostrou-se menos cisalhante por gerar micro-turbilhões de maior tamanho aliado com menores valores de  $(\bar{\epsilon}_T)_g$  em comparação aos gerados pelos impelidores TR e EEDP.

Estas respostas também podem ser influenciadas pelo tamanho das bolhas geradas em cada sistema conforme estudado na secção 5.1.8. Para o impelidor TR, com  $N = 800$  rpm não foi possível determinar o diâmetro de bolha pelo comportamento do sistema altamente turbulento. No entanto, presume-se pelos níveis de agitação e aeração utilizados, que as bolhas tenham diâmetro médio menor de 1,85 mm, observado a 600 rpm e 0,40 vvm. Quanto ao impelidor EEUP, o mesmo gerou valores de diâmetro médio de bolha de 1,93 mm, valor ligeiramente maior o obtido com o impelidor TR. Uma resposta menos cisalhante também é coerente com os valores obtidos de diâmetro médio de bolhas para o impelidor EEDP, de 2,24 mm para o sistema operado a 800 rpm, conforme apresentado na Secção 5.1.8.

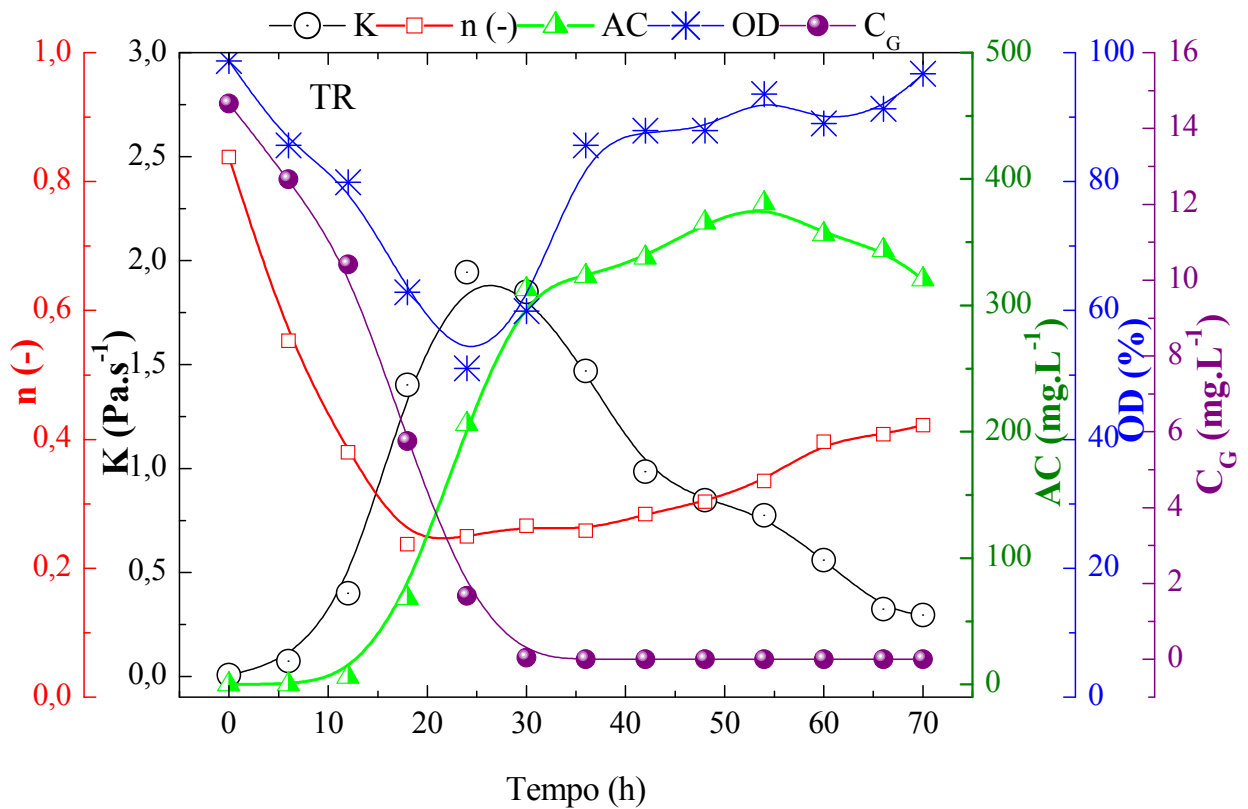
#### **5.2.4. Influência das condições de operação de biorreator na produção de ácido clavulânico nos cultivos com diferentes impelidores**

Os resultados ao longo dos cultivos realizados em biorreator convencional com os impelidores TR, EEDP e EEUP estão ilustrados nas Figura 5.68 até a Figura 5.70, respectivamente, onde se observa os comportamentos para a concentração de glicerol ( $C_G$ ), concentração de oxigênio dissolvido no caldo fermentativo (OD em %), índice de consistência (K), índice de comportamento de escoamento ( $n$ ) e concentração de ácido clavulânico (AC).

Na Figura 5.68 são apresentados os resultados obtidos no cultivo B-1 equipado com o impelidor TR. Neste cultivo não houve limitação por falta de oxigênio, atingindo a concentração de OD o valor mínimo de 51% em 24 h de cultivo. Observa-se que o índice de consistência (K) alcançou o valor máximo de 1,94 e o índice de comportamento de

escoamento um valor de 0,24 em 24 h de cultivo. Observa-se também que a fonte de carbono foi totalmente consumida em 30 h e foi obtida uma produção de ácido clavulânico de 380,7 mg.L<sup>-1</sup> em 54 h de cultivo. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Campesi (2007), utilizando este tipo de impelidor TR sob as mesmas condições de cultivo do presente trabalho ( $N=800$  rpm,  $\phi_{ar}=0,50$  vvm e  $V=4$  L), porém os autores não avaliaram a produção do AC.

