



**Universidade do Algarve**  
**Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais**

**Caracterização reológica e hidrodinâmica de  
uma suspensão de células vegetais de  
*Centaurea calcitrapa* em reactor biológico**

**Sara Isabel Cacheira Raposo**

**Faro**  
**2003**

**À Maria**



**Universidade do Algarve**

**Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais**

**Caracterização reológica e hidrodinâmica de  
uma suspensão de células vegetais de  
*Centaurea calcitrapa* em reactor biológico**

**Sara Isabel Cacheira Raposo**

**Faro  
2003**



**Universidade do Algarve**

**Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais**

**Caracterização reológica e hidrodinâmica de  
uma suspensão de células vegetais de  
*Centaurea calcitrapa* em reactor biológico**

**Dissertação apresentada à  
Universidade do Algarve para  
obtenção do grau de Doutor no  
ramo das Ciências Biotecnológicas,  
especialidade Biotecnologia.**

**Sara Isabel Cacheira Raposo**

**Faro  
2003**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, à Professora Doutora Maria Emília Lima Costa pelo apoio e orientação que me tem dado ao longo destes anos. Assim como, pela leitura atenta e crítica desta dissertação, sem esquecer as salutares discussões que tivemos. Não posso deixar de agradecer, a preciosa ajuda que me deu na disciplina de Tecnologia de Biorreactores.

À Professora Doutora Maria Salomé Pais, por me ter recebido no seu Laboratório e integrado na sua equipa de trabalho, pela disponibilidade que me demonstrou e todo o seu apoio.

Agradeço à Doutora Patricia Kieran por toda a amizade, facilidades e apoio demonstrado nos três meses em que estive no Department of Chemical Engineering, da University College Dublin. Assim como, a sua disponibilidade na discussão dos procedimentos experimentais e resultados obtidos.

Ao Doutor Brian Glennon pela disponibilidade demonstrada para discussão dos resultados obtidos, quando estive no Department of Chemical Engineering, da University College Dublin.

Ao Dr. Paul Jeffers pelo entusiasmo com que sempre me acompanhou no desenvolvimento de parte deste trabalho. Sem esquecer a amizade e as salutares discussões, que tivemos nos três “longos” meses.

À Patricia Connolly, pelo apoio técnico nas “corridas” do Jacto Turbulento.

À Doutora Carla Nunes pela leitura atenta e crítica desta dissertação.

Ao Laboratório E<sub>6</sub>, à Marta, Ana Luísa, Roberto e Mafalda pelo bom ambiente de trabalho. Ao Roberto, em particular, por tomar conta das “bichinhas”, no último ano.

Aos colegas da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais pela amizade demonstrada ao longo destes anos, principalmente à Isabel Barrote, que também está neste “barco” e me acompanhou e apoiou nos bons e maus momentos.

À minha colega de gabinete, Graça Miguel, pelos fins de tarde em que pusemos a conversa em dia.

A toda a equipa do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, que me proporcionaram um bom ambiente de trabalho, me ajudaram a resolver alguns “problemas” e me fizeram sentir parte integrante da equipa. Em especial, gostaria de agradecer à Dora e à Mónica pela força que me deram, mesmo à distância, quando estive na Irlanda. E em especial ao “Vasquinho”, que nos proporcionou bons momentos de disposição. Não posso esquecer a Mané pelo seu carinho e pelas suas “anedotas”.

À Susan Rishell pelo apoio, amizade e “grandes” conversas de fins de tarde.

Ao gabinete dos pós-graduados do Department of Chemical Engineering, da University College Dublin, por todo o apoio e boa camaradagem com que me receberam.

Aos meus pais, por todo apoio e confiança que sempre depositaram em mim e pela ajuda preciosa que têm dado.

A toda a minha família, sem referir ninguém, pois todos tiveram um papel na execução desta dissertação.

Ao Raúl, vai um obrigado muito especial, pelo ânimo, incentivo e força que sempre me transmitiu. Sem esquecer, a paciência com que aturou os meus maus humores e as minhas “ausências”.

À Maria pelas alegrias que me dá.

À Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve por me ter concedido condições para a realização desta dissertação.

Ao Programa PRODEP, inicialmente pela Medida 5 - Acção 5.2 - Formação Avançada de Docentes do Ensino Superior (Concurso Público nº3/98), e, presentemente pela Acção 5.3 - Formação Avançada de Docentes do Ensino Superior (Concurso Público nº2/2000) por me ter proporcionado a dispensa da actividade docente para a execução do trabalho prático e escrita da dissertação.

Ao Department of Chemical Engineering, da University College Dublin por me ter facilitado a execução de uma parte importante do meu trabalho experimental.

Agradeço ao ICAT por me ter recebido na sua Instituição possibilitando-me a realização de mais uma parte do trabalho experimental e todas as facilidades concedidas.

## ABSTRACT

Hydrodynamic stress forces were assessed in *Centaurea calcitrapa* cells, both throughout the growth cycle in mechanically stirred biorreactor, and under precisely defined stress conditions (turbulent jet). This cell suspension culture was also characterized in terms of growth kinetics, rheology and morphology.

The optimum carbon source concentration for the production of biomass and proteolytic enzymes was determined by experiments carried out in erlenmeyer flasks, and shown to be 30 g/L glucose. The rheologic characterization of the culture has shown a pseudoplastic behavior throughout the whole growth cycle. Morphologic studies have shown that the average diameter of the cell aggregates decreased throughout the growth cycle, varying between 190 and 246  $\mu\text{m}$ .

Experiments to determine the sensitivity of *Centaurea calcitrapa* cells to hydrodynamic stress were carried out in a 2-L mechanically stirred biorreactor equipped with a pitched-blade impeller. In one set of experiments, the effect of stirring rate on the production of biomass and proteolytic enzymes was studied. It was found that the suspended cells are sensitive to shear forces at 250 rpm stirring rate. In another set of experiments, the behavior of *Centaurea calcitrapa* suspension cultures was studied at different  $K_L a$  values. In this case the production of biomass was optimized with a  $K_L a$  value of  $19.85 \text{ h}^{-1}$ . Rheologic characterization of the cell suspension cultures was carried out in both sets of experiments, and once again pseudoplastic behavior was observed throughout the whole growth cycle.

The hydrodynamic stress to which suspended *Centaurea calcitrapa* cells are subjected was further assessed using the turbulent jet system, where the cells are exposed to intense and well defined shear forces. A decrease with exposure time was observed in both cell viability and biomass concentration. Also, the largest aggregates were those which were preferentially broken.

In all experiments, in mechanically stirred biorreactor as well as in turbulent jet, the average dissipated energy was shown to be an adequate response indicator to assess cell damage in *Centaurea calcitrapa* cell suspensions.

*Centaurea calcitrapa* cell suspension culture was also carried out in a biorreactor where agitation and aeration are performed by a porous membrane. Cells cultivated in this system did not show evidence of hydrodynamic stress damage. No reduction in cell viability was observed. This type of biorreactor was shown to be adequate to cultivate cell suspensions which are sensitive to hydrodynamic stress.

The production in mechanically stirred biological reactor was scaled-up from 2 to 7 L. Two scale-up criteria were used: Constant  $K_La$  and constant impeller tip speed. In this study, the use of two types of air sparger, porous and L-shaped, and two types of stirrers, marine impeller and Rushton turbine, was studied. The results obtained applying both scale-up criteria show that for low stirring rates (100 rpm), the best conditions for cell growth and proteolytic enzyme production were obtained with a porous air sparger and one marine impeller. For high stirring rates (250 rpm), the use of two Rushton turbines and the porous air sparger were the best conditions for cell growth and proteolytic enzyme production.

The results obtained in this study suggest that suspended *C. calcitrapa* cells are sensitive to shear stress forces which are present when they are grown in biological reactors of varying geometry, depending on the type and number of impellers, and the stirring rate.

The reason why *Centaurea calcitrapa* cell suspensions were chosen as a model for this study is because these cells produce proteinases with milk-clotting activity, which are of interest to the dairy industry. The growth of these cells in suspension cultures can be considered an alternative source of plant-derived milk-clotting enzymes.

## RESUMO

O stresse hidrodinâmico foi avaliado nas células de *Centaurea calcitrapa* quando expostas a forças de tensão hidrodinâmica durante o seu ciclo de crescimento (ensaios de longa duração), em reactor biológico mecanicamente agitado, e a forças de tensão intensas e bem definidas no sistema de jacto turbulento (ensaios de curta duração). Esta suspensão de células em cultura foi também caracterizada em termos cinéticos, reológicos e morfológicos.

Em Erlenmeyer, determinou-se que a concentração óptima de fonte de carbono, para a produção de biomassa e de enzimas com actividade proteolítica era 30 g/L de glucose. A caracterização reológica permitiu observar que a cultura apresenta um comportamento pseudoplástico, ao longo de todo o ciclo de crescimento. Morfologicamente observou-se que, o diâmetro médio dos agregados celulares diminui ao longo do ciclo de crescimento, variando entre 190 e 246  $\mu\text{m}$ .

Os ensaios de sensibilidade ao stresse hidrodinâmico das células de *Centaurea calcitrapa* decorreram em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado com um agitador de pás inclinadas. Num dos ensaios, testou-se o efeito da agitação, na produção de biomassa e enzimas com actividade proteolítica. Constatou-se que as células em suspensão eram sensíveis às forças de tensão para velocidades de agitação de 250 rpm. Num segundo ensaio, testou-se o comportamento das culturas de *Centaurea calcitrapa* a diferentes  $K_L a$ . Neste caso, a produção de biomassa foi otimizada com um  $K_L a$  de  $19,85 \text{ h}^{-1}$ . Em ambos os ensaios, as culturas foram caracterizadas reologicamente, apresentando igualmente um comportamento pseudoplástico, ao longo de todo o ciclo de crescimento.

O stresse hidrodinâmico nas células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* foi ainda avaliado quando estas são aplicadas no sistema de fluxo de jacto turbulento, em que as células são expostas a forças de tensão intensas e bem definidas. Observou-se a diminuição da viabilidade celular e da biomassa com o tempo de exposição. Também os agregados de maiores dimensões são os preferencialmente quebrados.

Tanto nos ensaios efectuados em biorreactor mecanicamente agitado, como em jacto turbulento, a energia dissipada média mostrou ser um indicador de resposta adequado para avaliar os danos celulares nas suspensões de *Centaurea calcitrapa*.

A cultura de *Centaurea calcitrapa* foi ainda cultivada num reactor biológico em que a agitação e o arejamento são promovidos por intermédio de uma membrana porosa. As células cultivadas neste sistema não apresentaram sinais de sofrerem stresse hidrodinâmico. Não se observou redução da viabilidade celular. Este tipo de reactor

biológico mostrou-se adequado para o cultivo de suspensões sensíveis ao stresse hidrodinâmico.

Procedeu-se ao aumento de escala de produção, de 2 para 7 L, em reactor biológico mecanicamente agitado. Para o aumento de escala utilizaram-se dois critérios,  $K_La$  constante e velocidade da ponta do agitador constante. Neste estudo, estudaram-se dois tipos de dispersores de ar, poroso e com a conformação em L e, dois tipos de turbinas, em hélice e de Rushton. Com base em ambos os critérios, verificou-se que para baixas velocidades de agitação (100 rpm), as melhores condições para o crescimento celular e produção de enzimas com actividade proteolítica foram reunidas com o dispersor poroso e um agitador em hélice. Para elevadas velocidades de agitação (250 rpm), o sistema de duas turbinas de Rushton e um dispersor poroso proporcionaram melhores condições para o crescimento celular e produção de enzimas com actividade proteolítica.

Os resultados obtidos deste estudo sugerem que as células em suspensão de *C. calcitrapa* são sensíveis às forças de tensão, provocadas pelo cultivo em reactores biológicos de diferentes geometrias, dependentes do tipo de agitador, do número de agitadores e da velocidade de agitação.

O modelo seleccionado para este estudo foi a suspensão de células de *Centaurea calcitrapa*, por apresentar proteinases com actividade coagulante do leite, com interesse para a indústria de lacticínios. A cultura destas células poderá apresentar-se como uma fonte alternativa de obtenção de enzimas coagulantes vegetais.

## NOMENCLATURA E ABREVIATURAS

a	Área interfacial de contacto do gás com o meio líquido (m <sup>2</sup> )
Actividade rel.	Actividade relativa
Abs280nm	Absorvância a 280 nm
Agit.	Agitação (rpm)
Arej.	Arejamento (vvm)
BSA	Soro de albumina bovina purificada
C <sub>E</sub>	Concentração de oxigénio saturante
C <sub>L</sub>	Concentração de oxigénio dissolvido
C <sub>g</sub>	Constante (0,0057), da energia dissipada média no Jacto Turbulento
CT	Contagem total (-)
d <sub>0</sub>	Diâmetro do bocal do Jacto Turbulento (mm)
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
D <sub>i</sub>	Diâmetro do agitador (m)
D <sub>T</sub>	Diâmetro do vaso (m)
D <sub>99</sub>	Diâmetro equivalente máximo (µm)
EDTA	Dietilaminoetil
FBRM	<i>Focused Beam Reflectance Measurement</i>
FDA	Diacetato de Fluoresceína
FITC	Isotiacianato de fluoresceína
H <sub>i</sub>	Espaçamento entre dois agitadores (m)
H <sub>L</sub>	Altura do líquido (m)
K	Índice de consistência do fluido (Ns <sup>n</sup> m <sup>-2</sup> )
k	Constante da equação de Calderbank & Moo-Young (1959)
K <sub>La</sub>	Coefficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio (h <sup>-1</sup> )
KIN	Quinetina
K <sub>m</sub>	Constante de saturação do Modelo de Monod (g/L)
k <sub>d</sub>	Taxa específica de morte celular (s <sup>-1</sup> ou dia <sup>-1</sup> )
k <sub>v</sub> □	Coefficiente de absorção do oxigénio (mol/m <sup>3</sup> .s.atm)
ME	Mercaptoetanol
n	Índice de comportamento do fluido (-)
N	Velocidade de agitação (rpm ou s <sup>-1</sup> )
NAA	Ácido naftalenoacético
N <sub>P</sub>	Número de potência (-)
ns	Número de moles de sulfito de sódio
OTR	Taxa de transferência de oxigénio

P*	Pressão parcial do oxigénio em equilíbrio com a fase líquida (atm)
P	Pressão parcial do oxigénio na fase gasosa no líquido (atm)
p.a.	Pró-análise
PF	Peso Fresco (g/L)
PS	Peso Seco (g/L)
PS <sub>máx</sub>	Peso Seco máximo (g/L)
PS <sub>inic</sub>	Peso Seco inicial (g/L)
p/v	Peso / volume (concentração)
P/V	Potência volumétrica (W/m <sup>3</sup> )
P <sub>g</sub> /V	Potência volumétrica do sistema arejado (W/m <sup>3</sup> )
PF/PS	Peso fresco / peso seco
Produt.	Produtividade de biomassa (g PS/L.dia)
q <sub>s</sub>	Taxa específica de consumo de glucose (g glucose/g PS. dia)
Re	Número de Reynolds
S	Concentração de substrato (g/L)
S <sub>0</sub>	Concentração inicial de substrato (g/L)
SH	Meio de cultura Shenk & Hildbrandt
subs.	Substrato
t	Tempo
TCA	Ácido tricloroacético
TME	Tampão Tris 50 mM, mercaptoetanol 3 mM, EDTA 1mM
TR	Taxa respiratória (μmol O <sub>2</sub> /L.min)
TRE	Taxa respiratória específica ((μmol O <sub>2</sub> / g PS.min)
Temp	Temperatura
t <sub>d</sub>	Tempo de duplicação (h ou dia)
Δt	Varição de tempo
U	Unidade enzimática
UV	Ultravioleta
U <sub>0</sub>	Velocidade de saída do bocal do Jacto Turbulento
V	Volume (L)
V <sub>L</sub>	Volume de líquido (L)
v/v	Volume / volume (concentração)
vvm	Volume de arejamento por volume de reactor e por minuto
X	Concentração de biomassa (g/L)
x	Concentração de biomassa (g/L)
X <sub>0</sub>	Concentração de biomassa inicial (g/L)

$Y_{X/S}$	Coeficiente de rendimento aparente de biomassa em função da fonte de carbono consumida (g PS / g subs.)
$Y_{X/O_2}$	Coeficiente de rendimento de biomassa em função do consumo de oxigénio (g PS/ g O <sub>2</sub> )
$\mu_a$	Viscosidade aparente (Nsm <sup>-2</sup> )
$\mu_g$	Taxa específica de crescimento (h <sup>-1</sup> ou dia <sup>-1</sup> )
$\mu_{max}$	Taxa específica de crescimento máxima (h <sup>-1</sup> ou dia <sup>-1</sup> )
$\lambda$	Comprimento de onda (nm)
$\rho$	Massa específica (Kgm <sup>-3</sup> )
$\tau$	Tensão de corte (Nm <sup>-2</sup> )
$\gamma$	Velocidade de corte (s <sup>-1</sup> )
$\gamma_{MÉDIA}$	Velocidade de corte média (s <sup>-1</sup> )
$v_i$	Velocidade da ponta do agitador (m/s)
$\frac{v_i}{\epsilon}$	Energia dissipada média (KW/Kg)

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x

## **CAPÍTULO 1 – Introdução e Objectivos**

1.1. INTRODUÇÃO	2
1.2. OBJECTIVOS	7
1.3. REFERÊNCIAS	8

## **CAPÍTULO 2 – Caracterização reológica e hidrodinâmica de uma cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em reactor biológico mecanicamente agitado**

RESUMO	11
ABSTRACT	12
2.1. INTRODUÇÃO	13
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.2.1. Estabelecimento e manutenção das culturas de células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i> em Erlenmeyer	18
2.2.2. Crescimento das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i> em sistema descontínuo - Erlenmeyer	19
2.2.2.1. Optimização da fonte de carbono	19
2.2.2.2. Aplicação do modelo não estruturado de Monod	19
2.2.3. Caracterização morfológica das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i> , crescidas em Erlenmeyer	20
2.2.3.1. Análise digital de imagem	21
2.2.3.2. <i>Focused Beam Reflectance Measurement</i> (FBRM)	21
2.2.4. Condições de produção de biomassa em biorreactor biológico mecanicamente agitado	23
2.2.5. Determinação dos parâmetros de crescimento da cultura de células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i>	25
2.2.5.1. Peso fresco e peso seco	25
2.2.5.2. Taxa respiratória	25
2.2.5.3. Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação	25
2.2.5.4. Coeficiente aparente de rendimento de biomassa	26
2.2.5.5. Produtividade de biomassa	27
2.2.5.6. Condutividade	27
2.2.6. Transferência de massa de oxigénio	28
2.2.6.1. Método dinâmico	28