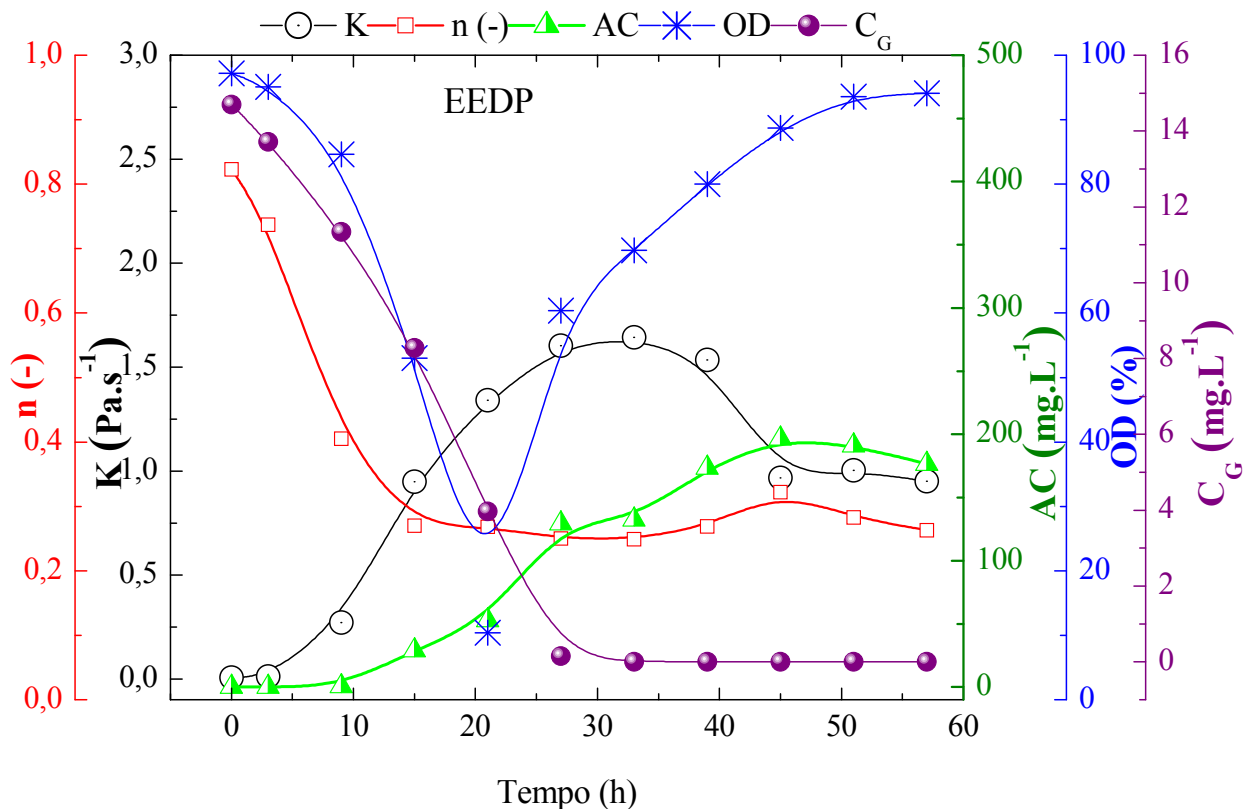
Figura 5.68. Resultados do cultivo B-1 em biorreator tipo tanque agitado equipado com o impelidor TR.



Na Figura 5.69 estão ilustrados os resultados obtidos no cultivo B-2 equipado com o impelidor EEDP. Pode-se verificar que nesse cultivo também não houve limitação por falta de oxigênio, sendo a concentração de OD apresentou um valor mínimo de 10,4% em 21 h de cultivo. No entanto, esta variável foi fortemente afetada em comparação aos outros sistemas devido a uma agitação ineficiente apresentada por este tipo de impelidor. Apesar de apresentar um índice de consistência máximo de 1,64 Pa.s<sup>n</sup> e um índice de escoamento de

0,25 em 33 h, o valor máximo de  $K$  ( $K_{max}$ ) se mostrou menor em comparação aos outros dois sistemas (B-1 e B-3). Neste sistema observasse que a fonte de carbono (substrato limitante) foi totalmente consumida em 27 h de cultivo e foi obtida uma produção de ácido clavulânico baixa, de apenas  $196,6 \text{ mg.L}^{-1}$  em 45 h de cultivo.

Figura 5.69. Resultados do cultivo B-2 no biorreator tipo tanque agitado equipado com o impelidor EEDP.

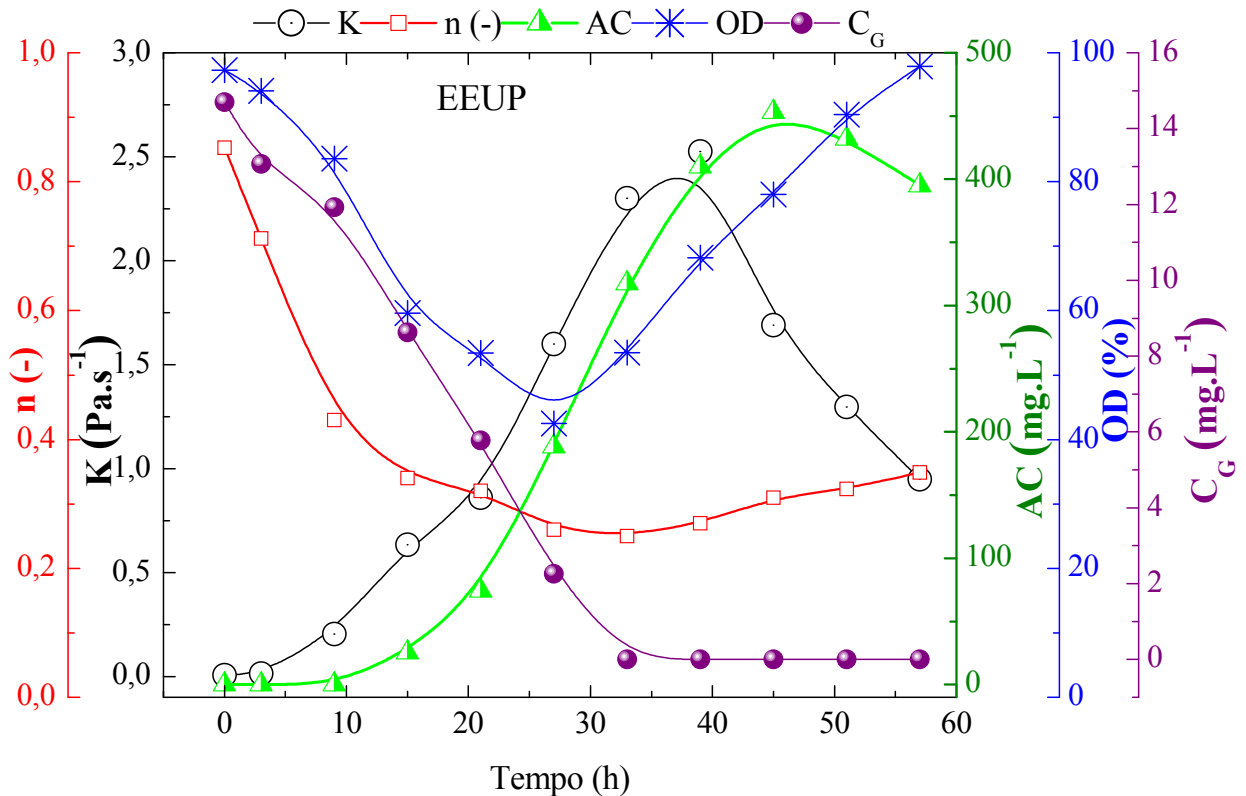


O cultivo B-3 foi executado no sistema equipado com o impelidor EEUP, e os resultados estão ilustrados na Figura 5.70. A condição de não limitação por falta de oxigênio foi evidente, uma vez que o valor mínimo de concentração de OD foi de 42,5% em 27 h de cultivo. O cultivo gerou um valor máximo de  $K$  ( $K_{max}$ ) de  $2,52 \text{ Pa.s}^{-1}$  em 39 h de cultivo, mostrando-se alto comparado aos outros dois sistemas. Nesse tempo de cultivo foi obtido um valor mínimo de índice de escoamento ( $n$ ) de 0,27. Nesse cultivo com o impelidor EEUP, a concentração máxima gerada de AC foi de  $453,3 \text{ mg.L}^{-1}$  em 45 h de cultivo, sendo a maior



produção obtida dentre os três sistemas estudados. O substrato limitante (glicerol) foi totalmente consumido em 33 h de cultivo.

Figura 5.70. Resultados do cultivo B-3 no biorreator tipo tanque agitado equipado com o impelidor EEUP.



A Tabela 5.7 traz um resumo dos resultados obtidos nos três cultivos realizados em duplicata com os três impelidores, bem como uma classificação destes em função dos resultados gerados.

A partir destes resultados pode-se afirmar que, quanto maior a condição de cisalhamento imposta ao caldo, mais lentamente o microrganismo gera o produto e mais lentamente o processo atinge o máximo valor na produção de AC, resultando no prolongamento do cultivo (54 h) e uma diminuição da produtividade em produto, como foi observado no sistema com o impelidor TR.

Também se pode observar que quanto mais cisalhante o sistema, o máximo valor atingido do índice de consistência ocorre em menor tempo (24 h), caso contrário observado

nos sistemas com os impelidor EE. Nesse caso, a transferência de oxigênio deve ser considerada, pois os valores de  $k_La$  foram maiores para o sistema como o impelidor TR, seguido dos sistemas com os impelidores EEUP e EEDP.

**Tabela 5.7. Classificação dos impelidores em função das variáveis obtidas em cada cultivo.**

CLASIFICACÃO DOS IMPELIDORES						
Variáveis	Estimativas			Tempo (h)		
$AC_{max}$ (mg.L <sup>-1</sup> )	453	380	196	45	45	54
	<b>EEUP &gt; TR &gt; EEDP</b>			<b>EEDP ≈ EEUP &lt; TR</b>		
$k_{La_{min}}$ (s <sup>-1</sup> )	0,0216	0,0138	0,008	15	18	27
	<b>TR &gt; EEUP &gt; EEDP</b>			<b>EEDP &lt; TR &lt; EEUP</b>		
$K_{max}$ (Pa.s <sup>n-1</sup> )	2,52	1,94	1,64	24	33	39
	<b>EEUP &gt; TR &gt; EEDP</b>			<b>TR &lt; EEDP &lt; EEUP</b>		
$OD_{min}$ (%)	51,0	42,5	10,4	21	24	27
	<b>TR &gt; EEUP &gt; EEDP</b>			<b>EEDP &lt; TR &lt; EEUP</b>		
$C_G$ (g.L <sup>-1</sup> )	14,66	14,66	14,66	27	30	33
	<b>EEUP ≈ EEDP ≈ TR</b>			<b>EEDP &gt; TR &gt; EEUP</b>		
$(\bar{\epsilon}_T)_g$ (W.kg <sup>-1</sup> )	10,2-11,2	5,2 - 5,6	4,1 - 4,5			
	<b>TR&gt;&gt;&gt;EEUP&gt;EEDP</b>			Variavel		
$\eta_K$ (µm)	10,0-208	31,5-80,4	23,8 -63,4	18	33	39
	<b>EEDP&gt;&gt;&gt;EEUP&gt;TR</b>			<b>TR &lt; EEUP &lt; EEDP</b>		

As maiores concentrações de AC foram obtidas em condições de maior crescimento celular. A melhor condição foi observada para o impelidor EEUP, que favoreceu o crescimento celular ( $K_{max}=2,5$  Pa.s<sup>n</sup>), sendo este controlado pelo aumento constante de % de hifas ramificadas (Figura 5.45 (c)) por um tempo prolongado (39 h) e o acúmulo de AC ( $C_{AC_{max}}=453$  mg.L<sup>-1</sup>) em menor tempo comparado ao TR. Este excelente resultado obtido com o EEUP, provavelmente é devido à alta transferência de oxigênio ( $k_La$ ), associada a um menor

cisalhamento como apresentado na seção 5.2.1., mostrando uma boa homogeneização do meio.

Por outro lado, o impelidor EEDP gerou baixo cisalhamento e pobre transferência de oxigênio pela deficiente homogeneização, mostrando a maior queda de OD % em 21 h, em valores próximos ao crítico. Considerando o crescimento celular representado pelo índice de consistência (K) como uma consequência da adequada transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ), pode-se classificar os valores máximos de K ( $K_{max}$ ) como apresentado na Tabela 5.7, ou seja:

$$K_{max-EEUP} > K_{max-TR} > K_{max-EEDP}$$

Quando o sistema é agitado com o impelidor TR, este desintegra rapidamente os *clumps* gerando HR, mas a produção de AC foi gerada conforme se aumentou a porcentagem em HNR.