2.2.7. Determinação da viabilidade celular	29
2.2.7.1. Método de exclusão com corante	29
2.2.7.2. Coloração com Diacetato de Fluoresceína (Teste FDA)	29
2.2.8. Métodos analíticos	30
2.2.8.1. Extração enzimática	30
2.2.8.2. Quantificação da actividade proteolítica	31
2.2.8.3. Quantificação da proteína intracelular	32
2.2.8.4. Quantificação dos açúcares redutores no meio de cultura	33
2.2.8.5. Quantificação dos fenóis excretados para o meio de cultura	33
2.2.8.6. Quantificação dos nitratos no meio de cultura	34
2.2.8.7. Quantificação do fósforo inorgânico no meio de cultura	34
2.2.9. Determinação dos tempos de mistura	35
2.2.10. Caracterização reológica das células em cultura de <i>Centaurea calcitrapa</i>	35
2.2.11. Parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico	36
2.2.11.1. Velocidade da ponta do agitador ( <i>impeller tip speed</i> )	36
2.2.11.2. Potência volumétrica do agitador	36
2.2.11.3. Velocidade de corte média e máxima	37
2.2.11.4. Energia dissipada média	38
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
2.3.1. Crescimento das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i> em sistema descontínuo – Erlenmeyer	39
2.3.1.1. Influência da concentração da fonte de carbono no crescimento das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i>	39
2.3.1.1.1. Perfil de crescimento	39
2.3.1.1.2. Aplicação do modelo de Monod	43
2.3.1.1.3. A Influência da fonte de carbono na actividade proteolítica e na produção fenólica das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i>	45
2.3.1.2. Caracterização reológica da cultura de <i>Centaurea calcitrapa</i> cultivada em Erlenmeyer	49
2.3.1.3. Caracterização morfológica das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i> , cultivadas em Erlenmeyer	53
2.3.1.3.1. Análise digital de imagem	53
2.3.1.3.2. <i>Focused Beam Reflectance Measurement</i> (FBRM)	60
2.3.1.3.3. Relação entre a análise digital de imagem e o FBRM	64
2.3.2. Crescimento das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i> em sistema descontínuo – Reactor Biológico Mecanicamente Agitado	68
2.3.2.1. Transferência de massa de oxigénio inicial	68
2.3.2.2. Tempos de mistura	70
2.3.2.3. Efeito da agitação no crescimento das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i>	72
2.3.2.3.1. Perfil de crescimento	73

2.3.2.3.2. Efeito da agitação na produção de enzimas com actividade proteolítica	80
2.3.2.3.3. A influência da agitação no metabolismo celular	81
2.3.2.3.4. Propriedades reológicas e aspectos morfológicos das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i>	89
2.3.2.4. Influência do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_L a$ ) no metabolismo das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i>	93
2.3.2.4.1. O efeito do $K_L a$ nas culturas de <i>Centaurea calcitrapa</i>	93
2.3.2.5. Parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico	99
2.4. CONCLUSÕES	103
2.5. REFERÊNCIAS	106

### **CAPÍTULO 3 - Efeito do stresse hidrodinâmico na cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* quando aplicadas no Fluxo Turbulento Submerso**

RESUMO	114
ABSTRACT	115
3.1. INTRODUÇÃO	116
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	120
3.2.1. Manutenção das culturas de células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i> em Erlenmeyer	120
3.2.2. Fluxo Turbulento Submerso	120
3.2.3. Parâmetros para avaliar o efeito de tensão na suspensão celular de <i>Centaurea calcitrapa</i>	122
3.2.3.1. Peso fresco e peso seco	123
3.2.3.2. Viabilidade celular	123
3.2.3.3. Análise digital de imagem	123
3.2.3.4. <i>Focused Beam Reflectance Measurement</i> (FBRM)	123
3.2.4. Cálculo do tempo de exposição	123
3.2.5. Crivagem da suspensão e sua caracterização	124
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
3.3.1. Variação da viabilidade celular nas suspensões de <i>Centaurea calcitrapa</i>	127
3.3.2. Análise digital de imagem	130
3.3.2.1. Distribuição dos agregados celulares	131
3.3.3. Energia dissipada total	134
3.3.4. <i>Focused Beam Reflectance Measurement</i> (FBRM)	136
3.3.5. Validação das medições	140
3.4. CONCLUSÕES	142
3.5. REFERÊNCIAS	143

#### **CAPÍTULO 4 - Cultura de células vegetais em sistema de baixo stresse – biorreactor com agitação e arejamento por membrana**

RESUMO	146
ABSTRACT	147
4.1. INTRODUÇÃO	148
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	149
4.2.1. Manutenção das culturas de células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i> em Erlenmeyer	149
4.2.2. Condições de crescimento em biorreactor com agitação e arejamento por membrana	149
4.2.3. Determinação do $K_L a$ pelo método do sulfito modificado	151
4.2.4. Determinação dos parâmetros de crescimento da cultura de células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i>	152
4.2.5. Determinação da viabilidade celular	152
4.2.6. Caracterização reológica das células em cultura de <i>Centaurea calcitrapa</i>	153
4.2.7. Métodos analíticos	153
4.2.8. Determinação dos tempos de mistura	153
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	155
4.3.1. Transferência de massa e homogeneização da cultura	155
4.3.2. Crescimento das células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i> em reactor biológico com agitação e arejamento por membrana	157
4.3.2.1. Parâmetros cinéticos do crescimento e produção de metabolitos	157
4.3.2.2. Stresse hidrodinâmico em biorreactores de membrana	163
4.3.3. Caracterização reológica da cultura de <i>Centaurea calcitrapa</i>	166
4.4. CONCLUSÕES	169
4.5. REFERÊNCIAS	170

#### **CAPÍTULO 5 – Aumento de escala de 2 L para 7 L na produção de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em reactor biológico mecanicamente agitado**

RESUMO	173
ABSTRACT	174
5.1. INTRODUÇÃO	175
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	181
5.2.1. Manutenção das culturas de células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i> em Erlenmeyer	181
5.2.2. Características do biorreactor mecanicamente agitado de 7 L	181
5.2.3. Determinação dos parâmetros de crescimento da cultura de células em suspensão de <i>Centaurea calcitrapa</i>	183
5.2.4. Transferência de massa de oxigénio	183

5.2.5. Determinação da viabilidade celular	184
5.2.6. Caracterização reológica das células em cultura de <i>Centaurea calcitrapa</i>	184
5.2.7. Métodos analíticos	184
5.2.8. Determinação dos tempos de mistura	184
5.2.9. Parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico	185
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	186
5.3.1. A transferência de oxigénio e a homogeneização da cultura em biorreactor de 7 L mecanicamente agitado	186
5.3.1.1. Caracterização da transferência de oxigénio na cultura	186
5.3.1.2. Caracterização da homogeneização da cultura	192
5.3.2. Aumento de escala de 2 L para 7 L usando como critério o coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio ( $K_{La}$ )	196
5.3.2.1. Efeito de diferentes dispersores de ar mantendo $K_{La}$ constante	196
5.3.2.2. Efeito de diferentes tipos e número de agitadores mantendo constante o $K_{La}$	201
5.3.2.3. Parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico	208
5.3.3. Aumento de escala de 2 L para 7 L usando como critério a velocidade do agitador ( $\pi \cdot D_i \cdot N$ )	211
5.4. CONCLUSÕES	214
5.5. REFERÊNCIAS	215

## **CAPÍTULO 6 – Conclusões e Perspectivas**

6.1. CONCLUSÕES GERAIS	219
6.2. PERSPECTIVAS PARA TRABALHO FUTURO	222

## **ANEXOS**

ANEXO A - PROGRAMA PARA AQUISIÇÃO DE IMAGENS	A-1
ANEXO B - PROGRAMA DE ANÁLISE DAS IMAGENS	B-1
ANEXO C - FÓRMULAS USADAS NOS CÁLCULOS EXPERIMENTAIS DO JACTO DE FLUXO TURBULENTO	C-1
ANEXO D - DADOS DOS ENSAIOS DO SISTEMA DE JACTO TURBULENTO	D-1
ANEXO E - FÓRMULAS PARA ANÁLISE DOS DADOS DE FBRM	E-1
ANEXO F – FACTORES CARACTERÍSTICOS DO <i>SPINDLE</i>	F-1
ANEXO G - TRATAMENTO ESTATÍSTICO	G-1

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS**

## 1.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biorreactores, com vista à obtenção de elevadas produtividades, tem sofrido grandes avanços. Com estes novos sistemas, pretende-se a viabilização de processos de produção em larga escala, principalmente na cultura de células vegetais em suspensão. No entanto, o sucesso da produção em larga escala assim como, a obtenção de resultados reprodutíveis tem sido complicado, devido à susceptibilidade das células vegetais ao stresse hidrodinâmico.

A resposta do sistema biológico a um ambiente de stresse hidrodinâmico depende da duração e da intensidade a que se encontra exposto, assim como das características fisiológicas do sistema. Os estudos de stresse hidrodinâmico nos sistemas biológicos podem-se dividir em duas grandes categorias, dependendo do estado em que o sistema se encontra, quando exposto a condições de tensão (*shear*) e da duração da exposição.

Assim, numa primeira categoria, temos os casos considerados de longa duração, em que uma determinada suspensão celular é exposta às forças de tensão durante o seu ciclo de crescimento ou grande parte dele (Scragg *et al.*, 1988; Meijer *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1994; Zhong *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1998; Keßler *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1999; Chen & Huanh, 2000; Rocha-Valadez *et al.*, 2000; Chiou *et al.*, 2001; ten Hoopen *et al.*, 2002). Numa segunda categoria, temos os estudos de curta duração, em que as células são expostas a condições muito bem definidas, de fluxo laminar ou turbulento, por curtos períodos de tempo e geralmente, sem que as células se encontrem em condições de crescimento.

No caso dos estudos que se enquadram na primeira categoria, as suspensões celulares são sujeitas às forças de tensão em reactores biológicos, sob condições de esterilidade. Neste tipo de estudos, em que são impostas forças de tensão em biorreactor, a regulação do ambiente hidrodinâmico é feito por intermédio dos parâmetros agitação/arejamento. Os estudos de maior relevo efectuados nesta área, em cultura de células vegetais, encontram-se descritos por Meijer *et al.* (1993) e por Kieran *et al.* (2000). Devido à grande variabilidade de biorreactores existentes, a comparação destes estudos, entre as diferentes linhas celulares, torna-se difícil. Os resultados obtidos são específicos do sistema em causa. No entanto, esta análise, em condições de crescimento, é apropriada num sistema de pequena escala, fornecendo mais dados numa perspectiva de um futuro aumento de escala (*scale-up*). Igualmente, a análise de um ambiente hidrodinâmico num sistema em contínuo, facilita a investigação dos efeitos a longo prazo, sem a mudança de fase de crescimento. Contudo, é dada menor atenção às condições de produção de metabolitos, principalmente quando

estes não estão associados ao crescimento celular (Dunlop & Namdev, 1994; Meijer *et al.*, 1994; ten Hoopen *et al.*, 2002).

Estudos nesta área têm mostrado que a susceptibilidade das células ao stresse hidrodinâmico é dependente da linha celular, assim como da fase do ciclo de crescimento em que se encontravam, do seu historial e das condições de manutenção celular (Scragg *et al.*, 1988; Leckie *et al.*, 1991a, 1991b, 1991c; Meijer *et al.*, 1994). Diversos estudos apontam para que esta susceptibilidade seja atribuída a variações no tamanho das células/agregados (Takeda *et al.*, 1994, Kieran *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Keßler *et al.*, 1999). A caracterização morfológica da suspensão celular torna-se importante por ajudar a explicar o comportamento das culturas perante forças de tensão hidrodinâmicas. Takeda *et al.* (1994) observaram uma redução no tamanho médio dos agregados celulares de *Carthamus tinctorius*, quando as células eram transferidas de Erlenmeyer para reactor biológico mecanicamente agitado. O aumento da biomassa, a elevadas velocidades de agitação, era atribuído ao aumento da área interfacial de contacto, devido à quebra dos agregados celulares.

De modo a investigar a resposta de um sistema durante a fase exponencial de crescimento, Ho *et al.* (1995) investigaram a transferência de massa de oxigénio e os danos provocados em células em suspensão de *Nicotiana tabacum*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado, em sistema descontínuo. Com base na densidade populacional de células viáveis, calcularam a taxa específica de crescimento, verificando que esta sofria uma redução, quando a velocidade de agitação da cultura era aumentada de 100 para 325 rpm. Assim, aumentando a intensidade da agitação, aumentavam os danos celulares nas culturas a longo prazo. Estes autores verificaram igualmente que, a redução na produtividade de biomassa era devida aos danos celulares provocados pelas forças hidrodinâmicas a que se encontravam expostas e não a uma deficiente transferência de massa de oxigénio.

Actualmente, os estudos de stresse hidrodinâmico em biorreactores mecanicamente agitados tendem a focar os efeitos letais e sub-letais, através de um elevado número de indicadores de resposta (Kieran *et al.*, 2000). Tendo como base o facto de que muitos dos estudos em reactores biológicos são realizados provocando alterações no ambiente hidrodinâmico, por variação da agitação/arejamento, alguns autores utilizaram o coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio inicial ( $K_L a$ ), como indicador empírico, para quantificar o stresse hidrodinâmico a que as células se encontravam expostas (Tanaka, 1981; Leckie *et al.*, 1991c; Lima-Costa *et al.*, 1997). Nos anos mais recentes, a energia dissipada média (Takeda *et al.*, 1994; Kieran *et al.*, 1995) e, em particular, a energia dissipada acumulada (produto da energia dissipada média pelo tempo de exposição) (Dunlop & Namdev, 1994; MacLoughlin *et al.*, 1998) tem sido identificada como a medida

mais indicada para quantificar a intensidade do stresse a que as células se encontram expostas.

Wongsamuth & Doran (1997) expuseram as células em suspensão de *Atropa belladonna*, a energias dissipadas da ordem dos  $10^6 - 10^9 \text{ Jm}^{-3}$ . Neste estudo, a integridade membranar mostrou-se um fraco indicador do stresse a que a suspensão se encontrava exposta. Contrariamente e, baseada nas características da filtração da massa de células, a permeabilidade da massa celular, apresentou-se como um forte indicador dos efeitos de tensão. Também, Takeda *et al.* (1998) estudaram as respostas metabólicas das células de eucalipto e de couve-flor quando sujeitas a condições de stresse hidrodinâmico, em reactor biológico mecanicamente agitado. As energias de dissipação de  $0,5 - 2,3 \text{ JKg}^{-1}$  provocaram uma diminuição na taxa respiratória e no conteúdo em ATP sendo estas mais pronunciadas que a redução da integridade membranar das células.

No caso da segunda categoria, as células são expostas a condições muito bem definidas, de fluxo laminar ou turbulento, por curtos períodos de tempo. Nestes estudos, os sistemas usados não se encontram adaptados para serem usados em condições de esterilidade, logo não são usados em condições de crescimento, sendo a duração da exposição às condições de tensão relativamente curta. Nestes casos, pode-se mesmo afirmar que as propriedades das células se mantêm constantes, sendo a intensidade e o tempo de exposição dos sistemas os responsáveis pelas alterações que possam ocorrer a nível celular. Hooker *et al.* (1989) utilizaram um viscosímetro co-axial (*Couette*) para exporem, durante 12 h, as células em suspensão de *Nicotiana tabacum* a condições de elevada tensão. As velocidades de corte variaram entre  $600$  e  $1200 \text{ s}^{-1}$ . A viabilidade celular, lise celular e produção de metabolitos secundários (compostos fenólicos) foram os indicadores de resposta analisados para avaliar os danos nas células, provocados pelas condições de elevada tensão imposta. Estes autores constataram que os danos nas células de *N. tabacum* aumentavam com a velocidade de corte e com o tempo de exposição. Verificaram ainda que, as culturas no fim da fase exponencial e início da estacionária eram mais susceptíveis aos danos celulares do que as culturas na fase de adaptação, início da exponencial ou fim da fase estacionária do ciclo de crescimento. Utilizando o mesmo sistema, um viscosímetro co-axial, Zhong *et al.* (1994) sujeitaram células de *Perilla frutescens* a velocidades de corte entre  $144,4$  e  $866,4 \text{ s}^{-1}$ , durante 20 min. Observaram que a viabilidade celular decrescia com o aumento da velocidade de corte imposta.

Kieran (1993) e Kieran *et al.* (1995) sujeitaram células de *Morinda citrifolia* a um sistema de fluxo laminar com recirculação, em que a redução de viabilidade celular com o tempo de exposição às forças de tensão, foi descrita por um modelo exponencial. Da aplicação deste modelo determinou-se a taxa de morte celular, que foi usada para quantificar a resposta das

células ao ambiente hidrodinâmico imposto. As células de *M. citrifolia* foram também aplicadas num sistema, denominado Fluxo Turbulento Submerso, em que o fluxo é turbulento (Murtagh, 1994; Ryan, 1997; MacLoughlin *et al.*, 1998; Hiney, 1999). No capítulo 3 é feita uma revisão dos principais estudos realizados neste sistema de regime turbulento.

Sun & Linden (1999) utilizaram um biorreactor, denominado vaso de parede rotativa (Rotary Cell Culture System, Synthecon, Houston, TX, USA), para cultivarem células em suspensão de *Taxus cuspidata*, em condições de fluxo laminar. Verificaram que, embora a taxa específica de crescimento aumentasse com a tensão de corte, a taxa de produção de Taxol<sup>®</sup> era elevada a baixas tensões, diminuindo com o aumento da tensão de corte. Kieran *et al.* (2000) reuniram os principais estudos, em culturas de células vegetais, de curto prazo e em condições bem definidas, utilizando diferentes tipos de sistemas.

Sowana *et al.* (2001) estudaram os efeitos de forças hidrodinâmicas turbulentas na resposta biológica, através da actividade respiratória, de células em suspensão de *Daucus carota*. O equipamento utilizado neste estudo, simula as condições de turbulência existentes na região do agitador de um reactor biológico mecanicamente agitado convencional. Os resultados obtidos indicam que ocorrem danos celulares significativos quando a energia dissipada máxima é  $50 \text{ WKg}^{-1}$  e a energia dissipada total é  $10^4 \text{ JKg}^{-1}$ .

Actualmente, e como foi referido nos estudos em reactor biológico mecanicamente agitado, o conceito de energia dissipada tem sido usado como parâmetro para quantificar os danos celulares, provocados por exposição a forças de tensão (Kieran *et al.*, 1995; MacLoughlin *et al.*, 1998; Sun & Linden, 1999). Nos diferentes estudos, tem-se observado um elevado grau de concordância entre semelhantes níveis de energia dissipada acumulada e a resposta dos sistemas biológicos, independentemente das diferenças morfológicas entre estes, da geometria, modo e duração, da operação a que se encontram expostos. No entanto, mesmo em condições bem definidas de tensão, é difícil comparar resultados obtidos em diferentes condições, com base nos indicadores de resposta, para linhas celulares distintas, em termos fisiológicos e morfológicos.

A suspensão de células de *Centaurea calcitrapa* utilizada neste trabalho provém de um cardo que expressa enzimas coagulantes a nível da raíz, caule, folhas e flor (Quer, 1981; Miguel, 1989). As células deste cardo, em culturas *in vitro* expressam igualmente proteinases coagulantes, cujas características globais se aproximam das da planta mãe (Domingos, 1997; Raposo, 1997).

Esta dissertação divide-se em quatro grandes capítulos que abordam, de perspectivas diferentes, as susceptibilidades das culturas de *Centaurea calcitrapa* ao stresse hidrodinâmico.

No capítulo 2 foi feita a caracterização reológica e hidrodinâmica da suspensão de células de *C. calcitrapa*, cultivada em Erlenmeyer e em reactor biológico mecanicamente agitado, em sistema descontínuo. Foi avaliado o stresse celular após a cultura ser sujeita a forças de tensão de longa duração. As células em suspensão de *C. calcitrapa* foram sujeitas a forças de tensão durante o ciclo de crescimento celular, em biorreactor mecanicamente agitado. De entre os indicadores de resposta possíveis, tivemos a produção de biomassa, traduzida pela variação de peso fresco e peso seco, produtividade de biomassa, a viabilidade celular, índice de expansão, produção de metabolitos, energia dissipada média e tensão de corte, de forma a avaliar a resposta da suspensão ao ambiente hidrodinâmico a que se encontrava sujeita. Nas células cultivadas em Erlenmeyer foi ainda feita uma abordagem morfológica, relacionando-a com as características reológicas da cultura.