Nos cultivos com maiores produções de AC obtidas com os sistemas EEUP e TR, foram observadas dimensões menores das HNR, isto é, estes sistemas se mostraram mais cisalhantes, após 30 h de cultivo para o impelidor TR e após 35 h de cultivo para o EEUP. No sistema com o impelidor EEUP observou-se um aumento de HR, sendo que a maior produção de AC foi acompanhada da fragmentação de *clumps* de forma contínua, gerando proporcionalmente HR e concordando com o surgimento de HNR no caso do impelidor EEUP. Convencionalmente, AC é produzido em biorreatores equipados com o impelidor TR, no entanto, nesta etapa do trabalho foi obtida uma redução do tempo de produção, de 54 h para 45 h, operando com impelidores EE.

A literatura mostra trabalhos que indicam o glicerol como elemento essencial para a biosíntese do AC, pois atua como fonte de carbono e como precursor primário da molécula de AC (TEODORO et al., 2006; ROSA et al., 2005; COSTA e BADINO, 2012). Nesse ponto, o consumo de glicerol foi relativamente mais lento no sistema operando EEUP, sendo consumido totalmente em torno de 33 h de cultivo, 27 h com o impelidor EEDP e 30 h com o impelidor TR. Este resultado deve-se talvez à alta velocidade de absorção do glicerol no sistema EEDP, que gera o acúmulo de intermediários metabólicos que inibem a produção do AC (COSTA e BADINO, 2012), o que teria favorecido o processo utilizando EEUP, reduzindo esta velocidade de absorção acompanhada de uma elevada transferência de oxigênio ao meio e níveis moderados de cisalhamento, afetando positivamente o metabolismo secundário, como relatado por Pinto et al. (2004). Esta transferência de oxigênio teria favorecido ao crescimento constante de hifas novas e por tanto uma maior produção de AC como foi observado nos resultados obtidos de UCH com um maior número de ramificações.

No trabalho de Costa e Badino (2012) foram obtidos resultados semelhantes em cultivos realizados em shaker a baixa temperatura de 20°C, definindo menores velocidades de consumo de glicerol. Os autores explicaram que a redução da velocidade de consumo de glicerol favorece a produção de AC porque reduz os efeitos de repressão/inibição gerados pela fonte de carbono. Considerando que em cultivos com consumo mais lento de glicerol, menos fonte de carbono é utilizada para o metabolismo primário (crescimento celular), há um melhor direcionamento para o metabolismo secundário, isto é, para a produção de AC.

Ainda, Rosa et al. (2005) evidenciaram que cultivos com enriquecimento de oxigênio puro no houve um incremento na produção de AC comparado ao cultivo controle sem enriquecimento, sendo que em condições de limitação por falta de oxigênio foram obtidos maiores valores de K. Estes autores também evidenciaram que consumos lentos de glicerol podem ser responsáveis pela elevada produções de AC em biorreator de bancada, além do maior cisalhamento celular. Os autores também analisaram cultivos para de produção AC considerando um mesmo nível de aeração (0,50 vvm), operando com impelidor TR e variando os níveis de agitação (600, 800 e 1000 rpm), obtendo-se maior produção de AC em cultivos com a maior velocidades de agitação (1000 rpm), isto é, em condições de elevado cisalhamento.

A partir dos resultados obtidos nesta etapa do trabalho, pode-se notar que a produção de AC está relacionada com a fragmentação de *clumps* e HR para os três impelidores e é favorecida pela transferência de oxigênio. De acordo com Pitlik e Townsend (1997) e Rosa et al. (2005), a produção de AC está intimamente relacionada transferência de oxigênio e com as condições de cisalhamento, sugerindo que a tensão aplicada promove a ruptura da parede celular e a liberação de AC do espaço periplásmico para o caldo.

## 6. CONCLUSÕES

- a) Com relação aos valores de  $k_L a$  nos três sistemas estudados para os diferentes fluidos Newtonianos e não-Newtonianos utilizados e nas faixas de  $N$  e  $\phi_{ar}$  testadas, independentemente do tipo de fluido, os maiores valores foram obtidos para o sistema com o impelidor TR, seguido dos impelidores EEUP e EEDP. Para fluidos Newtonianos, as faixas de valores de  $k_L a$  para os sistemas com os impelidores TR e EEUP foram similares, estando os valores obtidos para o sistema com o impelidor EEDP na faixa de 50 a 40% dos valores obtidos para TR e EEUP. Para não-Newtonianos as faixas de valores obtidos para os impelidores EEUP e EEDP foram a torno de 62 e 45% dos valores obtidos para o impelidor TR, respectivamente.
- b) A metodologia proposta no presente trabalho propiciou a obtenção de equações de previsão da velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) para os sistemas com os impelidores TR, EEDP e EEUP em função das condições de operação ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) e das propriedades reológicas ( $K$  e  $n$ ) dos fluidos. Demonstrou-se quantitativamente as menores condições de cisalhamento impostas pelos sistemas providos pelos impelidores de escoamento misto (axial e radial) ou “*Elephant Ear*” (EEDP, EEUP) em comparação ao sistema com o impelidor tradicional turbina Rushton (TR), seguindo a seguinte ordem decrescente de níveis de cisalhamento: TR > EEUP > EEDP.
- c) A partir dos coeficientes obtidos para cada impelidor é possível determinar a  $\dot{\gamma}_m$  em função de parâmetros como  $k_L a$ ,  $N$ ,  $\phi_{ar}$ ,  $K$  e  $n$ , que podem ser obtidos diretamente em cultivos. Foi demonstrado que o impelidor EEDP apresenta menores faixas de velocidades de cisalhamento ao ser utilizado com meios que apresentam características pseudoplásticas com valores superiores de  $K > 1,0 \text{ m Pa.s}^n$  e  $n < 0,28$ , além de fornecer menores valores de transferência de oxigênio, mesmo em altas condições de agitação e aeração, devido ao efeito de afogamento de impelidor (*flooding*). Tais resultados confirmaram que o impelidor EEDP pode ser utilizado em cultivos de células mais sensíveis ao cisalhamento, mas que, no entanto não demandem níveis elevados de transferência de oxigênio, sendo eficientes atuando em sistemas fluidos com comportamento Newtoniano.

- d) Os valores previstos de velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) pelas correlações obtidas neste estudo apresentaram boa concordância com aqueles previstos por correlações apresentadas na literatura utilizando o impelidor TR, validando a metodologia proposta. Além disso, as correlações se mostraram mais completas por considerar um maior número de variáveis envolvidas nas condições de cisalhamento.
- e) O impelidor EEUP mostrou-se eficiente por fornecer adequada transferência de oxigênio com aumentos da agitação em fluidos Newtonianos e não-Newtonianos, associado a um menor cisalhamento em comparação ao impelidor TR. Esta resposta foi verificada mediante imagens digitais, gerando uma excelente dispersão das bolhas em todo fluido além de manter um tamanho de bolha uniforme.
- f) Com relação aos diâmetros médios de bolhas obtidos nos sistemas agitados com os três impelidores avaliados, foi observada uma semelhança entre os diâmetros médios de bolha gerados nos sistemas com os impelidores EEUP e EEDP. Salientando que este último gerou menos bolhas e apresentou uma distribuição não uniforme das bolhas em todo o vaso, além de gerar algumas bolhas com maiores dimensões. Já os diâmetros de bolhas obtidos no sistema com o impelidor TR foram menores em comparação aos impelidores EE.
- g) Com relação ao consumo de potência ou potência dissipada no diferentes sistemas, os impelidores TR e EEDP foram mais afetados negativamente quando aerados em comparação ao impelidor EEUP. Valores do número de potência ( $N_p$ ) obtidos para o impelidor TR foram superiores ( $N_p \approx 7$ ) em comparação aos obtidos para os impelidores EE, para os quais foram obtidos os seguintes valores,  $(N_p)_{EEDP} = 2,1$  a  $2,2$  e  $(N_p)_{EEUP} = 2,7$ , para o regime turbulento de agitação.
- h) Os maiores valores de retenção gasosa (*hold-up*) foram obtidos nos sistemas com os impelidores TR e EEUP, sendo os valores muito menores para o impelidor EEDP.
- i) Analisando os valores de velocidade de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) ao longo dos cultivos de *S. clavuligerus*, verificou-se que os valores estimados de  $\dot{\gamma}_m$  para as três configurações de impelidores seguiu a seguinte ordem:  $TR \geq EEUP \gg EEDP$ . A configuração com o impelidor EEDP gerou baixos níveis de cisalhamento, afetando em menor proporção a morfologia celular de *S. clavuligerus* ao longo dos cultivos. No entanto, em cultivos celulares é desejável se obter altas concentrações celulares. Considerando este parâmetro, a melhor condição de cultivo de *S. clavuligerus* foi obtida para configuração EEUP, onde se observou os maiores valores de K, devido à

- adequada transferência de  $O_2$  aliada a um menor cisalhamento em relação ao sistema com o impelidor TR. Contrariamente, menores valores de K foram obtidos com o impelidor EEDP.
- j) Aumentos na viscosidade afetaram mais negativamente a transferência de oxigênio no impelidor EEDP
  - k) Maiores transferências de oxigênio foram obtidas nos sistemas com os impelidores TR e EEUP em relação ao impelidor EEDP, indicada pelos valores altos de  $k_{La}$ .
  - l) Talvez a eficiência do impelidor EEUP pela alta produção de ácido clavulânico seja produto da queda menos acentuada no declive dos valores de  $k_{La}$  antes das 27h.
  - m) Verificou-se também com os impelidores EE, a formação de novos centros de crescimento e aumento na formação de *clumps* nas primeiras horas de cultivo, sendo estes de pequenas dimensões.
  - n) O critério de classificação morfológica proposto mostrou-se adequado para monitoramento da morfologia durante todos os cultivos.
  - o) Confirmou-se o predomínio de *pellets*, *clumps* e hifas ramificadas logo após a inoculação, indicando que o aparecimento de hifas não ramificadas é produto do cisalhamento.
  - p) A eficiência do padrão de escoamento gerado pelo impelidores EEs foi crucial nas primeiras horas do cultivo, sendo altamente benéfico quando utilizado o impelidor EEUP, o qual apresenta um cisalhamento controlado ao longo do cultivo. Isso é demonstrado na resposta do crescimento dos micélios, adaptando-se ao meio o qual não se mostrou agressivo ao microrganismo. Desta forma, foram obtidos menores valores do UCH e um maior número de pontas, mostrando um ambiente favorável para o microrganismo em função da adequada transferência de oxigênio e acesso a nutrientes.
  - q) Com base nos resultados obtidos, verificou-se também a limitação por falta de oxigênio gerada por uma pobre transferência de oxigênio no sistema com o impelidor EEDP.
  - r) A melhor condição de cultivo em função da produção de ácido clavulânico foi obtida utilizando o impelidor EEUP obtendo  $C_{ACmax}=453$  mg/L e  $K=2,5$  Pa.s<sup>n</sup>. Os resultados sugerem que as hifas isoladas estão diretamente relacionadas com o índice de consistência (K) e com a produção de ácido clavulânico. De acordo com a rápida fragmentação de *clumps* e surgimento de hifas isoladas, conclui-se que o impelidor TR, cisalha mais que os impelidores EE, isto é, pelos tamanhos das HR e HNR que

foram gerados em maiores quantidades e em menores dimensões. Tal fato mostra uma vantagem no uso do impelidor EEUP em cultivos de microrganismos sensíveis ao cisalhamento, e que necessitam de níveis superiores de oxigenação para seu crescimento e atividade, não afetando o desempenho do processo. Essa vantagem está associada ao padrão de escoamento gerado pelo impelidor EEUP.

- s) Os impelidores EEUP mostraram-se como uma alternativa totalmente viável na indústria, minimizando tempo e, por conseguinte, reduzindo os custos de produção nestes tipos de sistemas.



## 7. SUGESTÕES

Para a continuidade deste trabalho sugere-se:

- a) O estudo do tempo de mistura em biorreatores de 5 e 10 L utilizando os diferentes impelidores e operando os sistemas numa faixa mais ampla de agitação (100-1000 rpm).
- b) Estudar os comportamentos dos sistemas em relação à hidrodinâmica e transferência de massa variando na localização dos impelidores EE.
- c) Utilizar sistemas mistos de impelidores (EEs e TR) nas suas mais diversas configurações com dois e três impelidores.
- d) Utilizar fluidos com outras características não Newtonianas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. **Biochemical Engineering**. 2 ed, Tóquio, University of Tokyo Press, 1973.