No capítulo 3, as suspensões de células de *C. calcitrapa* foram sujeitas a testes de curta duração, em condições intensas e bem definidas de tensão, ao serem aplicadas no Fluxo Turbulento Submerso. A análise morfológica, a energia dissipada média, a energia dissipada acumulada, a variação de peso fresco e peso seco, além da viabilidade celular foram os indicadores de resposta usados para avaliar a susceptibilidade da suspensão celular às condições de stresse impostas por este sistema bem definido.

No capítulo 4 foi feita uma abordagem diferente da efectuada nos capítulos anteriores. Foi estudado o comportamento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas num reactor biológico de baixo stresse hidrodinâmico, em que a agitação e o arejamento foram feitos por intermédio de uma membrana. Além dos parâmetros de crescimento, tivemos a viabilidade celular e a produção de metabolitos, para avaliar a resposta das células a este sistema de baixo stresse hidrodinâmico.

No capítulo 5 foi feito o aumento de escala de 2 para 7-L das células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado, tendo como critério a constância do  $K_L a$ . Neste estudo foi avaliado o efeito de diferentes agitadores e dispersores de ar no desenvolvimento da cultura. Os indicadores de resposta usados para avaliar a resposta da suspensão ao ambiente hidrodinâmico a que se encontrava sujeita foram os mesmos utilizados no capítulo 2.

O capítulo 6, desta dissertação, é a interligação dos diferentes capítulos, com as diferentes abordagens.

## 1.2. OBJECTIVOS

O objectivo geral desta dissertação foi avaliar o stresse hidrodinâmico nas células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* quando expostas a forças de tensão de longa duração e de curta duração.

Os objectivos específicos deste trabalho foram:

- Caracterização reológica, hidrodinâmica e morfológica da cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*, cultivada em Erlenmeyer.
- Estudo do efeito da agitação no crescimento das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*, em reactor biológico de 2-L mecanicamente agitado. Caracterização reológica e hidrodinâmica da cultura cultivada neste reactor biológico.
- Estudo da influência do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_La$ ) no crescimento das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*, em biorreactor de 2-L mecanicamente agitado.
- Avaliação do comportamento da suspensão celular de *Centaurea calcitrapa* quando sujeita a condições de stresse de curta duração e de elevada intensidade, por intermédio do Fluxo Turbulento Submerso.
- Avaliação do crescimento da cultura de células de *Centaurea calcitrapa* num sistema de baixo stresse, num biorreactor em que a agitação e o arejamento é promovido por intermédio de uma membrana porosa.
- Aumento de escala de 2 para 7-L da cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*, em reactor biológico mecanicamente agitado, mantendo constante o  $K_La$ .

**1.3. REFERÊNCIAS**

- Chen, S. Y. & S. Y. Huanh (2000) Shear stress effects on cell growth and L-DOPA production by suspension culture of *Stizolobium hassjoo* cells in an agitated bioreactor. *Bioproc. Eng.* **22**: 5-12.
- Chiou, S. Y., W. W. Su & Y. C. Su (2001) Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. *J. Biotechnol.* **85**: 247-257.
- Domingos, A. (1997) An aspartic proteinase from flowers of *Centaurea calcitrapa*: purification, molecular cloning and modelling of its three-dimensional structure. *Tese de Doutoramento*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Dunlop, E. R. & P. K. Namdev (1994) Effect of fluid shear forces on plant cell suspensions. *Chem. Eng. Sci.* **49**: 2263 - 2276.
- Hiney, J.F. (1999) Plant cell breakage in a turbulent jet. *M. Eng. Sc. Thesis*. University College Dublin.
- Hooker, B. S., J. M. Lee & G. An (1989) Response of plant tissue culture to a high shear environment. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 484-490.
- Ho, C.-H., K. Henderson & G. Rorrer (1995) Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **11**: 140-145.
- Keßler, M., J. G. ten Hoopen & S. Furusaki (1999) The effect of the aggregate size on the production of ajmalicine and tryptamine in *Catharanthus roseus* suspension culture. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 308 - 315.
- Kieran, P. (1993) An investigation of the hydrodynamic shear susceptibility of the suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Ph. D. Thesis*. Department of Chemical Engineering. Faculty of Engineering and Architecture. University College Dublin.
- Kieran, P. M., H. J. O'Donnell, D. M. Malone & P. F. MacLoughlin (1995) Fluid Shear effects on suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Biotechnol. Bioeng.* **45**: 415 – 425.
- Kieran, P., D. Malone & P. MacLoughlin (2000) Effects of Hydrodynamic and Interfacial Forces on Plant Cell Suspension Systems. *Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol.* **67**: 139-177.
- Leckie, F., A. H. Scragg & K. L. Cliffe (1991a) Effect of bioreactor design and agitator speed on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 296 - 305.
- Leckie, F., A. H. Scragg & K. R. Cliffe (1991b) Effect of impeller design and speed on the large-scale cultivation of suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 801 - 810.
- Leckie, F., A. H. Scragg & K. R. Cliffe (1991c) An investigation into the role of initial  $K_La$  on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 364 - 370.
- Lima-Costa, M. E., S. Raposo, A. Clemente, M. S. Pais & J. Cabral (1997) Mass transfer studies on *Cynara cardunculus* L. & *Centaurea calcitrapa* suspension cultures. The influence of oxygen vectors. *Bioreactor/Process Fluid Dynamics* 27 – 43.
- MacLoughlin, P. F., D. M. Malone, J. T. Murtagh & P. M. Kieran (1998) The effects of turbulent jet flows on plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 595 - 604.
- Meijer, J. J., H. J. ten Hoopen, K. C. Luyben & K. R. Libbenga (1993) Effects of hydrodynamics stress on cultured plant cells: a literature survey. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 234 - 238.

- Meijer, J. J., H. J. ten Hoopen, Y. M. van Gameren, K. C. Luyben & K. R. Libbenga (1994) Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 467 - 477.
- Miguel, G. (1989) *Centaurea calcitrapa*: Obtenção de “calli” e extracção de proteases com actividade coagulante do leite. *Dissertação de Mestrado* em Secreção Vegetal e Recursos Naturais Renováveis. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Murtagh, J.T. (1994) The effects of hydrodynamic shear stress on suspension cultures of *Morinda citrifolia* using a submerged turbulent jet. *M. Eng. Sc. Thesis*. University College Dublin.
- Quer, P. (1981) Plantas Medicinales. El Dioscorides Renovado Editorial Labor, S. A.
- Raposo, S. (1997) Proteinases aspárticas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*: produção, purificação e caracterização (1997). *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Ryan, M.J. (1997) The effect of hydrodynamic stress on plant cell cultures in turbulent flows. *M. Eng. Sc. Thesis*. University College Dublin.
- Rocha-Valadez, J. A., E. Galindo & L. Serrano-Carreón (2000) Effect of the impeller-sparger configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. *Bioprocess Eng.* **23**: 403-410.
- Scragg, A. H., E. J. Allan & F. Leckie (1988) Effect of shear on the viability of plant cell suspensions. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 361 – 367.
- Sowana, D. D., D. R. G. Williams, E. H. Dunlop, B. B. Dally, B. K. O'Neill & D. F. Fletcher (2001) Turbulent shear stress effects on plant cell suspension cultures. *Chem. Eng. Res. Design.* **79**: 867-875.
- Sun, X. & J. C. Linden (1999) Shear stress effects on plant cell suspension cultures in a rotating wall vessel bioreactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 44 – 47.
- Takeda, T., T. Kitagawa, Y. Takeuchi, M. Seki & Furusaki (1998) Metabolic responses of plant cell culture to hydrodynamic stress. *Can. J. Chem. Eng.* **76**: 267 - 275.
- Takeda, T., M. Seki & S. Furusaki (1994) Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus tinctorius* in a stirred tank reactor. *J. Chem. Eng Jpn.* **27**: 466 - 471.
- Tanaka, H. (1981) Technological problems in cultivation of plant cells at high density. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 1203 – 1218.
- ten Hoopen, H. J. G., J. L. Vinke, P. R. H. Moreno, R. Verpoorte & J. J. Heijnen (2002) Influence of temperature on growth and ajmalicine production by *Catharantus roseus* suspension cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **30**: 56-65.
- Wongsamuth, R. & P. Doran (1997) The filtration properties of *Atropa belladonna* plant cell suspension; Effects of hydrodynamic shear and elevated carbon dioxide levels on culture and filtration parameters. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**: 15 – 26.
- Zhang, Y.-H., H.-Q. Wang, S. Liu, J.-T. Yu & J.-J. Zhong (1997) Regulation of apparent viscosity and O<sub>2</sub> transfer coefficient by osmotic pressure in cell suspensions of *Panax notoginseng*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 943 – 945.
- Zhong, J., F. Chen & W.-W. Hu (1999) High density cultivation of *Panax notoginseng* cells in stirred bioreactors for the production of ginseng biomass and ginseng saponin. *Proc. Biochem.* **35**: 491-496.
- Zhong, J.-J., K. Fujiyama, T. Seki & T. Yoshida (1994) A Quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens* in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 649-654.

## **CAPÍTULO 2**

# **CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E HIDRODINÂMICA DE UMA CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *CENTAUREA CALCITRAPA* EM REACTOR BIOLÓGICO MECANICAMENTE AGITADO**

**RESUMO**

O stresse hidrodinâmico foi avaliado nas células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* quando cultivadas em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado. As suspensões foram expostas a forças de tensão durante o seu ciclo de crescimento.

Em Erlenmeyer, determinou-se que a concentração óptima da fonte de carbono para a produção de biomassa e de enzimas com actividade proteolítica é 30 g/L de glucose. As células cultivadas em Erlenmeyer foram caracterizadas reologicamente e morfologicamente. Verificou-se que a cultura apresenta um comportamento pseudoplástico ao longo de todo o ciclo de crescimento e que o diâmetro médio dos agregados celulares diminui ao longo deste, variando entre 246 e 190  $\mu\text{m}$ .

Em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado, testou-se o efeito da agitação, na produção de biomassa e de proteases. As células em suspensão de *C. calcitrapa* mostraram sensibilidade às forças de tensão, originada pela agitação a 250 rpm. No ensaio realizado para diferentes  $K_{La}$ , as células em suspensão de *C. calcitrapa*, apresentaram uma produção óptima de biomassa para um  $K_{La}$  de  $19,85 \text{ h}^{-1}$ . Embora tenham sido crescidas culturas em idênticas condições de transferência de massa, estas apresentaram comportamentos bastante distintos, devido à sensibilidade que esta linha celular apresenta à agitação. Em reactor biológico, as culturas apresentaram igualmente um comportamento pseudoplástico ao longo de todo o ciclo de crescimento.

As células em suspensão de *C. calcitrapa* apresentam sensibilidade ao stresse hidrodinâmico para agitações de 250 rpm, sendo esta observação reforçada pela análise da energia dissipada média da cultura em reactor biológico mecanicamente agitado.

**ABSTRACT**

Hydrodynamic stress was evaluated in *Centaurea calcitrapa* suspended cells grown in a 2 L mechanically stirred biologic reactor. The suspensions were subjected to shear forces in the course of the growth cycle.

In experiments carried out in Erlenmeyer flasks, it was shown that the optimum carbon source concentration for the production of biomass and proteolytic enzymes is 30 g/L glucose. The cell suspensions grown in Erlenmeyer flasks were rheologically and morphologically characterized. Pseudoplastic behaviour was observed in the whole course of the growth cycle, and the average cell aggregate diameter decreased with cultivation time, ranging between 190 and 246  $\mu\text{m}$ .

The effect of changing stirring speed, on biomass and proteolytic enzyme production was tested in a 2 L mechanically stirred biologic reactor. *C. calcitrapa* suspended cells are sensitive to the shear forces created by stirring at 250 rpm. In experiments carried out with different  $K_La$  values, optimum biomass production by *C. calcitrapa* suspended cells occurred with a  $K_La$  value of  $19,85 \text{ h}^{-1}$ . Even though other experiments were carried out with similar mass transfer conditions, they showed very different behaviour due to the sensitivity of this cell line to mechanical stirring. In mechanically stirred biologic reactor pseudoplastic behaviour of the cell suspensions was also observed in the whole course of the growth cycle.

*C. calcitrapa* suspended cells have been shown to be sensitive to hydrodynamic stress with 250 rpm stirring speed. This observation is sustained by analysis of the average energy dissipation of the culture in mechanically stirred biologic reactor.

## 2.1. INTRODUÇÃO

A utilização de células vegetais na produção de compostos naturais ou recombinantes com interesse comercial, tem aumentado nas últimas décadas (Scragg, 1992, Houghton, 1995; Doran, 2000; Miller & Nagarajan, 2000; Sajc *et al.*, 2000; Giri *et al.*, 2001; Tsoi & Doran, 2002). No entanto, comparativamente com os sistemas de culturas de bactérias, leveduras ou de células animais, o número de aplicações na indústria biotecnológica dos sistemas vegetais, ainda é relativamente baixo (Kieran *et al.*, 1997). Contudo, podem-se antecipar as vantagens da engenharia genética nas plantas e na obtenção de elevadas quantidades de novos e melhorados compostos de diagnósticos e terapêuticos nas indústrias da saúde e farmacêuticas, contribuindo assim, para a rápida expansão da investigação neste campo. A utilização de células vegetais em suspensão na produção de proteínas recombinantes, que incluem anticorpos recombinantes e fragmentos de anticorpos (Wongsamuth & Doran, 1997b; Sharp & Doran, 1999; Fischer *et al.*, 1999; Liu & Lee, 1999; Sharp & Doran, 2001), enzimas tais como a  $\beta$ -glucuronidase (Kurata *et al.*, 1998) e a invertase (Verdelhan *et al.*, 1999), e proteínas com elevado valor terapêutico, como as interleucinas humanas IL-2 e IL-4 (Magnuson *et al.*, 1998), ricina (Sehnke & Ferl, 1999) e a  $\alpha_1$ -antitripsina humana (Terashima *et al.*, 1999a; 1999b). As espécies vegetais hospedeiras mais comuns na síntese destas proteínas são as culturas em suspensão de tabaco (Sharp & Doran, 1999; Fischer *et al.*, 1999; Tsoi & Doran, 2002) e algumas culturas de arroz (Terashima *et al.*, 1999a; 1999b), que ainda estão a ser testadas.

Actualmente, tem-se assistido ao desenvolvimento de biorreactores com novas configurações (Roberts & Shuler, 1997, Jianfeng *et al.*, 1998; Gagnom *et al.*, 1999; Sun & Linden, 1999; Rocha-Valadez *et al.*, 2000; Galindez-Mayer *et al.*, 2001). No entanto, como as suspensões celulares têm um comportamento similar ao das culturas microbianas, a produção em reactores biológicos mecanicamente agitados representa, com todos os conhecimentos, tecnologias e equipamentos já disponíveis para microrganismos, a opção mais atractiva, do ponto de vista económico. Estes reactores têm sido aplicados na produção de produtos recombinantes com interesse comercial, operando em descontínuo (Fischer *et al.*, 1999; Liu & Lee, 1999), em contínuo (van Gulik *et al.*, 2001) e em sistema de duas fases (Terashima *et al.*, 1999a). Sabendo contudo, que este tipo de biorreactor promove o stresse hidrodinâmico nas suspensões celulares, têm sido os mais usados nos estudos de longa duração, sobre os efeitos das forças de tensão nas culturas de células vegetais em suspensão (Takeda *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1995; Kieran *et al.*, 1995; Doran, 1999; Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999; Chen & Huang, 2000). Uma das grandes limitações das culturas de células vegetais em suspensão, como sistemas de produção, é a sua sensibilidade ao stresse hidrodinâmico devido ao seu tamanho, rigidez da parede

celular, existência de um grande vacúolo e a tendência para a formação de agregados. No entanto, diversos estudos demonstraram a possibilidade de estabelecer culturas de células vegetais em biorreactor com resistência a este tipo de stresse (Scragg *et al.*, 1988; Meijer *et al.*, 1993; Meijer *et al.*, 1994).

O stresse hidrodinâmico em biorreactores está associado a danos nas células vegetais. Estes danos produzidos nas células podem ser letais ou ter um efeito sub-letal, dependendo da intensidade do stresse hidrodinâmico e em particular, da espécie e linha celular (Meijer *et al.*, 1993; Kieran *et al.*, 1997). Igualmente, algumas das características das culturas de células, cultivadas em biorreactor, podem estar associadas aos danos provocados pelo stresse hidrodinâmico a que se encontram expostas. Estas características podem englobar a alteração do tamanho e forma dos agregados celulares (Zhong *et al.*, 1992; Ballica & Ryu, 1993; Takeda *et al.*, 1994; Trejo-Tapia *et al.*, 2001), libertação de material intracelular (Hooker *et al.*, 1990; Wongsamuth & Doran, 1997a; Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999; Sánchez *et al.*, 2002), variações na taxa respiratória específica (Takeda *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1998), perda de viabilidade (Zhong *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1995; Keßler *et al.*, 1999), alterações na composição da parede celular (Keßler *et al.*, 1999) e alterações na produção de biomassa e metabolitos (Ho *et al.*, 1995; Chen & Huang, 2000).

Prokop e Bajpai (1992) descreveram os factores que influenciam a sensibilidade à tensão de corte nos microrganismos. Neste artigo de revisão, é feita uma descrição dos mecanismos físicos e biológicos que provocam danos devido ao stresse hidrodinâmico. Também, Joshi *et al.* (1996) fazem uma descrição da mecânica de fluidos e dos aspectos biológicos que envolvem o stresse hidrodinâmico. Meijer *et al.* (1993) reuniram, igualmente num artigo de revisão, os estudos efectuados sobre os efeitos que as forças de tensão hidrodinâmicas têm no crescimento de células vegetais.

Igualmente, um dos problemas associados à cultura de células vegetais, reside numa adequada transferência de massa de oxigénio. A transferência de massa de oxigénio no biorreactor é caracterizada pelo coeficiente volumétrico de transferência de massa ( $K_L a$ ). Este parâmetro, depende das propriedades físico-químicas do meio nutriente (solubilidade, viscosidade, coeficientes difusionais, tensão superficial do líquido), dos produtos do metabolismo celular, dos compostos presentes no meio de cultura, assim como, da formação e dimensão dos agregados celulares, do tipo e dos parâmetros processuais do biorreactor, em particular as condições de homogeneização do meio líquido, caudal de arejamento e a dimensão das bolhas gasosas (Lima-Costa, 1994). Quando as culturas se encontram em stresse, intrinsecamente ocorrem variações na transferência de massa. Verificam-se variações na troca de gases na cultura, variando assim o  $K_L a$  e, conseqüentemente, o fornecimento de nutrientes à cultura. As alterações que possam

ocorrer a nível do metabolismo celular e da produtividade, nem sempre são nefastas para as células. Pelo contrário, podem aumentar significativamente a produtividade celular (Leckie *et al.*, 1991a), particularmente quando os metabolitos são produzidos durante a fase estacionária.