AMANULLAH, A.; SERRANO-CARREON, L.; CASTRO, B.; GALINDO, E.; NIENOW, A.W. The influence of impeller type in pilot scale Xanthan fermentation. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 57(1), p. 95-108, 1998.

AMANULLAH, A.; JÜSTEN, P.; DAVIES, A.; PAUL, G. C.; NIENOW, A.W. THOMAS, C. R. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5(2), p. 109-114, 2000.

BADINO JR., A. C. **Reologia, Consumo de Potência e Transferência de Oxigênio em Cultivos Descontínuos de *Aspergillus awamori* NRRL 3112**. 1997. 189f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997.

BADINO, A. C.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O. Power input and oxygen transfer in fed- batch penicillin productions process. **Advances in Bioprocess Engineering**, Netherlands Kluwer Academic Publishers, p. 157-162, 1994(b).

BADINO, A. C.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Estimation of the rheology of glucoamylase fermentation broth from the biomass concentration and shear conditions. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n.10, p. 723-726, 1999.

BADINO, A. C.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. Volume 2, Engenharia Bioquímica, Cap. 15: Variação de escala, Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 2001.

BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and another clavans. **Natural Product Reports**, vol. 57, p. 309-333, 1997.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering**. New York, McGraw-Hill, 1986.

BALLOWS, A. **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation, identification, applications**. Ed., New York: Springer-Verlag, v. 1, 1992.

BELMAR-BEINY, M. T.; THOMAS, C. R. Morphology and clavulânico acid production of *Streptomyces clavuligerus*: effect of stirred speed in batch fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37 (5), p. 456-462, 1991.

BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. **Analyst**, v.107, p.131-135, 1982.

BLACKBROUGH, N. **The chemical engineers**. Inst. Chem. Engrs. London, v.58, p. 259, 1972.

BLAŽEJ, M.; JURAŠČIK, M.; ANNUS, J.; MARKOŠ, J. Measurement of mass transfer coefficient in an *airlift* reactor with internal loop using coalescent and non-coalescent liquid media. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 79, p. 1405-1411, 2004.

BOWEN, R. Unraveling the mysteries of shear-sensitive mixing systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 9, p. 55-63, 1986.

CALDERBANK, P. H. Physical rate process in industrial fermentation. Part. I: The interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation. **Chemical Engineering Research & Design**, v.36, p. 443-463, 1958.

CAMPESI, ALEXANDRE, **Avaliação da Velocidade de Cisalhamento Média em Biorreator Convencional tipo Tanque Agitado e Aerado**, 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 2007.

CAMPESI, A.; CERRI, M. O.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Determination of the average shear rate in a stirred and aerated tank bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32 p. 241–248, 2009.

CERRI, M. O.; FUTIWAKI, L, JESUS, C. D. F.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 51-57, 2008.

CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e Transferência de Oxigênio em Três Biorreatores Airlift de Circulação Interna Geometricamente Semelhantes**. 2009. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2009.

CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Shear conditions in clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in stirred tank and airlift bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.35 (6), p. 977-984, 2012.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100(2), p. 14555-14561, 2003.

CHISTI, Y. Animal-cell damage in sparged bioreactors. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 420-432, 2000.

CHISTI, Y. Hydrodynamic damage to animal cells. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 21, p. 67-110, 2001.

COLLINGNON, M. L.; DELAFOSSE, A.; CRINE, M.; TOYE, D. Axial impeller selection for anchorage dependent animal cell culture in stirred bioreactors: Methodology based on the impeller comparison at just-suspended speed of rotation. **Chemical Engineering Science**, v. 65, p. 5929-5941, 2010.

CONTRERAS, A.; GARCÍA, F.; MOLINA, E.; MERCHUK, J. C. Influence of sparger on energy dissipation, shear rate, and mass transfer in a concentric-tube airlift bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p. 820-830, 1999.

COOPER, C. M.; FERNSTROM, G. A.; MILLER, S.A. Performance of agitated gas-liquid contactors. **Industrial Engineering Chemistry**. v. 36(6), p. 504-509, 1944.

COSTA, C. L. L.; BADINO, A. C. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures without and with glycerol pulses under different temperature conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v.69, p. 1-7, 2012.

COX, P. W.; PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. **Microbiology**, v. 144, p. 817-827, 1998.

DEWAN, A.; BUWA, V. DURST, F. Performance optimizations of grid disc impellers for mixing of single-phase flows in a stirred vessel, Trans. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 84 (A8), p. 691–702. 2006.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. **Biochemical Engineering Journal**. v. 1, p.1–10, 1998.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p.2489–2501, 2004.

GARCÍA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 153–176, 2009.

GAVRILESCU, M.; ROMAN, R.; EFIMOV, V. The volumetric oxygen mass transfer coefficient in antibiotic biosynthesis liquids. **Acta Biotechnologica**, v. 13(1). v. 1, p.59-79. 1993.

GOGATE, P. R.; BEENACKERS A. A. M.; PANDIT, A. B. Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, p. 109–144, 2000.

GURA, E.; RAU, U. Comparison of agitators for the production of branched  $\beta$ -1,3-D-glucans by *Schizophyllum commune*. **Journal of Biotechnology**, v. 27(2), p. 193-201, 1993.

HO, C. S.; OLDSHUE, J. Y. (Eds.) **Biotechnology Processes: Scale-up and Mixing**. American Institute of Chemical Engineers, New York, p. 72–81, 1987.

IVES, P.R.; BUSHELL, M .E. Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, v. 143, p. 3573-3579, 1997.

JUNKER, B. H.; STANIK, M. BARNA, C. SALMON, E. Influence of impeller type on power input in fermentation vessels. **Bioprocess Engineering**, v.18, p. 401-412, 1998.

JÜSTEN, P.; PAUL, G. C.; NIENOW, A. W.; THOMAS, C. R. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, p. 672-684. 1996.

KELLY, W.; GIGAS, B. Using CFD to predict the behavior of power law fluids near axial flow impellers operating in the transitional flow regime. **Chemical Engineering Science**, v. 58, p. 2141-2152, 2003.

KIERAN, P. M.; MALONE, D. M.; MACLOUGHLIN, P. M.. Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. On:influence of stress on cell growth and product formation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 67, p. 139-177, 2006.