Lima-Costa (1994) caracterizou indirectamente, em termos hidrodinâmicos, a cultura em suspensão de *Cynara cardunculus* crescida em biorreactor descontínuo de 2 L, mecanicamente agitado. Determinou os tempos característicos de crescimento para diferentes velocidades de agitação e arejamento constante. Wang & Zhong (1997) realizaram ensaios comparativos de transferência de oxigénio em reactor, entre dois tipos de agitadores, agitador tipo centrífuga e uma turbina de pás planas, através da simulação de uma cultura de células vegetais em suspensão utilizando partículas de agar.

Keßler *et al.* (1997) testaram o efeito de dois tipos de agitadores, uma turbina do tipo Rushton e um agitador tipo âncora, em culturas de células em suspensão de *Fragaria ananassa*. Verificaram que, com a turbina do tipo Rushton o consumo de oxigénio era estimulado pelo aumento da turbulência, visto provocar a quebra dos agregados celulares, aumentando a área inter-específica de contacto das partículas com as bolhas gasosas. Embora este efeito possa ser prejudicial, as condições de stresse, muitas vezes, activam o metabolismo celular, aumentando a taxa de consumo de oxigénio. Quando se pretende estimular a produção de metabolitos secundários as condições de stresse hidrodinâmico podem ser benéficas para a cultura celular.

Kieran *et al.* (2000) publicaram um artigo de revisão em que fizeram um levantamento dos principais estudos de sensibilidade das células vegetais ao stresse hidrodinâmico, em condições de cultivo e em sistemas construídos especificamente para este fim. Avaliaram os métodos usados nos estudos de exposição das suspensões celulares a diferentes ambientes hidrodinâmicos, assim como os indicadores de resposta que as células apresentam às forças de tensão. Foi ainda feita uma comparação entre diferentes estudos de exposição das suspensões celulares a condições bem definidas de forças de tensão.

Muitos dos problemas de sensibilidade ao stresse hidrodinâmico podem ser resolvidos com um estudo prévio a nível da caracterização física do sistema, em complementaridade com o conhecimento reológico da suspensão celular e a definição do ambiente hidrodinâmico das células em suspensão. Contudo, em células vegetais, existem poucos estudos focando os aspectos reológicos da cultura de células vegetais (Zhong *et al.*, 1992; Ballica & Ryu, 1993; Curtis & Emery, 1993; Rodríguez- Monroy & Galindo, 1999; Trejo-Tapia *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2002). Doran (1999) e Kieran *et al.* (1997) resumiram os principais estudos de caracterização reológica em células vegetais em suspensão. Na sua maioria as suspensões de células vegetais apresentam um comportamento não-Newtoniano. Nestas

suspensões celulares, o comportamento pseudopástico característico é determinado principalmente pela concentração celular, pela agregação celular e pela morfologia das células (Jolicouer *et al.*, 1992; Curtis & Emery, 1993; Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999; Trejo-Tapia *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2002). Em contraste, o comportamento reológico do meio de cultura, sem células, é descrito como sendo, na sua maioria, Newtoniano, dependendo este comportamento da espécie celular e das condições de cultura usadas no crescimento das células (Sánchez *et al.*, 2002). Os meios nutrientes das culturas de *Vinca rosae* (Tanaka, 1982), *Perilla frutescens* (Zhong *et al.*, 1992), *Papaver somiferum* (Curtis & Emery, 1993) e *Solanum chrysotrichum* (Trejo-Tapia *et al.*, 2001), após remoção das células, são alguns dos exemplos que apresentam uma viscosidade semelhante à da água. No entanto, o meio nutriente das culturas de *Nicotiana tabacum*, cultivadas em biorreactor de 30 L, apresenta um comportamento não-Newtoniano devido à acumulação de polissacarídeos e proteínas (Kato *et al.*, 1978). O mesmo acontece com o meio das culturas de *Beta vulgaris*, crescidas em biorreactor mecanicamente agitado (Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999) e com as culturas crescidas num biorreactor *airlift* (Sánchez *et al.*, 2002).

As variações de tamanho e forma dos agregados celulares estão habitualmente associados ao ambiente hidrodinâmico a que se encontram expostos. Igualmente, as propriedades reológicas da cultura podem ser afectadas pelas características morfológicas, como já foi referido anteriormente, em que o aumento das células/agregados (Zhong *et al.*, 1992; Ballica & Ryu, 1993; Zhang *et al.*, 1997) ou a alteração da forma destes (Trejo-Tapia *et al.*, 2001), provoca o aumento da viscosidade aparente da cultura. Assim sendo, o estudo da morfologia celular, durante o ciclo de crescimento, torna-se importante possibilitando uma melhor compreensão do comportamento da cultura em diferentes condições de crescimento. Também, Hulst *et al.* (1989) e Keßler *et al.* (1999) demonstraram haver uma forte relação entre o tamanho dos agregados celulares e a produção de metabolitos secundários. Para a análise dos efeitos do stresse hidrodinâmico, os agregados celulares podem ser separados, em fracções de diferentes tamanhos, por um sistema de crivos (Mavituna & Park, 1987; Kieran *et al.*, 1993). A análise digital de imagem facilita a compreensão da análise das diferentes amostras, sendo principalmente benéfica no estudo dos agregados que apresentam uma grande variabilidade de tamanho e forma. Ibaraki & Kenji (2001) apresentam as aplicações da análise digital de imagem no estudo das culturas de células vegetais. Uma das grandes vantagens desta técnica é a facilidade com que se podem medir diversos parâmetros, que manualmente seriam difíceis, extremamente morosos e teriam um erro inerente das leituras manuais, que poderia oscilar entre 10 e 120  $\mu\text{m}$ , devido à variabilidade dos agregados. A análise digital de imagem apresenta-se como sendo uma técnica objectiva e não evasiva para a avaliação qualitativa e quantitativa das culturas de

células vegetais (Ibaraki & Kenji, 2001). Recentemente esta técnica foi usada para a caracterização morfológica das células em cultura de *Oryza sativa*, *Nicotiana benthamiana* e *Trichosanthes kirilowii* (McDonald *et al.*, 2001) e a avaliação da produção de antocianinas nas células de *Fragaria ananassa* (Miyanaga *et al.*, 2000).

O estabelecimento da cultura de células vegetais de *Centaurea calcitrapa* em reactor biológico, no sentido de viabilizar economicamente a produção biotecnológica das enzimas proteolíticas, obriga ao estudo prévio de vários parâmetros que condicionam a sua actividade (Lima-Costa *et al.*, 1997; Raposo, 1997). O objectivo deste capítulo, consistiu na utilização das culturas de células de *C. calcitrapa* como modelo biológico para a caracterização do comportamento reológico e hidrodinâmico das culturas de células vegetais. Este estudo é particularmente importante para populações com elevada densidade celular, cujo interesse reside na necessidade de aumentar a produtividade dos processos de produção de forma a torná-los economicamente viáveis.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1. Estabelecimento e manutenção das culturas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em Erlenmeyer

Os *calli* foram obtidos de explantes de secções de folhas da planta *in vivo* e da planta germinada *in vitro*, como descrito por Raposo (1993). Na indução dos *calli* foi utilizado meio de cultura sólido Schenk & Hildebrandt (1972) suplementado com 1,5 mg/L NAA e 0,15 mg/L KIN (Raposo, 1993). A composição do meio de cultura Schenk & Hildebrandt (SH) é apresentada na tabela 2.1.

As suspensões celulares foram obtidas a partir de *calli*, com 15 dias de cultura. Foram utilizados Erlenmeyers de 500 mL, contendo 150 mL de meio de cultura SH, conforme descrito por Raposo (1993).

**Tabela 2.1.** - Composição do meio de cultura Schenk & Hildebrandt (1972)

	NUTRIENTES	mg/L
MACRONUTRIENTES	KNO <sub>3</sub>	2 500
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	200
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	400
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	300
MICRONUTRIENTES	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,2
	KI	1
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1
FONTE DE FERRO	Na <sub>2</sub> -EDTA.2H <sub>2</sub> O	20
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	15
CONSTITUINTES ORGÂNICOS	Mio-inositol	1 000
	Tiamina-HCl	5
	Ácido nicotínico	5
	Piridoxina-HCl	0,5
	Ácido ascórbico	5
	Agar	8 000
FONTE DE CARBONO	Glucose	30 000
	pH	5,8 - 5,9

Nas culturas em Erlenmeyer, a inoculação foi efectuada por pipetagem utilizando a concentração de 20% (v/v) de inóculo para 150 mL de meio de cultura, em intervalos de 8 dias.

Todo o material utilizado nas manipulações das culturas foi esterilizado por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.

## **2.2.2. Crescimento das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em sistema descontínuo - Erlenmeyer**

### **2.2.2.1. Optimização da concentração de fonte de carbono**

Na determinação da concentração óptima de fonte de carbono do meio nutriente, foram realizados ensaios em triplicado na presença de diferentes concentrações de glucose: 20, 30, 40 e 60 g/L.

Utilizou-se um inóculo de 26 % (v/v) da suspensão estabilizada, com 8 dias de subcultura. As culturas foram mantidas em agitação orbital constante a 115 rpm e à temperatura de 24±1 °C. Procedeu-se à recolha de amostras de 2 em 2 dias de forma a obter o perfil de crescimento.

Estes ensaios foram realizados com três erlenmeyers, sendo recolhida uma amostra de cada Erlenmeyer. Os parâmetros de crescimento foram obtidos pelo cálculo da média aritmética dos resultados experimentais de cada amostra recolhida, de cada Erlenmeyer, e análise do erro padrão.

Os resultados foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) e para valores de F significativos, realizou-se o teste de comparação múltipla de médias de Duncan, usando o software SPSS (Windows, Release 11.5.0).

### **2.2.2.2. Aplicação do modelo não estruturado de Monod**

Os modelos matemáticos dos processos biológicos são instrumentos importantes na optimização de processos ou na validação teórica de novos processos. Os modelos clássicos de abordagem do crescimento de bactérias e leveduras são, genericamente modelos não estruturados do tipo “caixa negra”, que pressupõem a composição celular constante ao longo do crescimento. Estes modelos simplificados, não correspondem à complexidade do sistema metabólico vegetal, por não contemplarem a multiplicidade e variabilidade da concentração e composição dos componentes intracelulares ao longo do crescimento (Lima-Costa, 1994).

A proposta de Monod (1942) para a modelação da taxa específica de crescimento é, talvez, a mais utilizada nas áreas de biotecnologia e microbiologia. Esta proposta é uma abordagem determinística, distribuída e não estruturada que representa a dependência da taxa de crescimento em função da concentração de um substrato limitante (Bailey & Ollis, 1991).

Quando a concentração de um constituinte essencial do meio é alterada, mantendo constante a concentração dos outros componentes, a taxa de crescimento varia, tipicamente, de um modo hiperbólico. O modelo de Monod descreve uma relação funcional entre a taxa específica de crescimento e a concentração desse constituinte essencial através da seguinte equação (Monod, 1942):

$$\mu_g = \frac{\mu_{max} S}{K_m + S} \quad (2.1.)$$

em que,  $\mu_{max}$  representa a taxa específica de crescimento máxima atingida quando  $S \gg K_m$  e a concentração dos restantes elementos essenciais não se altera.  $K_m$  é a constante de saturação, correspondente ao valor da concentração de nutriente limitante na qual a taxa específica de crescimento é metade do seu valor máximo. Esta constante exprime a afinidade do organismo para o substrato.  $S$  é a concentração de substrato.

A equação de Monod é uma simplificação das inter-relações celulares, apresentando algumas limitações: a relação estabelecida sugere que a taxa específica de crescimento é finita ( $\mu_g \neq 0$ ) para qualquer concentração finita do nutriente limitante; não considera as diferenças celulares nem as alterações na sua composição; considera que o aumento de biomassa é apenas função do consumo do substrato; não interpreta as fases de latência e de morte e não é aplicável a substratos conservativos (Bailey, 1991; Nielsen, 2001).

Neste trabalho, os parâmetros  $K_m$  e  $\mu_{max}$  foram determinados para as culturas estabelecidas em glucose, recorrendo à representação de Lineweaver-Burk (2.2.).

$$\frac{1}{\mu_g} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_m}{\mu_{max}} \frac{1}{S} \quad (2.2.)$$

### 2.2.3. Caracterização morfológica das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* crescidas em Erlenmeyer

A caracterização morfológica das células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas em Erlenmeyer, foi feita recorrendo a duas técnicas: a análise digital de imagem e o *Focused Beam Reflectance Measurement* (FBRM). Estudou-se a variação de tamanho dos

agregados ao longo do ciclo de crescimento das células de *C. calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer de 1 L e de 250 mL. Foram recolhidas amostras aos 0, 3, 5 e 7 dias do ciclo de crescimento, que foram posteriormente analisadas com base nas técnicas acima citadas. O peso fresco e o peso seco foram igualmente determinados.

Com o objectivo de analisar o tamanho do agregado dominante na suspensão, no final do ciclo de crescimento, procedeu-se à separação dos agregados celulares em diferentes tamanhos, através da utilização de diferentes crivos. Os agregados foram separados usando crivos com uma abertura de 300  $\mu\text{m}$  e de 600  $\mu\text{m}$ . Obtiveram-se fracções de agregados com um tamanho entre 0 e 300  $\mu\text{m}$ , entre 300 e 600  $\mu\text{m}$  e com um tamanho superior a 600  $\mu\text{m}$ .

### **2.2.3.1. Análise digital de imagem**

Técnicas digitais de análise de imagem foram usadas para determinar o diâmetro equivalente dos agregados celulares. A digitalização de imagens ópticas é o principal processo envolvido na análise digital. A imagem óptica é dividida, usando uma grelha quadrada, num determinado número de pontos, chamados *pixels*. O diâmetro equivalente de um agregado celular é definido como sendo o número de *pixels* que atravessam o agregado de um lado ao outro. Esta medida foi posteriormente convertida para unidades métricas, através de um factor de calibração, que é inserido no programa usado para o cálculo. Utilizou-se o sistema de análise de imagem Quantimet Q520 (Cambridge Instruments, Cambridge, England) para medir o diâmetro equivalente dos agregados celulares. A preparação foi colocada num microscópio (Olympus BH-2) com uma câmara de vídeo acoplada, que captou imagens e foram reconhecidas pelo analisador de imagem. Para a captação das imagens, utilizou-se uma objectiva 4x (Olympus). As imagens recolhidas foram armazenadas para ulterior processamento. Recolheram-se cerca de 300 entidades de forma a ter uma amostra representativa da suspensão celular. Os programas utilizados para a recolha e ulterior análise das imagens encontram-se em anexo (Anexos A e B), tendo sido escritos na linguagem de programação QBASIC (Raposo Algorithm – updated 24-04.Q5R). Todos os cálculos foram efectuados com o programa Excel 2000, versão 9.0.2812.

### **2.2.3.2. Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM)**

As amostras recolhidas foram analisadas usando o *Focused Beam Reflectance Measurement* (FBRM), modelo M400LF, com uma sonda M400L acoplada (Lasentec®, Redmond, Washington, USA). Esta técnica consiste na aplicação de um feixe laser projectado através da janela de safira da sonda de FBRM e focado com precisão mesmo à

saída da superfície da janela. Este feixe focado move-se a uma velocidade elevada (2 a 6 m/s, dependendo do tipo de aplicação), de forma a seguir uma trajetória à volta da circunferência da janela da sonda e de modo a que o movimento das partículas não seja significativo para as medições. À medida que as partículas passam perto da superfície da janela, o feixe focado intersecta a margem de uma partícula. Essa partícula então dispersa alguma da radiação laser de volta para a sonda. Essa dispersão continua até que o feixe atinge a margem oposta da partícula. A radiação dispersa de volta para a sonda é recolhida pelo sistema óptico do FBRM e convertida num sinal electrónico.

O FBRM usa um circuito de discriminação específico para isolar o período de tempo de recolha de luz dispersa a partir da margem de uma partícula individual até à margem oposta. Este período de tempo é multiplicado pela velocidade de varrimento e o resultado é uma distância. A distância medida pelo FBRM é um comprimento de corda (*chord length*). Este define-se como uma linha recta entre quaisquer dois pontos na margem de uma partícula ou estrutura de partículas (aglomerado). Tipicamente, o FBRM mede dezenas de milhar de cordas por segundo, obtendo-se uma distribuição de tamanhos de cordas (número de contagens por segundo, ordenadas por tamanho de cordas em 1400 gamas de tamanho linear).

Procedimento:

A sonda foi inserida num copo de 250 mL contendo 130 mL da amostra sendo esta agitada a 250 rpm.

Os dados de distribuição de comprimento de corda foram recolhidos em intervalos de 5-10 min, usando como duração das medições 10 s. Foi aplicado o cálculo da média a cada 20 leituras. As gamas do comprimento de corda foram especificadas em 90 canais, distribuídas numa escala logarítmica entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ . A distância focal da sonda foi de 2,65 mm.

O programa usado na aquisição, tratamento estatístico e exportação dos dados para o Excel, foi o Lasentec FBRM Data Review 6.0 Beta 5.

As medidas estatísticas usadas na análise dos dados foram a contagem média por canal, a contagem normalizada por canal, o comprimento médio de corda, a contagem ponderada pelo quadrado do ponto médio, a contagem total e a contagem total real. A contagem normalizada por canal é obtida pela média das contagens por canal a dividir pela contagem total dos 90 canais. A contagem ponderada pelo quadrado do ponto médio é uma medida que representa uma área e é obtida pela contagem média por canal a multiplicar pelo ponto médio do canal ao quadrado. Por uma questão de simplicidade, futuramente será

denominada apenas como contagem ponderada. Como medida estatística na análise dos dados utilizou-se também a contagem ponderada normalizada. A contagem total é a soma das contagens médias, das 20 leituras em cada canal, ao longo dos 90 canais. A contagem total real é a soma de todas as leituras efectuadas nos 90 canais. As fórmulas usadas na análise dos dados, obtidos por aplicação do FBRM, encontram-se no Anexo E.

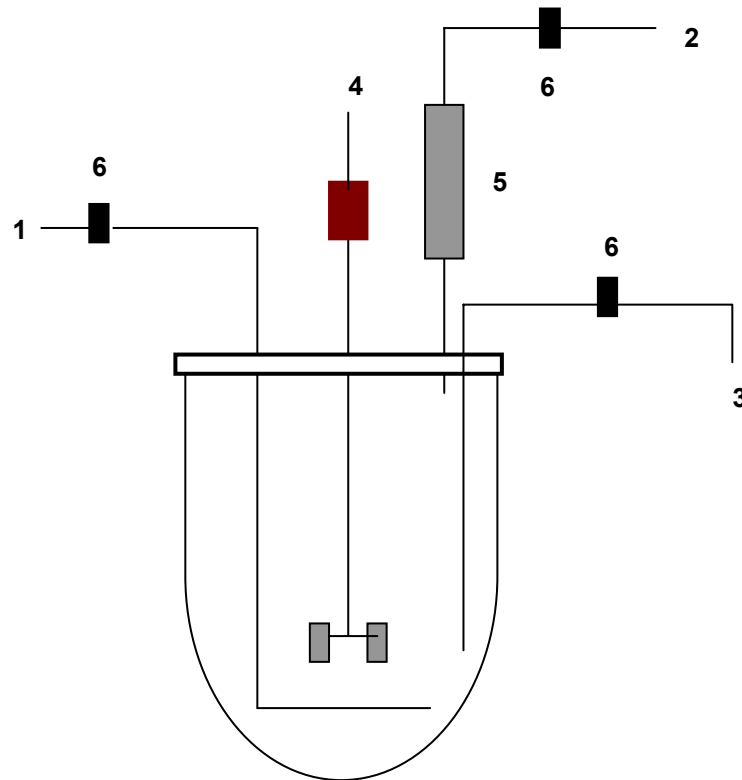
#### 2.2.4. Condições de produção de biomassa em reactor biológico mecanicamente agitado

Na execução deste trabalho utilizaram-se dois fermentadores de 2 L, respectivamente da marca Sétric Génie Industriel, série 2 CV e LH Fermentation, série 210, em sistema descontínuo (figura 2.1.). O arejamento do fermentador foi feito através de um tubo metálico em forma de L e o ar foi esterilizado pela passagem através de um filtro de membrana millipore hidrofóbica, com a porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$ . O caudal de ar injectado no fermentador, foi controlado por um fluxímetro. Os gases que saíram do fermentador, passaram por um condensador, com a finalidade de diminuir as perdas de meio líquido, sendo filtrados por uma membrana Millipore 0,2  $\mu\text{m}$  (figura 2.1.). O oxigénio dissolvido no meio foi medido por intermédio de um eléctrodo Ingold esterilizável.

As características do biorreactor encontram-se na tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** - Características do vaso e da turbina do biorreactor mecanicamente agitado.

CARACTERÍSTICAS DO VASO		CARACTERÍSTICAS DA TURBINA	
VOLUME TOTAL	2,0 L	Nº DE PÁS	2
VOLUME ÚTIL	1,5 L	INCLINAÇÃO DAS PÁS	45 °
ALTURA	20,0 cm	LARGURA DAS PÁS	1,9 cm
ALTURA DO LÍQUIDO	13,0 cm	COMPRIMENTO DAS PÁS	7,0 cm
DIÂMETRO	12,0 cm	DIÂMETRO DA TURBINA	6,0 cm



**Figura 2.1.** – Esquema do biorreator mecanicamente agitado: 1 – entrada do fluxo de ar, com o dispersor de ar, no interior do vaso; 2 – saída de ar; 3 – recolha da amostra; 4 – rotor; 5 – condensador; 6 - filtros.

O fermentador, contendo 1200 mL meio de cultura SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) foi inoculado com 400 mL de suspensão celular com 8 dias de subcultura.

As culturas decorreram à temperatura de  $24 \pm 1$  °C, estando os reactores equipados com uma camisa termostatizada.

A inoculação efectuou-se numa câmara de fluxo laminar. Após a estabilização das condições de temperatura, agitação e arejamento apropriadas ao crescimento celular, procedeu-se à recolha da amostra, correspondente ao tempo zero de crescimento. As restantes amostras foram retiradas diariamente ou de 2 em 2 dias, de forma a permitir a obtenção do perfil de crescimento celular (peso fresco, peso seco, taxa específica de crescimento, produtividade de biomassa e rendimentos) e a caracterização do comportamento da produção dos produtos (proteases e fenóis) em função do consumo dos nutrientes (fonte de carbono, nitratos e fosfatos). Determinou-se ainda o pH e a condutividade da suspensão.

Os ensaios foram repetidos duas vezes, sendo os parâmetros de crescimento obtidos pelo cálculo da média aritmética dos resultados experimentais de cada amostra recolhida e análise do erro padrão.

### **2.2.5. Determinação dos parâmetros de crescimento da cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa***

#### **2.2.5.1. Peso fresco e peso seco**

O peso fresco foi expresso em gramas por litro e foi obtido, por pesagem de 10 mL da suspensão celular, após remoção do sobrenadante por filtração. Os filtros, onde a amostra foi filtrada, foram secos em estufa a 60 °C, durante 4 horas. Após o arrefecimento destes, foram pesados. O peso fresco é a diferença do peso do filtro mais a amostra menos o filtro.

O peso seco, expresso em gramas por litro, foi determinado após secagem das células numa estufa a 60 °C, durante 48 horas.

#### **2.2.5.2. Taxa respiratória**

A taxa respiratória (TR), parâmetro de crescimento celular indirecto, foi medida diariamente e exprime o consumo de oxigénio por unidade de tempo e unidade de volume útil de fermentador. Foi determinada pela variação rectilínea do oxigénio dissolvido na suspensão ao longo do tempo, após interrupção do arejamento durante 20 minutos. O declive da recta, que indica o valor da taxa respiratória, exprime a variação ao longo do tempo da concentração percentual de oxigénio dissolvido na suspensão celular. Sabendo que a concentração de oxigénio em condições saturantes, à temperatura de 25°C e pressão constante de 1 atm, é 244  $\mu\text{mol/L}$ , a taxa respiratória exprime-se em  $\mu\text{mol O}_2 / \text{L} \cdot \text{min}$ .

A taxa respiratória específica (TRE) indica o número de moles de oxigénio consumido por unidade de biomassa produzida e por unidade de tempo ( $\mu\text{mol O}_2 / \text{min} \cdot \text{g.P.S.}$ ). Este parâmetro é a taxa respiratória a dividir pela biomassa produzida (peso seco).

#### **2.2.5.3. Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação**

Tal como nas culturas microbianas, nas culturas de células em suspensão, o crescimento pode exprimir-se em termos de taxa específica de crescimento ( $\mu_g$ ) ou em tempo de duplicação ( $t_d$ ).

A taxa específica de crescimento foi determinada durante a fase exponencial de crescimento. Indica o aumento populacional por unidade de biomassa presente (2.3.).

$$\mu_g = \frac{dx}{dt} \frac{1}{x} \quad (2.3.)$$

Integrando a equação 2.3., obtém-se:

$$x = x_0 e^{\mu_g t} \quad (2.4.)$$

em que  $x_0$  é a quantidade de biomassa inicial num determinado intervalo de tempo e  $x$  é a concentração de biomassa no tempo  $t$ .

Pela logaritmização da equação 2.4., obtém-se a equação da recta (2.5.), a partir da qual se determina o valor de  $\mu_g$ , na fase exponencial do crescimento.

$$\ln x - \ln x_0 = \mu_g t \quad (2.5.)$$

A taxa específica de crescimento é uma constante, independentemente do tempo, na fase exponencial de crescimento, tal como acontece nos sistemas microbianos (Van Uden, 1971). Esta constante, atinge o valor máximo,  $\mu_{max}$ , desde que todos os nutrientes se encontrem em excesso, na presença de uma fonte de carbono e de energia e, para as condições estabelecidas ao crescimento.

O tempo de duplicação é o tempo necessário para duplicar a quantidade de biomassa inicial. Constitui outra forma numérica de exprimir a taxa específica de crescimento celular, sendo traduzida pela equação 2.6., considerando  $x = 2.X_0$  e  $t = t_d$ .

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_g} = \frac{0,693}{\mu_g} \quad (2.6.)$$

#### 2.2.5.4. Coeficientes aparentes de rendimentos de biomassa

Embora seja um parâmetro de quantificação indirecta de biomassa, o coeficiente aparente de rendimento de biomassa em função do substrato -  $Y_{x/s}$  - exprime a quantidade de biomassa produzida ( $dx/dt$ ) em função da taxa de consumo da fonte de carbono e de energia ( $dS/dt$ ), e calcula-se de acordo com a equação 2.7. É normalmente expresso em g peso seco / g de substrato consumido.

$$\frac{dx}{dt} = -Y_{x/s} \frac{dS}{dt} \quad (2.7.)$$

Pode igualmente calcular-se, para sistemas descontínuos (Doran, 1998), de acordo com a equação 2.8.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (2.8)$$

Em que,  $x_0$  é a concentração inicial de biomassa,  $x$  é a concentração de biomassa,  $S_0$  é a concentração inicial de substrato no meio de cultura e  $S$  é a concentração de substrato, existente no meio de cultura, no final da fermentação.

O rendimento de biomassa em função do consumo de oxigénio –  $Y_{x/O_2}$  – foi determinado com base na equação 2.9.

$$Y_{x/O_2} = \frac{\text{Produtividade de biomassa}}{\int_0^{tf} TR \cdot dt} \quad (2.9.)$$

O integral que se encontra na equação 2.9. foi resolvido pela regra do trapézio, recorrendo à folha de cálculo Excel 2002.

#### 2.2.5.5. Produtividade máxima de biomassa

Traduz a quantidade de biomassa máxima produzida por unidade de tempo e por unidade de volume útil de biorreactor. Foi determinada pelo declive de uma recta traçada na curva de crescimento, entre o ponto em que é atingida a biomassa máxima e o inicial. Exprime-se em g peso seco/L.h.

#### 2.2.5.6. Condutividade

A condutividade pode ser considerado um parâmetro indirecto de produção de biomassa, através do consumo de nutrientes, contabilizado pela quantificação do consumo de sais.

A determinação da condutividade das amostras foi feita por leitura directa com um eléctrodo Crison Micro CM 2202, à temperatura ambiente.

O eléctrodo foi calibrado com uma solução padrão Crison 1413  $\mu\text{Scm}^{-1}$ , à temperatura de 25°C.

## 2.2.6. Transferência de massa de oxigénio

### 2.2.6.1. Método Dinâmico

O coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio -  $K_L a$  - mede a resistência que a fase líquida oferece à dispersão das bolhas de ar e transferência do oxigénio para as células. Em sistema descontínuo, utilizou-se o método dinâmico, desenvolvido inicialmente para microrganismos, por Pirt (1975). Este método foi adaptado para cultura de células vegetais por Leckie *et al.* (1991b). O método consiste em duas fases: uma primeira, de desoxigenação total do meio de cultura contido no bioreactor, através do borbulhamento de azoto; seguindo-se uma segunda fase, de arejamento contínuo do meio nutriente. Nesta fase, procede-se ao registo periódico (de 2 em 2 minutos), do aumento na concentração em oxigénio dissolvido no meio de cultura. Por aplicação da equação matemática 2.10., é possível determinar o valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio.

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C_E - C_L) \quad (2.10.)$$

Em que,  $C_L$  é a concentração de oxigénio dissolvido no meio celular (percentagem volumétrica) e  $C_E$  é a concentração de oxigénio saturante, a temperatura e pressão constantes.

Em condições de oxigenação saturante (100 %), a equação 2.10. adquire a forma:

$$\ln(100 - C_L) = -K_L a t \quad (2.11.)$$

O valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa é traduzido pelo declive da recta  $\ln(100 - C_L)$  vs.  $t$ , e é expresso em  $h^{-1}$  ou  $dia^{-1}$ .

Este método tem uma limitação que consiste na sua inaplicabilidade a sistemas biológicos *in vivo*, visto a fase de desoxigenação ser letal para as células. No entanto, é um método adequado para a determinação das condições iniciais de transferência de oxigénio no meio de cultura, previamente à inoculação. É igualmente utilizado para estimar o valor do  $K_L a$  no final da fermentação.

O  $K_L a$  foi determinado para diferentes condições de agitação e arejamento, definidos pelos ensaios. Nestas condições, foram determinados os valores do  $K_L a$  para o meio de cultura SH e para as culturas de células em suspensão no final da fermentação.

## **2.2.7. Determinação da viabilidade celular**

### **2.2.7.1. Método de exclusão com corante**

Utilizou-se o método descrito por Keβler & Furusaki (1997) para estimar a viabilidade celular, utilizando o corante Evans Blue. Este é um método de exclusão em que o corante Evans Blue penetra, por difusão, nas células que apresentam rupturas na membrana plasmática. Neste caso, apenas as células não viáveis são coradas. A vantagem deste método é que é rápido e não necessita de nenhum equipamento especial. No entanto, como as células vegetais formam agregados, a contagem destas pode tornar-se tediosa e complicada.

Procedimento:

Diluiu-se a suspensão celular de 1:10 com uma solução de  $\text{KNO}_3$  2,5 g/L, de forma a facilitar a contagem das células. À suspensão celular diluída adicionou-se 0,1 mL da solução aquosa de Evans Blue 1% (p/v). Agitou-se com cuidado e deixou-se em repouso durante 5 min, de modo ao corante difundir pela membrana das células não viáveis.

A preparação foi observada ao microscópio (Olympus BH-2), com uma objectiva 10x (Olympus).

A viabilidade é expressa em percentagem, como sendo a razão entre o número de células viáveis e o número total de células presentes.

### **2.2.7.2. Coloração com diacetato de fluoresceína (Teste FDA)**

Para estimar a viabilidade celular, utilizou-se o método descrito por Larkin (1976), utilizando o diacetato de fluoresceína (FDA). O diacetato de fluoresceína é um composto fluorescente usado na determinação da viabilidade celular. As moléculas de FDA passam livremente através da membrana plasmática. A ligação química acetato-fluoresceína deste composto é hidrolisada por acção da enzima esterase, presente nas células activas, libertando a molécula de fluoresceína. As células viáveis são identificadas por serem visíveis à luz ultravioleta, por excitação da fluoresceína acumulada.

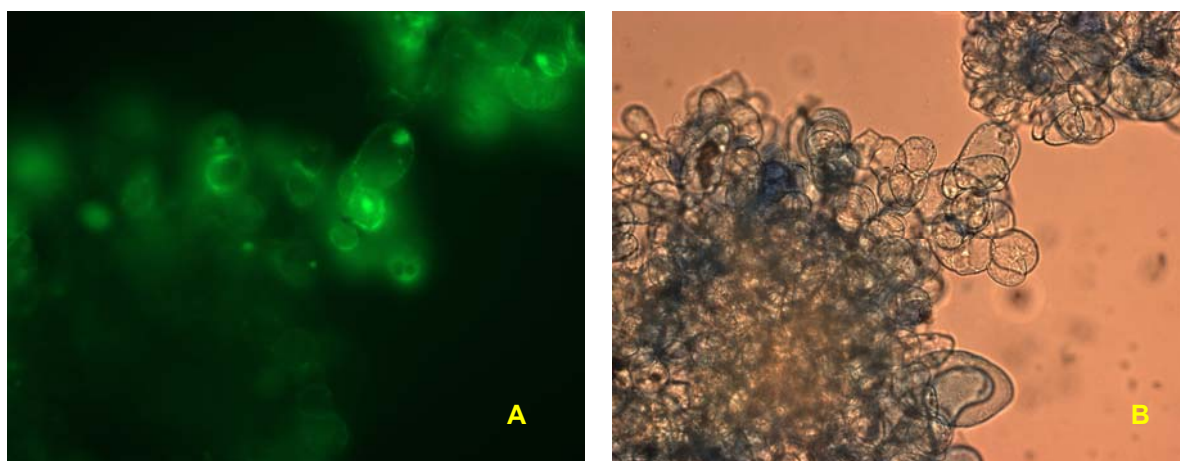
Procedimento:

Diluiu-se a suspensão celular de 1:10 com uma solução de  $\text{KNO}_3$  2,5 g/L, de forma a facilitar a contagem celular. A 5 mL da suspensão celular diluída adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de FDA 5 mg/mL, preparada em acetona. Esta preparação foi observada ao

microscópio de fluorescência (Zeiss – Axioplan 2 Imaging), após 5 min de exposição à radiação ultra-violeta. O programa utilizado para recolha das imagens foi AxioVision 3.0.6.1.

A viabilidade é expressa em percentagem, como sendo a razão entre o número de células viáveis e o número total de células presentes.

Os métodos para determinação da viabilidade celular, utilizando o corante Evans Blue e o FDA, foram testados com as células em suspensão de *C. calcitrapa*. Enquanto o método que utiliza o diacetato de fluoresceína (FDA) apresenta as células viáveis, o Evans Blue cora as células não viáveis. Como é observado na figura 2.2., estes dois métodos encontram-se validados para as células em suspensão de *C. calcitrapa*, visto os resultados obtidos serem antagónicos. Assim, por uma questão de simplicidade operacional, a viabilidade celular será determinada sempre segundo o método de exclusão com o corante Evans Blue.



**Figura 2.2.** – Suspensão de células de *C. calcitrapa* coradas com o corante diacetato de fluoresceína (A) e com o corante Evans Blue (B).

## 2.2.8. Métodos Analíticos

### 2.2.8.1. Extracção enzimática

O meio de cultura foi removido da suspensão celular por filtração das células sob vácuo. Estas foram em seguida lavadas com tampão de extracção, TME (Tris/HCl 50 mM contendo EDTA 1 mM e ME 3 mM) pH 5,8.

As células foram rebentadas por sonicação, com vista à libertação das proteínas para o meio, conforme descrito por Raposo (1993). A sonicação (VibraCell, modelo VC-300) decorreu durante 3 min, com uma frequência com amplitude de 12 microns, condições consideradas óptimas em estudos prévios (Raposo, 1993).

Após a sonicação procedeu-se à centrifugação do extracto celular a 3000 rpm, durante 10 min, em centrífuga refrigerada a 4°C, de forma a separar o extracto enzimático dos fragmentos celulares.

### 2.2.8.2. Quantificação da actividade proteolítica

A actividade proteolítica da suspensão celular foi determinada pelo método de Twining (1984).

Utilizou-se como substrato a caseína derivatizada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 1%. O FITC é considerado um bom marcador para proteínas por apresentarem elevada fluorescência, após reacção com os grupos amina destas.

O complexo formado, FITC-caseína, é igualmente considerado um bom substrato para muitas proteases, por ser solúvel, fisiologicamente idêntico a outros substratos, fácil de preparar, estável quando armazenado e pouco dispendioso (Twining, 1984).

Procedimento:

Preparação do substrato: dissolveu-se 1g de caseína em 100 mL de tampão carbonato 50 mM, pH 9,5, contendo 150 mM NaCl. À solução obtida, adicionou-se 40 mg de FITC, originando uma solução alaranjada que foi mantida sob agitação à temperatura ambiente, durante 3 h. Os grupos de FITC que não reagiram, permanecendo livres, foram removidos através de quatro diálises: duas, em suspensão de carvão activado a 4°C; uma, em tampão 50 mM Tris pH 8,5, seguida de uma última em tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,2. A concentração foi ajustada para 1% de proteína pela adição de 50 mM Tris/HCl pH 7,2, até um volume final de 100 mL.

Num tubo eppendorf adicionou-se 10 µL do substrato, 10 µL de extracto celular e 30 µL de tampão citrato 0,2 M, pH 5,1. A mistura obtida foi incubada a 37 °C durante 1 h, num banho termostaticado.

A reacção foi terminada com a adição de 120 µL de TCA a 5 %. A solução foi centrifugada a 10 000 rpm, durante 5 min. A 100 µL do sobrenadante foram adicionados 2,9 mL de Tris/HCl 500 mM, pH8,5.

A fluorescência relativa foi lida num espectrofluorímetro (Jasco, modelo FP-777) a um comprimento de onda de excitação de 495 nm, e a um comprimento de onda de emissão de 525 nm. O máximo de fluorescência relativa corresponde a uma amostra em que o extracto

celular foi substituído por citrato 0,2 M, pH 5,1 e a solução de TCA por tampão de diluição final da amostra.

O branco foi preparado substituindo apenas o extracto celular por citrato 0,2M, pH 5,1, correspondendo deste modo, aos grupos de FITC livres.

A actividade proteolítica é definida como sendo o aumento de fluorescência relativa em relação ao branco.

Cada ensaio foi realizado em triplicado.

### **2.2.8.3. Quantificação da proteína intracelular**

A quantidade de proteína foi doseada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro de albumina bovina (BSA) purificada como proteína padrão.