KOLMOGOROV, A. N. **The local structure of turbulence in incompressible viscous fluid for very large Reynolds numbers**, Compt. Rend. (Dokl.) Acad. Sci. URSS, v.30, p. 301-305, 1941(a).

KOLMOGOROV, A. N. **Dissipation of Energy in the locally isotropic turbulence**. Compt. Rend. (Dokl.) Acad. Sci. URSS, v.32, p. 16-18, 1941(b).

KRESTA, M.; BRODKEY, R.S. **Turbulence in mixing applications**. in: Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V.A., Kresta, S.M. (Eds.), *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice*, ch. 2. Wiley-Interscience, New York, p. 19–87, 2003.

KUMAR, B.; PATEL, K. A.; RAO, A. R. Mass transfer and rate in baffled surface aerator. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28(2), p. 502-506, 2011.

LINEK, V.; VACEK, V.; BENEŠ, P. A critical and Experimental of the correct use of the dynamic methods for the determination of oxygen transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte solutions and viscous liquids. **The chemical Engineering Journal**, v. 34, p. 11-34, 1987.

LINEK, V.; MOUCHA, T.; DOUSOVÁ, M.; SINKULE, J. Dynamic pressure of  $k_{La}$  measurement in large-scale bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 1406-1412, 1989.

MAKAGIANSAR, H.Y.; SHAMLOU, P. A.; THOMAS, C.R.; LILLY, M.D. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. **Bioprocess Engineering**, v. 9, p. 83-90, 1993.

MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. **Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics**, v. 11, p. 431-441, 1963.

MARTIN M.; MONTES, F. J. GALÁN M. M. Mass transfer rates from bubbles in stirred tanks operating with viscous fluids. **Chemical Engineering Science**, v.65, p. 3814-3824. 2010.

MARTIN, I.; WENDT, D.; HERBERER, M. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends Biotechnology**, v. 22 (2), p. 80-86, 2004.

MAYER A. F.; DECKWER, W. D. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 41–46, 1996.

MCFARLANE, C. M.; NIENOW, A. W. Studies of high solidity ratio hydrofoil impellers for aerated bioreactors. 1. Review, **Biotechnology Progress**, v.11, p. 601-607, 1995.

MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. **Practical Fermentation Technology**. Strathclyde Fermentation Centre, Strathclyde University, UK John Wiley & Sons, Ltd. p. 25-30, 2008.

MEIJER, J. J.; HOOPEN, T.; LUYBEN, K. CH. A. M.; LIBBENGA, K. R. Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cells: a literature survey. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p. 234–238, 1993.

MENISHER, T.; METGHALCHI, M.; GUTOFF, B. Mixing studies in bioreactors. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p.115-120, 2000.

METZNER, A. B., OTTO, R. E. Agitation of non-Newtonian fluids. A. I. **Chemical Engineering Journal**, v. 3(1), p. 3-10, 1957.

MIRRO, R.; VOLL, K., **Which impeller is right for your cell line?** A guide to impeller selection for stirred-tank bioreactors. Reprinted with permission from BioProcess International, v. 7 (1), p. 52-57, 2009.

MITSUYASU, O. KUWAJIMA, T. SATOH, M. Preferential and High-yield production of a Cephamycin C by Dissolved Oxygen Controlled Fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, N 4, p. 292-296. 1992.

MOO-YOUNG, M.; HALARD, B.; ALLEN, D.; G.; BURREL, R.; KAWASE, Y. Oxygen transfer to mycelia fermentation broths in an airlift fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**, 30, 746-753, 1987.

NIENOW, A. W. On impeller circulation and mixing effectiveness in the turbulent flow regime. **Chemical Engineering Science**, v. 52, p. 2557-2565, 1997.

NIENOW, A. W.; BUJALSKI, W. The versatility of up-pumping hydrofoil agitators. **Chemical Engineering Research & Design**. v.82(9), p.1073-1081, 2004.

NIENOW, A. W. Reactor engineering in large scale animal cell culture. **Cytotechnology**, v. 50, p.9-33, 2006.

NIENOW, A. W. Stirred bioreactor engineering for production scale, low viscosity aerobic fermentations: Part 1. **Technical paper**, Merrick & Company, 2012.

NISHIKAWA, M.; KATO, H.; HASHIMOTO, K. Heat Transfer in Aerated Tower Filled with Non-Newtonian Liquid. **Industrial Engineering Chemical Process Design and Development**, v.16, p.133-137, 1977.

NOCENTINI, M.; FAGNER, D.; PASQUALI, G.; MAGELLI, F. Gas-liquid mass transfer and hold-up in vessels stirred with multiple Rushton turbines: water and water-glycerol solutions. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, p. 16-26, 1993.

OBENG, V.A., KRESTA, S.M. (Eds.). **Handbook of Industrial Mixing**: Science and Practice, ch. 2. Wiley-Interscience, New York, pp. 19–87.

OH, S. K. W.; NIENOW, A. W.; AL-RUBEAI, M. Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. **Journal of Biotechnology**, v.22, p. 245-270. 1992.

OLMOS, E.; MCHMOOD, N.; HAJ, H.L.; GEORGEN, J. L.; FICK, M.; DELAUNAY, S. Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.36, p.259–272, 2013.

OZCENGIZ, G.; DEMAIN, A. L. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 287–311, 2013.

PAMBOUKIAN, C. R. D.; GUIMARÃES, L. M.; FACCIOTTI, M. C. R. Applications of Image Analysis in the Characterization of *Streptomyces olindensis* in Submerged Culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p. 17-21, 2002.

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Produção do Antitumoral Retamicina por *Streptomyces olindensis* em Processos Descontínuo Alimentado e Contínuo**. 277 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p.189–259, 2004.

PAVLOV, A.; GEORGIEV, M. I.; ILIEVA, M. Production of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension in bioreactor: effect of dissolved oxygen concentration and agitation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p.389–392, 2005.

PÉREZ, J. A. S.; PORCEL, E. M. R.; LÓPEZ, J. L. C.; SEVILLA, J. M. F.; CHISTI, Y. Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors, Short communication. **Chemical Engineering Journal**, v. 124, p. 1-5, 2006.

PINTO, L. S.; VIEIRA, L. M.; PONDS, M. N.; FONSECA, M.M. R.; MENEZES, J.C. **Monitorização de processos biológicos**: III. Análises digital de imagem. Boletim de Biotecnología, v. 70, p. 12-21, 2001.