Trata-se de um método em que o único reagente necessário é estável durante bastante tempo, tem sensibilidade para detectar menos de 1 µg de proteína e não apresenta interferências significativas de aminoácidos livres nem de outras substâncias químicas, como é o caso do método de Lowry (Ausubel & Frederick, 1989).

O método baseia-se no facto dos aniões do corante azul de Coomassie G-250 reagirem com os grupos amina da proteína, originando uma cor azulada. O complexo proteína-reagente apresenta absorção máxima no comprimento de onda 595 nm e possui um coeficiente de extinção elevado, o que o torna bastante sensível para a quantificação do teor proteico. O tempo de complexação é rápido, cerca de 2 min, e o produto final da reacção é estável, durante aproximadamente uma hora. A concentração da proteína, presente na amostra, é proporcional ao aumento de absorvância, de acordo com a lei de Lambert-Beer (Bradford, 1976).

Procedimento:

A curva padrão foi obtida através da leitura da absorvância a 595 nm, de soluções de albumina bovina purificada (BSA), num intervalo de concentrações de 1-10 µg/mL.

A 900 µl de amostra, foram adicionados 100 µl de solução reagente azul de Coomassie. Após agitação e se ter aguardado 10 min, procedeu-se à leitura da absorvância a 595 nm.

#### 2.2.8.4. Quantificação dos açúcares redutores no meio de cultura

O consumo da glucose, utilizada como fonte de carbono, foi determinado pelo método de Bernfeld (1955).

Este método consiste na redução em meio alcalino do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) a 3-amino-5 nitrossalicílico, por acção dos açúcares redutores. Esta redução origina um complexo acastanhado, que é doseado colorimetricamente, no comprimento de onda de 540 nm.

Procedimento:

O reagente DNS foi preparado com base em duas soluções:

Solução I: a 100 mL de solução de hidróxido de sódio 2 N, adicionaram-se a quente 5 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico.

Solução II: solução de tartarato duplo de sódio e potássio (66 g/L).

A 100 mL da solução I adicionaram-se a quente 250 mL da solução II e fez-se o volume para 500 mL.

A curva padrão foi obtida por leitura da absorvância a 540 nm, de soluções de glucose, com um intervalo de concentrações de 0 – 1 mg/mL.

A 1 mL da solução de açúcar redutor adicionou-se 1 mL do reagente DNS. Após agitação, aqueceu-se em banho-maria fervente, durante 5 min. Arrefeceu-se à temperatura ambiente e adicionaram-se 10 mL de água destilada. Procedeu-se à leitura da absorvância a 540 nm.

#### 2.2.8.5. Quantificação dos fenóis excretados para o meio de cultura

A quantidade de fenóis excretados para o meio de cultura foi determinada pelo método espectrofotométrico directo (Anselmo *et al.*, 1985), baseado na propriedade de absorção máxima a 270 nm, para compostos aromáticos.~

Procedimento:

A concentração de fenóis foi determinada pela leitura da absorvância do sobrenadante, ao comprimento de onda referido, em cuvete de quartzo apropriada ao espectrofotómetro. O

controlo foi efectuado pela leitura da absorvância no mesmo comprimento de onda, do meio de cultura esterilizado.

O conteúdo de fenóis presente no sobrenadante, foi determinado pela correlação linear entre diferentes diluições de fenol e respectivas absorvâncias, que constituíram a recta padrão.

A recta padrão foi obtida por leitura da absorvância a 270 nm, de soluções de fenol, com um intervalo de concentrações de 0 – 50 µg/mL.

#### **2.2.8.6. Quantificação dos nitratos no meio de cultura**

A quantidade de nitratos presentes no meio de cultura foi medida directamente por um eléctrodo Crison GLP 22. O eléctrodo foi calibrado com soluções de diferentes concentrações de nitrato de potássio ( $10^{-3}$  –  $10^{-1}$  mol/L  $\text{NO}_3^-$ ).

Procedimento:

A solução padrão de nitrato ( $10^{-1}$  mol/L) foi preparada em água desionizada, por dissolução de 10,11 g nitrato de potássio, que foi previamente seco a 120 °C, durante 2 h. A solução de ajuste da força iónica, solução ISA, é uma solução de sulfato de alumínio 0,9 mol/L, preparada em água desionizada.

As amostras e soluções de calibração foram preparadas por adição de 2 partes de solução ISA para 100 partes do volume da amostra.

#### **2.2.8.7. Quantificação do fósforo inorgânico no meio de cultura**

A determinação da concentração de fósforo inorgânico total no meio de cultura foi efectuada por um método colorimétrico, que se baseia numa reacção de complexação do fósforo pelo molibdato de amónio e vanadato de amónio (Tausky & Shorr, 1953).

O produto da reacção adquire coloração amarela e foi quantificado espectrofotometricamente no comprimento de onda 375 nm.

Procedimento:

O reagente misto foi preparado com base em duas soluções, misturadas na proporção de 1:1. Uma de molibdato de amónio 5 % (p/v) e outra de vanadato de amónio 0,25 %. Para fazer a solução de vanadato de amónio 0,25 % dissolveu-se 2,5 g de vanadato de amónio

em 500 mL de água quente. Arrefeceu-se e adicionou-se 350 mL de ácido nítrico concentrado. Perfez-se para 1 L com H<sub>2</sub>O ultra-pura, após a solução ter arrefecido. Deve ser utilizado imediatamente após a preparação.

A recta padrão foi obtida através da leitura da absorvância a 375 nm, de uma solução de di-hidrogeno fosfato de potássio, num intervalo de concentrações de 0 – 100 ppm.

A 2,5 mL de amostra adicionou-se 1 mL da solução de reagente misto. Agitou-se e deixou-se em repouso 15 min à temperatura ambiente. Após a incubação, perfez-se o volume para 12,5 mL e procedeu-se à leitura da absorvância a um comprimento de onda de 375 nm.

### 2.2.9. Determinação dos tempos de mistura

Os tempos de mistura foram determinados segundo o método descrito por Menisher *et al.* (2000). Este método consiste na adição de 0,33 mL de uma solução indicador de fenolftaleína a 0,5% (p/v) em solução alcoólica e de 0,5 mL de hidróxido de sódio 1M, ao vaso do biorreactor, contendo 1,6 L de água destilada. Sob condições básicas, a água toma uma coloração rosa. Convém deixar a agitar alguns minutos para que a coloração se torne homogénea por todo o vaso. Posteriormente, adicionou-se 0,58 mL de ácido clorídrico 1 M. A adição do ácido é extremamente importante porque deve ser um processo rápido e dar-se sempre no mesmo local. O tempo de mistura define-se como sendo o tempo que demora a desaparecer a cor de rosa da fenolftaleína, diluída no hidróxido de sódio, pela adição de uma quantidade fixa de excesso de ácido clorídrico, em todo o vaso do biorreactor.

### 2.2.10. Caracterização reológica das células em cultura de *Centaurea calcitrapa*

A caracterização reológica das células em suspensão de *C. calcitrapa* foi realizada à temperatura ambiente com um viscosímetro rotativo, tipo RVT com um adaptador acoplado para baixas viscosidades (UL Adapter). A velocidade de corte variou entre 6,12 e 61,15 s<sup>-1</sup>. A tensão de corte ( $\tau$ ) e a velocidade de corte ( $\gamma$ ) foram calculadas com base nos valores de leituras do viscosímetro e na rotação do *spindle* (rpm), de acordo com as seguintes equações:

$$\tau \text{ (Nm}^{-2}\text{)} = 0,07829 \cdot \text{Leitura do Viscosímetro} \quad (2.12.)$$

$$\gamma \text{ (s}^{-1}\text{)} = 1,224 \cdot \text{Rotação} \quad (2.13.)$$

O comportamento reológico da cultura foi ajustado ao modelo de Ostwald-de Waele (Lei da Potência):

$$\tau = K \gamma^n \quad (2.14.)$$

em que, é  $\tau$  a tensão de corte (*shear stress*) ( $\text{Nm}^{-2}$ ),  $K$  é o índice de consistência do fluido ( $\text{Ns}^n\text{m}^{-2}$ ), é  $\gamma$  a velocidade de corte (*shear rate*) ( $\text{s}^{-1}$ ) e  $n$  é o índice de comportamento do fluido (-).

Quando  $n < 1$ , o fluido tem um comportamento pseudoplástico, para  $n = 1$  o fluido é Newtoniano e para  $n > 1$ , o fluido apresenta um comportamento dilatante.

A viscosidade aparente da suspensão foi determinada pela multiplicação de um factor característico do *spindle* (ver Anexo F) pelo valor obtido da leitura no viscosímetro.

As leituras foram feitas 10 s após a amostra ser colocada no recipiente do adaptador, de forma a evitar a sedimentação das células.

Os valores obtidos são válidos para o regime laminar, ou seja, quando o Número de Reynolds (Re) do agitador é inferior a 200 (Doran, 1998).

### 2.2.11. Parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico

Quatro importantes parâmetros foram utilizados para quantificar o stresse hidrodinâmico gerado pelo agitador nas culturas de *C. calctrapa*, crescidas em reactor biológico mecanicamente agitado.

#### 2.2.11.1. Velocidade da ponta do agitador (*impeller tip speed*)

A velocidade da ponta do agitador ( $v_i$ ) é calculada com base na velocidade de agitação ( $N$ ) e no diâmetro do agitador ( $D_i$ ).

$$v_i = \pi N D_i \quad (2.15.)$$

#### 2.2.11.2. Potência volumétrica do agitador

A potência volumétrica transmitida pelo agitador ( $P/V$ ) num sistema não arejado e mecanicamente agitado é traduzida pela equação 2.16.

$$\frac{P}{V} = \rho N_p N^3 \frac{D_i^5}{V_L} \quad (2.16.)$$

em que,  $\rho$  é massa específica da suspensão ( $\text{Kgm}^{-3}$ ),  $N_p$  é o número de potência (-),  $N$  é a velocidade de agitação ( $\text{s}^{-1}$ ),  $D_i$  é o diâmetro da turbina (m) e  $V_L$  é o volume de suspensão ( $\text{m}^3$ ).

O número de potência depende do tipo de agitador, da geometria do vaso e do número de Reynolds (Re). Para fluidos pseudoplásticos em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado, determinou-se o Número de Reynolds (2.17),

$$\text{Re} = \frac{D_i^2 N \rho}{\mu_a} \quad (2.17.)$$

em que,  $\rho$  é a massa específica da suspensão ( $\text{Kgm}^{-3}$ ),  $N$  é a velocidade de agitação ( $\text{s}^{-1}$ ),  $D_i$  é o diâmetro da turbina (m) e  $\mu_a$  é a viscosidade aparente da suspensão ( $\text{Nsm}^{-2}$ ). A massa específica da suspensão foi determinada pela pesagem de um volume conhecido.

O número de Reynolds permite a determinação do tipo de regime em que a suspensão crescida em reactor biológico se encontra. Assim, para  $\text{Re} < 10$ , o regime é inteiramente laminar. Para valores de Re entre 10 e  $10^4$ , o regime encontra-se em estado transitório, tornando-se cada vez mais turbulento. Para  $\text{Re} > 10^4$ , o regime do fluido é completamente turbulento. No caso de fluido pseudoplásticos, o regime laminar do fluido estende-se até  $\text{Re} = 200$  (Doran, 1998).

Rushton *et al.* (1950) propuseram correlações que relacionam a potência do agitador para sistemas não arejados com o número de Reynolds, para diferentes agitadores e em diferentes condições operacionais.

### 2.2.11.3. Velocidade de corte média e máxima

O cálculo da velocidade de corte média e máxima em reactores biológicos mecanicamente agitados é difícil. Para a cultura de células vegetais em sistema descontínuo, a velocidade de corte média, para um agitador de pás inclinadas, foi estimada usando a equação desenvolvida por Calderbank e Moo-Young (1959) e Metzner *et al.* (1961). Segundo estes autores, a velocidade de corte média ( $\gamma_{\text{MÉDIA}}$ ), equação 2.18., em torno do agitador para fluidos pseudoplásticos ou do tipo de Bingham é independente do tipo de agitador, do seu tamanho ou do tamanho relativo do vaso.

$$\gamma_{\text{MÉDIA}} = k N \quad (2.18.)$$

Segundo os autores Calderbank e Moo-Young (1959) e Metzner *et al.* (1961) o valor proposto para o  $k$ , para fluidos pseudoplásticos e dilatantes, é de 10.

De acordo com Midler e Finn (1966) e na ausência de melhores correlações empíricas, a velocidade de corte máxima para um agitador de pás inclinadas é rotineiramente avaliada pela velocidade da ponta do agitador (*impeller tip speed*), traduzida pela equação 2.15.

#### 2.2.11.4. Energia dissipada média

A energia dissipada média ( $\bar{\varepsilon}$ ) foi calculada segundo a equação proposta por Kieran *et al.* (2000) para biorreactores mecanicamente agitados (2.19.),

$$\bar{\varepsilon} = \frac{P}{\rho V} = \frac{N_p N^3 D_i^5}{V} \quad (2.19.)$$

em que,  $N$  é a velocidade de agitação ( $s^{-1}$ ),  $D_i$  é o diâmetro do agitador (m),  $N_p$  é o número de potência para o tipo de agitador considerado e nas condições em que o número de Reynolds foi determinado e  $V$  é o volume considerado de dissipação.

Num sistema quando consideramos condições de tensão hidrodinâmicas, duas regiões distintas podem ser identificadas num biorreactor mecanicamente agitado: (a) uma região de elevada tensão, que se situa em volta do agitador; normalmente engloba cerca de 1 a 5 % do volume total da suspensão considerada. Nesta região a turbulência é elevada, sendo a energia dissipada média 100 vezes superior à  $\bar{\varepsilon}$  em todo o vaso; (b) a outra região é o restante volume do vaso, em que a energia dissipada é cerca de  $0,25 \bar{\varepsilon}$  (Kresta, 1998).

Neste estudo, o volume considerado para o cálculo da energia dissipada média foi o volume total da suspensão (1,5 L).

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1. Crescimento das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em sistema descontínuo – Erlenmeyer

#### 2.3.1.1. Influência da concentração da fonte de carbono no crescimento das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*

O objectivo deste estudo é a optimização da concentração da fonte de carbono (glucose) no crescimento das culturas em suspensão de *Centaurea calcitrapa*.

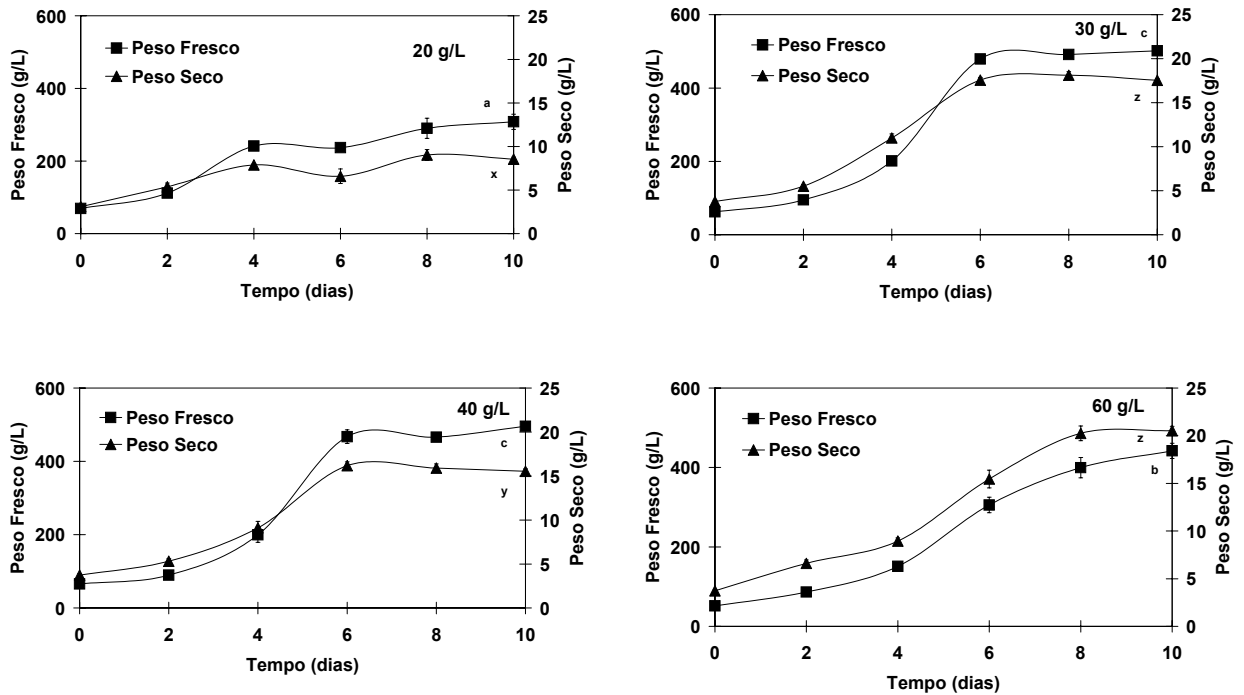
As culturas em suspensão de *C. calcitrapa* crescidas em Erlenmeyer foram caracterizadas em termos dos parâmetros de crescimento, definidos no ponto 2.2.5., e das características reológicas da cultura. Os resultados obtidos com este estudo serviram ainda como termo de comparação para o crescimento em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

##### 2.3.1.1.1. Perfil de crescimento

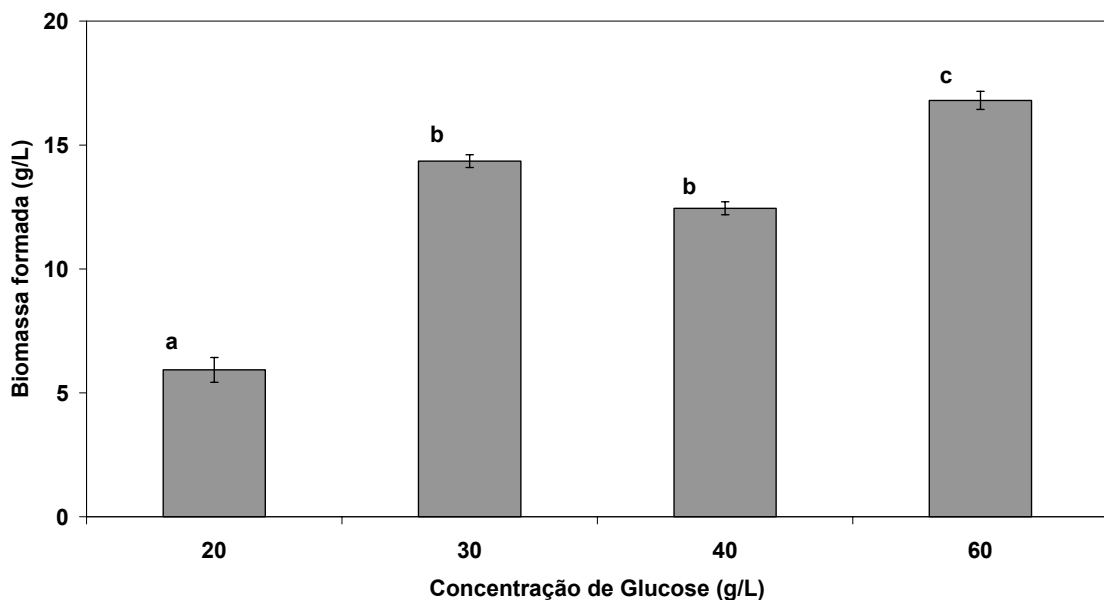
Os crescimentos das culturas de *C. calcitrapa*, para as diferentes concentrações de fonte de carbono testadas, apresentam um comportamento semelhante ao dos sistemas microbianos. Neste estudo, foram testadas quatro concentrações de glucose: 20, 30, 40 e 60 g/L.

As suspensões celulares de *C. calcitrapa* crescidas em meio de cultura SH, apresentam uma fase de latência de cerca dois dias, com excepção da cultura com 60 g/L de glucose, que tem a duração de quatro dias (figura 2.3.). A esta fase, segue-se a fase exponencial de crescimento, que termina ao quarto dia, para a cultura com a concentração mais baixa de glucose (20 g/L), ao sexto dia para as concentrações de 30 e 40 g/L e ao oitavo dia, para a cultura com 60 g/L de glucose. Com o aumento da concentração inicial de fonte de carbono, verifica-se a extensão da fase exponencial no ciclo de crescimento desta cultura. A fase exponencial é seguida pela fase estacionária, em que a biomassa celular se mantém constante.

A figura 2.4. apresenta a biomassa máxima formada, ou seja, a diferença entre a biomassa máxima e a inicial, em cada um dos crescimentos, para diferentes concentrações de glucose. Observa-se um aumento da quantidade de biomassa formada com o aumento da concentração inicial de fonte de carbono, com excepção da cultura com 40 g/L, em que se verifica um pequeno decréscimo da biomassa, relativamente à cultura com 30 g/L.



**Figura 2.3.** – Perfis de crescimento da suspensão celular de *C. calcitrapa*, cultivadas em Erlenmeyer, para diferentes concentrações de glicose: 20, 30, 40 e 60 g/L.. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=6$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , perfis de Peso Fresco (a, b, c) e Peso Seco (x, y, z) com letras diferentes representam curvas médias significativamente diferentes).



**Figura 2.4.** – Biomassa máxima formada para as culturas de *C. calcitrapa*, cultivadas em Erlenmeyer, com diferentes concentrações iniciais de glicose. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=6$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , letras diferentes representam médias significativamente diferentes).

Na tabela 2.3. são apresentados os parâmetros de crescimento das culturas de *C. calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer com diferentes concentrações iniciais de glucose. A concentração de 20 g/L de glucose destaca-se das restantes concentrações, por apresentar valores bastante inferiores da produtividade e do rendimento de biomassa. A taxa específica de crescimento é também ligeiramente inferior. Em termos de taxa específica de crescimento e de produtividade de biomassa, a melhor resposta foi obtida para a concentração de 30 g/L de glucose. A concentração de 40 g/L apresenta um valor de taxa específica de crescimento similar à obtida para 30 g/L. Em termos de produtividade de biomassa, a concentração de glucose de 60 g/L apresenta uma produtividade de biomassa elevada, a seguir à concentração de 30 g/L. Esta cultura apresenta igualmente um valor de rendimento de biomassa em função do consumo de substrato elevado. A cultura com 30 g/L de glucose tem um rendimento de biomassa em função do consumo de substrato ligeiramente inferior. No entanto, pode-se dizer que os valores das produtividades de biomassa e rendimentos de biomassa em função do consumo de substrato são semelhantes para as concentrações de glucose de 30, 40 e 60 g/L.

**Tabela 2.3.** – Parâmetros de crescimento da cultura de células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivada em Erlenmeyer, para diferentes concentrações de glucose.

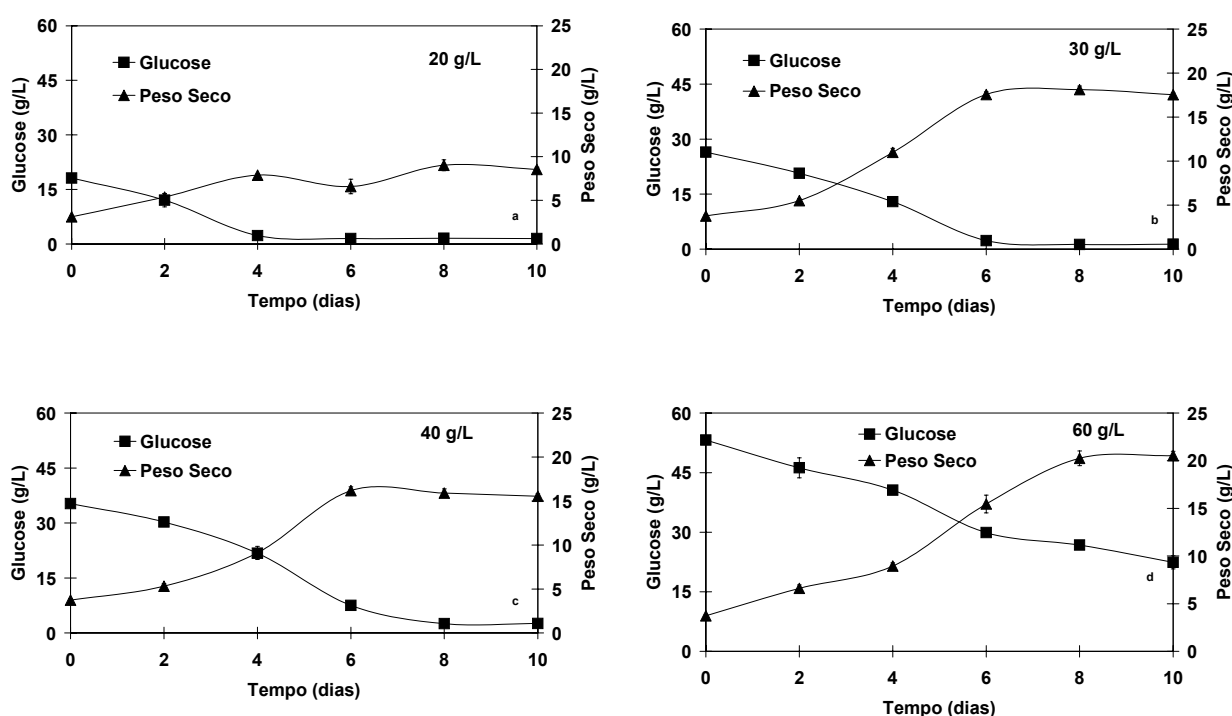
GLUCOSE (g/L)	$\mu_g$ (dia <sup>-1</sup> )	$t_d$ (h)	PRODUTIVIDADE BIOMASSA MÁXIMA (g PS/L.dia)	$Y_{X/S}$ (g PS/g Glucose)	$q_s$ (g Glucose/g PS.dia)
20	0,233	2,98	1,198	0,423	0,551
30	0,290	2,39	3,018	0,671	0,432
40	0,278	2,49	2,713	0,532	0,523
60	0,234	2,96	2,825	0,761	0,268

Contudo, as células de *C. calcitrapa* crescidas em meio SH com 60 g/L de glucose apresentaram uma taxa específica de consumo de glucose,  $q_s$ , de 0,268 g/g.dia, sendo este o menor valor, obtido neste ensaio, o que é expectável pelas elevadas concentrações de substrato. Observando o consumo de glucose destas culturas (figura 2.5.), crescidas em meio SH com diferentes concentrações de fonte de carbono, verifica-se que para a concentração de 20 g/L o esgotamento desta se verifica ao 4º dia de cultura, enquanto para 30 g/L de glucose é ao 6º dia e para a concentração de 40 g/L de glucose, o esgotamento apenas se dá ao 8º dia. Para a concentração de 60 g/L, não se verifica esgotamento da fonte de carbono ao longo do ciclo de crescimento, o que significa que a fonte de carbono

não foi limitante ao crescimento celular. A fase exponencial de crescimento é prolongada com o aumento da concentração da fonte de carbono. O mesmo se constatou com culturas em suspensão de *Taxus chinensis*, em que o tempo de cultura até à exaustão do açúcar aumenta com o aumento da concentração inicial de sacarose no meio (Kim *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos neste ensaio, são indicativos de que a concentração de 30 g/L de glucose é a melhor para o crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*.

Os resultados obtidos são concordantes com os referidos por Rodrigues (2002), em que células de *C. calcitrapa* estabelecidas em sacarose, apresentaram taxas específicas de crescimento de 0,2042 e 0,2311 dia<sup>-1</sup> para as concentrações de 20 e 30 g/L de sacarose, respectivamente. O crescimento celular mostrou-se limitativo, tanto para baixas concentrações de sacarose (15 g/L) como para elevadas, levando à diminuição da taxa específica de crescimento com o aumento da concentração de sacarose de 30 para 50 g/L.



**Figura 2.5.** – Influência das diferentes concentrações iniciais de fonte de carbono (glucose) no crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas Erlenmeyer. Valores médios ± erro padrão (n=3, Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , curvas da Glucose com letras diferentes representam curvas médias significativamente diferentes).

Estudos realizados com células de *Cynara cardunculus* para concentrações de sacarose entre 10 e 80 g/L, apresentaram a melhor taxa específica de crescimento para as

concentrações de 20 e 30 g/L e a melhor produtividade em biomassa para a concentração de 30 g/L de sacarose no meio de cultura. O aumento da concentração de substrato, entre 40 e 80 g/L, originou um decréscimo das taxas específicas de crescimento, da produtividade e rendimento aparente de biomassa (Lima-Costa, 1994).

O crescimento celular e a produção de ginseng pelas células em suspensão de *Panax ginseng* foram investigados para diferentes concentrações iniciais de sacarose (Akalezi *et al.*, 1999). Aumentando a concentração inicial de sacarose no meio de cultura de 30 para 60 g/L, a biomassa formada e a produção de ginseng aumenta consideravelmente. O máximo de biomassa formada foi de 22,4 g PS/L para uma concentração inicial de sacarose de 60 g/L. Uma concentração mais elevada da fonte de carbono (80 g/L) provocou um decréscimo na biomassa formada, não afectando contudo a produção de ginseng.

O efeito da concentração inicial de sacarose no crescimento de suspensões celulares de *Taxus chinensis* (Kim *et al.*, 2001) apresenta resultados similares aos obtidos neste trabalho com as células de *C. calcitrapa* crescidas com glucose. Estes autores testaram concentrações de sacarose num intervalo de 20 a 100 g/L, obtendo a taxa específica de crescimento máxima para a concentração de 20 g/L. A biomassa formada e o rendimento aumentaram com o aumento da concentração da fonte de carbono. A produtividade aumentou nas culturas cultivadas até uma concentração de 60 g/L de sacarose, verificando-se a sua diminuição para concentrações superiores. As células crescidas em meio com uma concentração elevada de açúcar (80 g/L), apresentaram as paredes celulares separadas do citoplasma, causando a inibição do crescimento celular. O metabolismo das células pode sofrer perturbações, devido ao elevado stresse osmótico, resultando na supressão e declínio do crescimento celular (Kim *et al.*, 2001).

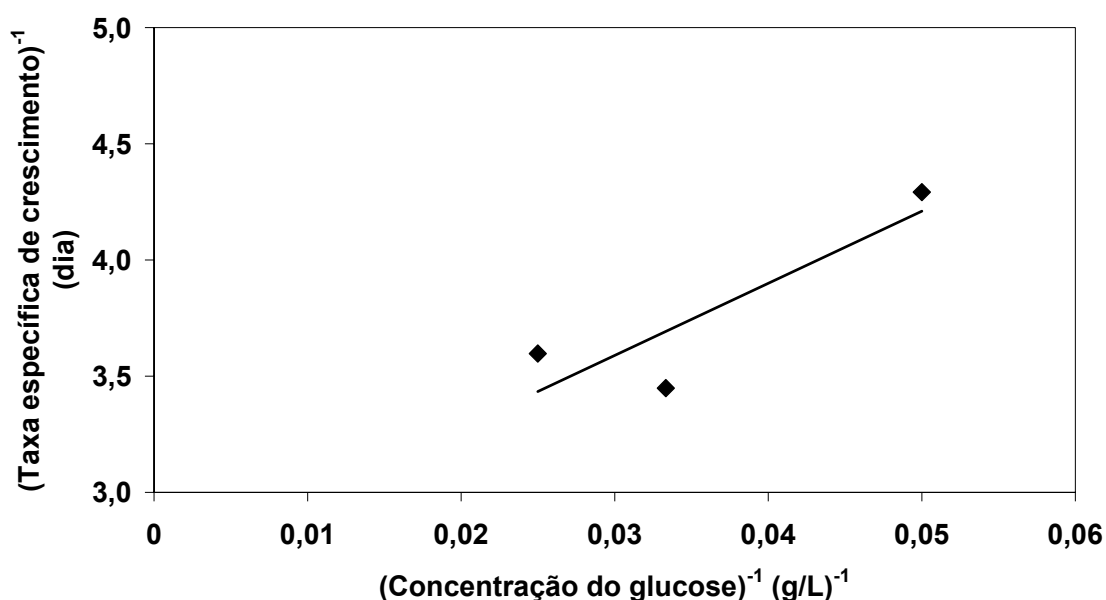
Suspensões celulares de *Marchantia polymorpha* crescidas em meio com glucose, como fonte de carbono, a diferentes concentrações, apresentaram uma produtividade máxima em biomassa e em ácidos gordos insaturados para a concentração de glucose de 20-30 g/L. O aumento da concentração de glucose resultou na diminuição da produção de ácidos gordos insaturados e da produtividade de biomassa (Chiou *et al.*, 2001). Também, segundo estes autores, o aumento da concentração de açúcar resulta no aumento da pressão osmótica, inibindo o crescimento celular e reduzindo a produtividade de ácidos gordos insaturados.

#### **2.3.1.1.2. Aplicação do modelo de Monod**

A aplicação do modelo de Monod permite, através da determinação dos coeficientes cinéticos,  $K_m$  e  $\mu_{max}$ , avaliar a afinidade relativa do organismo para o substrato e a taxa específica máxima de crescimento, respectivamente. Os coeficientes  $K_m$  e  $\mu_{max}$ , foram determinados para as concentrações de glucose de 20, 30 e 40 g/L, utilizando a

representação gráfica de Lineweaver-Burk (figura 2.6.). Para o  $K_m$  obteve-se um valor de 11,80 g/L enquanto para o  $\mu_{max}$  foi de 0,38 dia<sup>-1</sup>. A cultura estabelecida com 60 g/L de glucose não foi considerada por apresentar limitações à aplicação do modelo de Monod, não se verificando neste caso esgotamento da fonte de carbono.

Como foi descrito no capítulo 2.2.2.2., o modelo de Monod apresenta algumas limitações. No entanto, apesar dessas limitações de aplicabilidade deste modelo a células vegetais, o crescimento da suspensão celular de *Dioscorea deltoidea* em fermentador mecanicamente agitado de 14 L, foi descrito pela cinética estabelecida de Monod, apresentando uma constante de saturação de 7g/L (Drapeau *et al.*, 1986). Igualmente, Lima-Costa (1994) caracterizou as células em suspensão de *Cynara cardunculus*, cultivadas a diferentes concentrações de sacarose, entre 10 e 40 g/L, com base na cinética de Monod.



**Figura 2.6.** – Representação de Lineweaver-Burk para a cinética de crescimento da suspensão de células de *C. calcitrapa*, crescidas em glucose.

Na tabela 2.4. são apresentados os valores das constantes cinéticas  $K_m$  e  $\mu_{max}$ , obtidas neste trabalho e referenciadas na bibliografia, para diferentes espécies vegetais e diferentes fontes de carbono. O valor de  $K_m$  obtido para as células de *C. calcitrapa* crescidas em glucose, é menor que o obtido, quando estas são crescidas num meio com sacarose. Estas suspensões celulares, crescidas num meio com glucose, apresentam uma maior afinidade para este substrato. As células de *Cynara cardunculus* apresentam um valor elevado da constante de afinidade, reflectindo uma menor afinidade destas células para com o substrato usado (sacarose).

**Tabela 2.4.** – Constantes cinéticas características da utilização da fonte de carbono no crescimento celular de diferentes espécies vegetais.

ESPÉCIE VEGETAL	SUBSTRATO	$K_M$ (g/L)	$\mu_{MAX}$ (dia <sup>-1</sup> )	REFERÊNCIA
<i>Centaurea calcitrapa</i>	Glucose	11,80	0,38	Este trabalho
<i>Centaurea calcitrapa</i>	Sacarose	19,49	0,59	Rodrigues (2002)
<i>Cynara cardunculus</i>	Sacarose	30,10	0,88	Lima-Costa (1994)
<i>Dioscorea deltoidea</i>	Sacarose	7,00	0,36	Drapeau <i>et al.</i> (1986)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Glucose	0,25	0,92	Kato & Tsuji (1981)
	Frutose	0,94	0,92	
<i>Acer pseudoplatanus</i>	Glucose	0,50	---	King (1977)

As suspensões celulares de *N. tabacum* e *A. pseudoplatanus* apresentam uma elevada afinidade para os substratos usados. Os valores das constantes de afinidade são substancialmente menores que os referidos na tabela 2.4. para outras espécies vegetais.

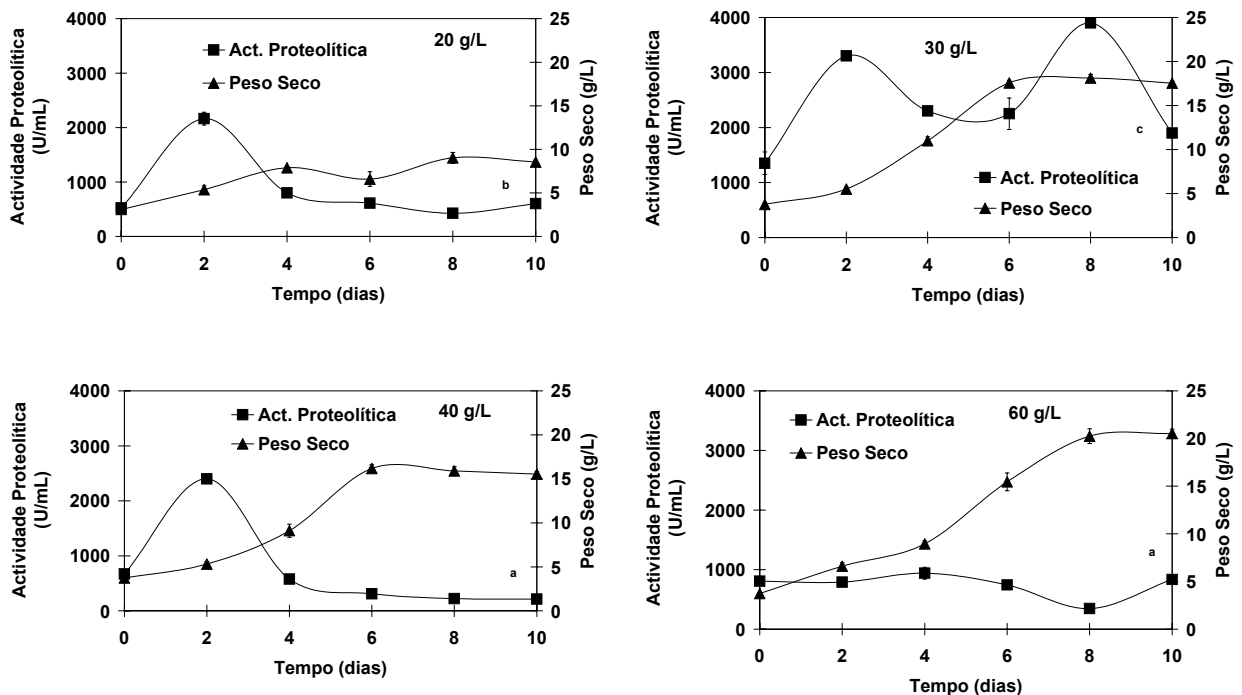
A cinética de utilização do substrato por células em suspensão de *C. calcitrapa* é descrita satisfatoriamente pelo modelo não estruturado de Monod.