PITLIK, J.; TOWNSEND, C. A. The fate of [2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>, 1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-D,L-glycerate in clavulanic acid biosynthesis. **Chemical Communications**, p. 225-226, 1997.



PROSSER, J. I.; TOUGH, A. J. Growth mechanics and growth kinetics of filamentous microorganisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 10, p. 253-274, 1991.

PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p.25–30, 2005.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**: Produção de enzimas e engenharia das fermentações. Pelotas: Universitária/UFPel, v.3, 2000.

ROBERTSON, B.; ULBRECHT, J. L. Measurement of shear rate on an agitator in a fermentation broth. In: Ho, C.S., Oldshue, J.Y. (Eds.), **Biotechnology Processes, Scale-Up and Mixing**. American Institute of Chemical Engineers, New York, p. 31–35. 1987.

ROLLINS, M. J.; JENSEN, S. E.; WOLFE, S.; WESTLAKE, D. W. S. Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p. 357-364, 1988.

ROLLINS, M. J.; JENSEN, S. E.; WOLFE, S.; WESTLAKE, D. W. S. Oxygen derepresses deacetoxycephalosporin C synthase and increases the conversion of penicillin N to cephamycin C in *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 40 – 45, 1990.

ROLLINS, M. J.; JENSEN, S. E. WESTLAKE, D. W. S. Effect of dissolved oxygen level on ACV synthetase synthesis and activity during growth of *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 83-88, 1991.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 318-325, 1984.

ROSA, J., C.; BAPTISTA N. A.; HOKKA, C, O; BADINO A. C. Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, p. 99–104, 2005.

RUSHTON, J. H.; COSTICH, E. W.; EVERETT, H. J. Power characteristics of mixing impellers. Part I. **Chemical Engineering Progress**, v. 46, p. 395-404, 1950.

RUSHTON, J. H.; COSTICH, E. W.; EVERETT, H. J. Power characteristics of mixing impellers. Part II. **Chemical Engineering Progress**, v. 46 (9), p. 467-476, 1950.

RYU, D. Y.; HUMPHREY, A. E. Reassessment of oxygen transfer rate in antibiotics fermentation. **Journal of Fermentation Technology**, v. 50, p. 424-431, 1972.

SANDADI, S.; PEDERSEN, H.; BOWERS, J.; RENDEIRO, D. A. Comprehensive comparison of mixing, mass transfer, Chinese hamster ovary cell growth, and antibody production using Rushton turbine and marine impellers. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 819-832, 2011.

SASSI G. RUGGERI B. SPECCHIA V.; GIANETTO A. Citric Acid Production by *A. niger* with Banana Extract. **Bioresource Technology**, v. 37. P. 259-269. 1991.

SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. Volume 2, Engenharia Bioquímica, Cap.14: Agitação e Aeração em Biorreatores, Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001.

SIECK, J. B.; CORDES, T.; BUDACH, W. E.; RHIEL, M. H. Development of a scale down model of hydrodynamic stress to study the performance of an industrial CHO cell line under simulated production scale bioreactor conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 164, p. 41-49, 2013.

SIMMONS, M. J. H.; ZHU, H.; BUJALSKI, W.; HEWITT, C. J.; NIENOW, A. W. Mixing in a model bioreactor using agitators with a high solidity a ratio and deep blades. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 85(A5), p. 551–559, 2007.

SZALAI, E. S.; ARRATIA, P.; JOHNSON, K.; MUZZIO, F. J. Mixing analysis in a tank stirred with Ekato Intermig® impellers. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p.3793 – 3805, 2004.

TEODORO, J. C.; BAPTISTA-NETO A.; CRUZ-HERNANDEZ, I. L.; HOKKA, C.O.; BADINO, A. C. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 450-455. 2006.

TORRESAM, D. G. **Desenvolvimento de Sistema para Monitoramento e Controle de Biorreator *Airlift* de Escala de Bancada**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 2013.

VENKAT, R. V.; CHALMERS, J. J. Characterization of agitation environments in 250 ml spinner vessel, 3L, and 20 L reactor vessels used for animal cell microcarrier culture. **Cytotechnology**, v. 22, p. 95-102. 1996.

WHANG, S. J.; ZHONG, J. J. Comparison of O<sub>2</sub> transfer characteristics between a new centrifugal impeller and a flat-bladed turbine impeller. **Biotechnology Techniques**, v. 11 (10), p. 763–767, 1997.

WICHTERLE, K. Shear rates on turbine impeller blades. **Chemical Engineering Communications**, v. 26, p. 25-32, 1984.

ZHU, Y.; BANDOPADHAYAY, P. C.; WU, J. Measurement of gas –liquid mass transfer in an agitated vessel — a comparison between different impellers. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 34, p. 579–84, 2001.

ZHU, H.; NIENOW, A. W.; BUJALSKI, W.; SIMMONS, M. J. H. Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping ‘Elephant Ear’ agitator: power, hold-up and aerated flow field measurements. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 87, p. 307–317, 2009.

ZLOKARNIK, M. Sorption characteristics for gas-liquid contacting in mixing vessels. In: GHOSE, T. K.; FIECHTER, A.; BLAKERBROUGH, N.; **Advances in Biochemical Engineering**, v. 8, p. 133-151, 1978.

**Fontes on-line:**

<http://www.bakker.org/cfm/webdoc18.htm>, proceedings of the 10th European Conference on Mixing, in a paper titled "The Use of Large Eddy Simulation to Study Stirred Vessel Hydrodynamics", Rushton turbine surface vortices. Acesso no 28 de março do 2011.

[http://en.wikipedia.org/wiki/Chemical\\_reactor](http://en.wikipedia.org/wiki/Chemical_reactor). Acesso no 13 de maio do 2013.

[http://en.wikipedia.org/wiki/Continuous\\_stirred-tank\\_reactor](http://en.wikipedia.org/wiki/Continuous_stirred-tank_reactor). Acesso no 13 de maio do 2013.

<http://www.thermopedia.com/content/549/>. SMITH, J.M., Agitation devices, DOI: 10.1615/AtoZ.a.agitation\_devices. Acesso no 11 de abril do 2013.

[http://www.agimix.pl/agitators\\_imp.php](http://www.agimix.pl/agitators_imp.php). Acesso no 1 de julho do 2013.

**MACHU PICCHU (Perú), meu orgulho!**