#### **2.3.1.1.3. A Influência da fonte de carbono na actividade proteolítica e na produção fenólica das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa***

De modo a estudar a influência da fonte de carbono na produção de metabolitos pela suspensão de células de *Centaurea calcitrapa*, avaliou-se quantitativamente a actividade proteolítica e a produção de compostos fenólicos, ao longo do ciclo de crescimento, para diferentes concentrações iniciais de glucose.

Na figura 2.7. pode-se observar que a suspensão celular de *C. calcitrapa* crescida num meio de cultura com 30 g/L de glucose é a que apresenta melhor resposta à produção de enzimas proteolíticas. É nítido a formação de um pico de actividade ao 2º dia de cultura (3300 U/mL), seguida de um decréscimo desta. Ao 8º dia de cultura temos um segundo pico de actividade (3900 U/mL), superior ao primeiro. A produção de enzimas proteolíticas dá-se no final da fase exponencial e início da estacionária. A existência deste pico de actividade proteolítica,

no final da fase exponencial e início da estacionária, é concordante com os resultados obtidos anteriormente (Raposo, 1994).



**Figura 2.7.** – Influência das diferentes concentrações iniciais de fonte de carbono (glucose) na actividade proteolítica nas células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer. Valores médios  $\pm$  erro padrão (n=3, Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , curvas da Actividade Proteolítica com letras diferentes representam curvas médias significativamente diferentes).

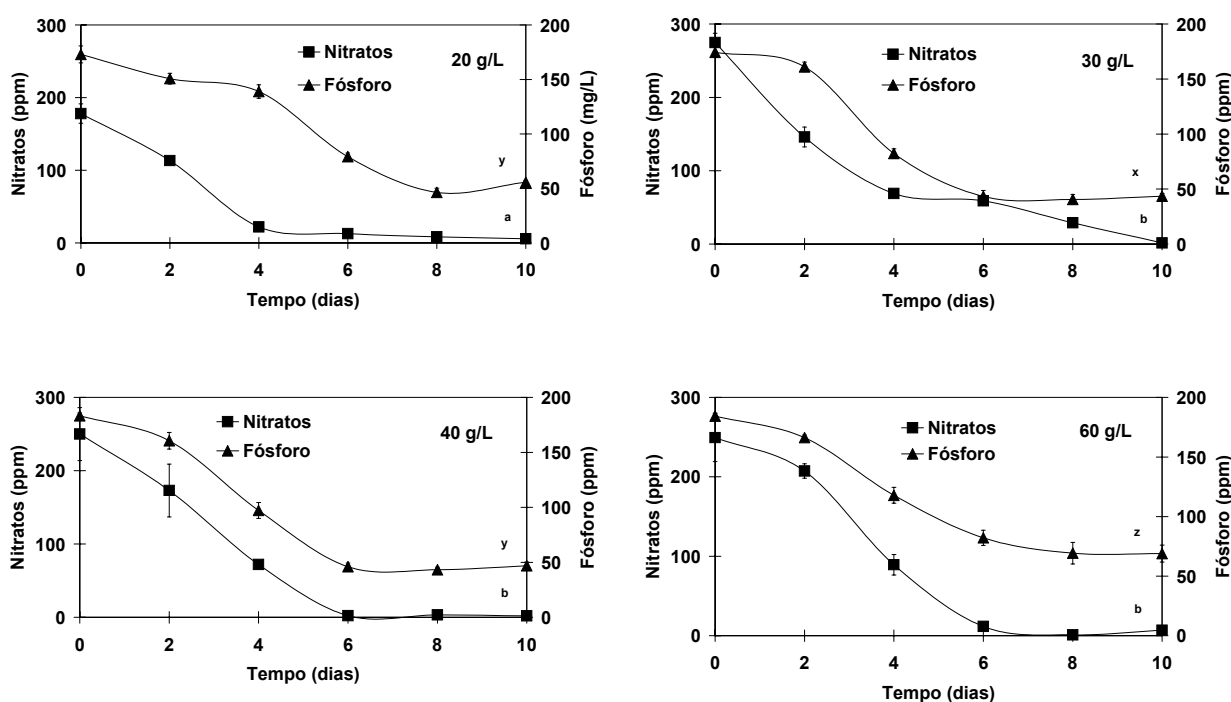
As culturas crescidas num meio com 20 e 40 g/L de glucose apenas apresentam um pequeno pico de actividade ao 2º dia de cultura. Na cultura crescida com 60 g/L de glucose, a actividade é sempre muito baixa ao longo de todo o perfil de crescimento, sugerindo inibição da actividade enzimática.

Lima-Costa (1994) com células em suspensão de *Cynara cardunculus*, crescidas em Erlenmeyer e em meio com diferentes concentrações de sacarose (10 – 80 g/L), obteve actividades proteolíticas específicas máximas ao 6º dia de crescimento, para as concentrações de 40 e 60 g/L. Esta autora sugeriu que a perda de actividade proteolítica poderia estar relacionada com a exaustão do azoto existente no meio. No caso das células em cultura de *C. calcitrapa* crescidas com meio nutriente com 30 g/L de glucose, observou-se o esgotamento do azoto ao 10º dia de cultura (figura 2.8.), sendo a actividade proteolítica máxima ao 8º dia de cultura (figura 2.7.). No caso das culturas cultivadas com 40 e 60 g/L de glucose verificou-se o esgotamento do azoto ao 6º dia de cultura (figura 2.8.). Os resultados obtidos neste trabalho são concordantes com a hipótese sugerida por Lima-

Costa, em que a partir do momento em que o azoto se torna inexistente no meio extracelular, as proteases deixam de ser sintetizadas pelas células.

Segundo Ducos *et al.* (1988), as enzimas da via metabólica glicolítica primária apresentam um perfil de activação semelhante. Resultados díspares foram referidos para células em suspensão de *Silybum marianum*, em que a actividade proteolítica máxima foi atingida ao quarto dia de cultura, início da fase exponencial de crescimento (Fevereiro, 1991).

Relativamente ao consumo de fósforo inorgânico, não se observou esgotamento deste nutriente ao longo do ciclo de crescimento.



**Figura 2.8.** – Consumo do azoto e do fósforo inorgânico nas células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer, com diferentes concentrações iniciais de fonte de carbono (glucose). Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=6$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , curvas dos Nitratos (a, b) e Fósforo (x, y, z) com letras diferentes representam curvas médias significativamente diferentes).

Em termos globais da actividade proteolítica específica média (tabela 2.4.), a suspensão de células de *C. calcitrapa*, crescidas num meio com 30 g/L de glucose é a que apresenta o valor mais elevado (269,60 U/mg PS), relativamente às outras culturas crescidas com diferentes concentrações de glucose.

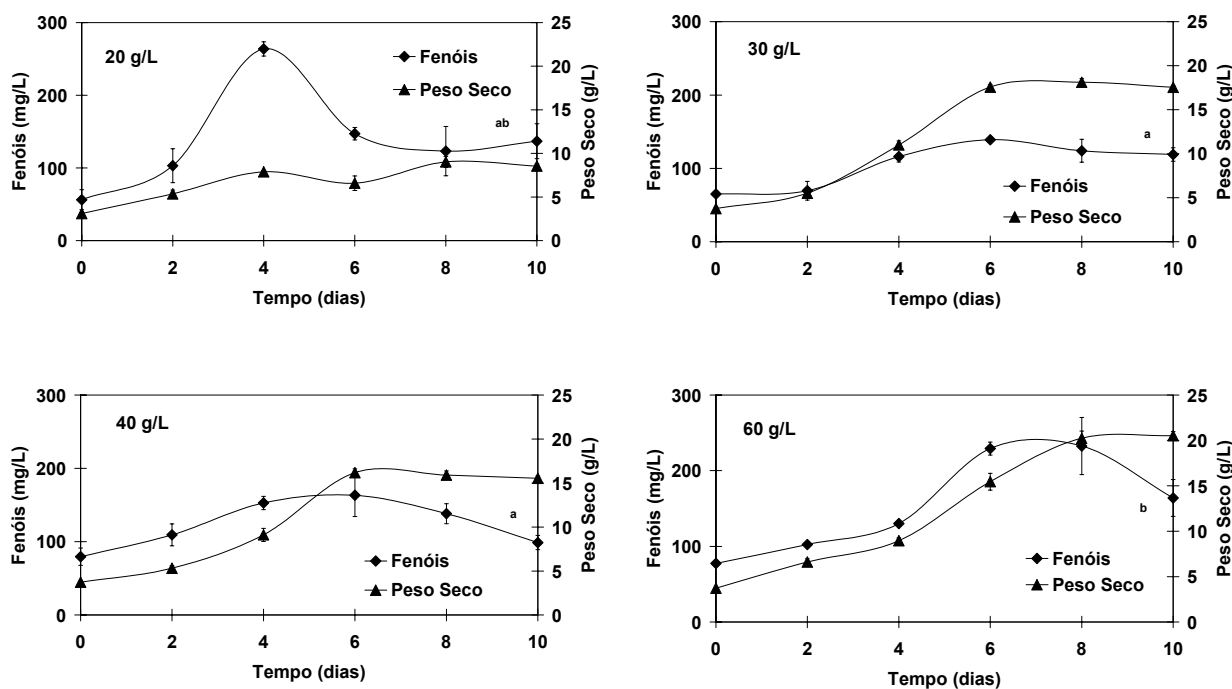
**Tabela 2.4.** – Valores de actividade proteolítica específica média para suspensões de *C. calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer, a diferentes concentrações iniciais de fonte de carbono (glucose). Intervalos de confiança a 95%.

CONCENTRAÇÃO DE FONTE DE CARBONO (g/L)	ACTIVIDADE PROTEOLÍTICA ESPECÍFICA MÉDIA (U/mg PS)
20	147,31 ± 105,36
30	269,60 ± 147,02
40	123,55 ± 138,06
60	90,98 ± 58,21

A suspensão de células de *C. calcitrapa* em Erlenmeyer evidencia a acumulação de compostos fenólicos ao longo do crescimento celular (figura 2.9.), principalmente na cultura crescida num meio com 60 g/L de glucose, em que a acumulação destes compostos é acentuada. Para a concentração de 20 g/L de glucose, observa-se um pico de fenóis ao 4º dia de cultura, sendo este coincidente com o início da fase estacionária. A diminuição da concentração de fenóis a partir do 4º dia de cultura pode estar associada ao esgotamento da fonte de carbono (figura 2.5.), observado igualmente ao 4º dia de cultura. Idênticos resultados foram obtidos com células em suspensão de *C. cardunculus* crescidas em meio com diferentes concentrações (20 – 80 g/L) de sacarose (Lima-Costa, 1994).

Segundo Sahai e Shuler (1984) a maior produção de fenóis em células de *Nicotiana tabacum* verifica-se em condições de stresse nutricional, sendo a produção de metabolitos secundários dependente das condições de cultura das células (temperatura, luz), composição hormonal e nutricional do meio nutriente e varia de espécie para espécie vegetal.

Para Akalezi *et al.* (1999) elevadas concentrações de fonte de carbono (sacarose) mostraram-se benéficas para a produção de metabolitos secundários. A concentração de 60 g/L de sacarose estimula a produção do metabolito secundário ginseng. Resultados semelhantes foram obtidos para outras espécies vegetais (Zhong & Yoshida, 1995, Sato *et al.*, 1996).



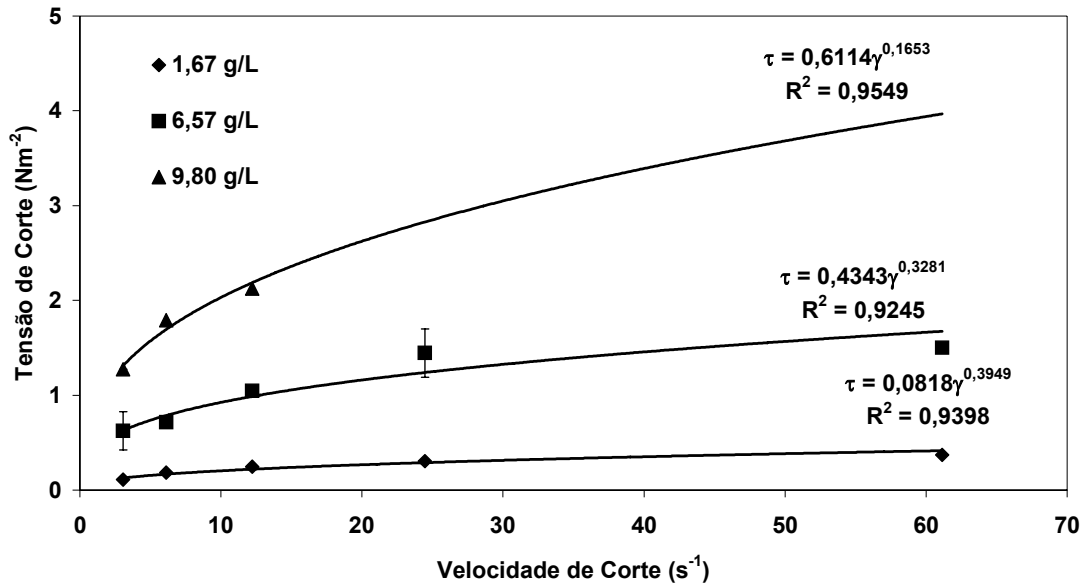
**Figura 2.9.** – Influência das diferentes concentrações iniciais de fonte de carbono (glucose) na produção de compostos fenólicos nas células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , curvas dos Fenóis com letras diferentes representam curvas médias significativamente diferentes).

Os resultados obtidos nos ensaios com diferentes concentrações de glucose, sugerem que a melhor concentração de fonte de carbono para o crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa* foi de 30 g/L de glucose. Assim, todos os ensaios realizados em biorreactor mecanicamente agitado com as células em suspensão de *C. calcitrapa* utilizaram a concentração de glucose de 30 g/L.

### 2.3.1.2. Caracterização reológica da cultura de *C. calcitrapa* cultivada em Erlenmeyer

O conhecimento das características reológicas das culturas de células vegetais é extremamente importante para o projecto de biorreactores e produção em larga escala. No entanto, poucos são os estudos existentes nesta área.

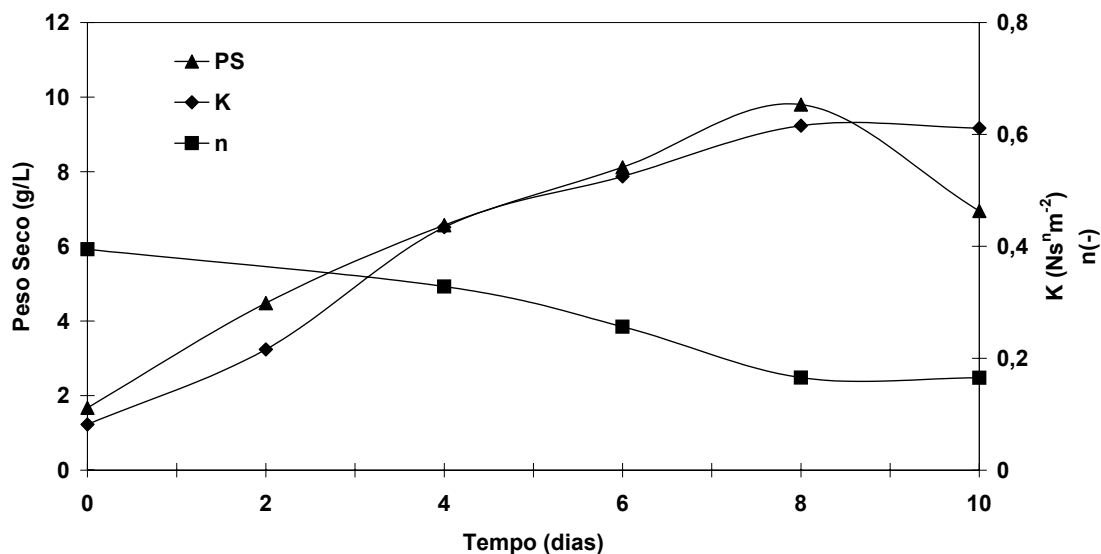
A cultura de células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescida em Erlenmeyer, foi caracterizada reologicamente. Através do conhecimento da velocidade de corte ( $\gamma$ ) e da tensão de corte ( $\tau$ ), construíram-se reogramas da suspensão celular de *C. calcitrapa* para diferentes concentrações de biomassa, como se pode observar na figura 2.10.



**Figura 2.10.** – Reograma para diferentes concentrações de biomassa da suspensão de células em cultura de *C. calcitrapa*, crescida em Erlenmeyer. Cada ponto resulta da média (n=3) ± erro padrão.

Dos dados obtidos para diferentes concentrações de biomassa, ao longo do ciclo de crescimento, procedeu-se ao ajuste do modelo da Lei de Potência ( $\tau = K \gamma^n$ ), de forma a estimar os valores do índice de comportamento do fluido,  $n$  e do índice de consistência do fluido,  $K$  (figura 2.11.). O índice de comportamento do fluido diminui com o aumento da concentração de biomassa, atingindo um valor final menor que 0,2, para a concentração de biomassa de 9,8 g PS/L, como se pode ver na figura 2.11. A análise desta figura sugere que a suspensão de células de *C. calcitrapa*, crescida em Erlenmeyer, apresenta um comportamento pseudoplástico. Os valores do índice de consistência,  $K$ , variam entre 0,082 e 0,611  $\text{Ns}^n\text{m}^{-2}$ , aumentando com a formação de biomassa, ao longo do ciclo de crescimento.

As suspensões celulares de *Beta vulgaris* exibem igualmente um comportamento não-Newtoniano. Os valores de  $n$  variam entre 0,6 e 0,7 nos primeiros 17 dias de cultura, diminuindo para 0,5 na fase estacionária de crescimento (Sánchez *et al.*, 2002). O índice de consistência,  $K$ , apresenta valores inferiores a 0,1  $\text{Ns}^n\text{m}^{-2}$  durante os primeiros 17 dias de cultura. Após este período, aumentam consideravelmente para 0,3  $\text{Ns}^n\text{m}^{-2}$ .



**Figura 2.11.** – Evolução do índice de comportamento do fluido ( $n$ ) e do índice de consistência ( $K$ ) para a suspensão de células de *C. calcitraba* crescida em Erlenmeyer, com 30 g/L de glicose no meio de cultura.

Na figura 2.12. é apresentada a viscosidade aparente da suspensão, determinada durante a realização dos ensaios reológicos, em função da velocidade de corte. Observa-se a diminuição da viscosidade aparente da cultura com o aumento da velocidade de corte, evidenciando um comportamento típico de um fluido com características pseudoplásticas. Com o aumento da concentração de biomassa a viscosidade aparente aumenta (figura 2.13.), atingindo um máximo de  $0,035 \text{ Nsm}^{-2}$ . A viscosidade aparente da suspensão celular, apresentada na figura 2.12., foi calculada para uma velocidade de corte de  $61,15 \text{ s}^{-1}$ .

Culturas de células em suspensão de *Catharanthus roseus* (Jolicoeur *et al.*, 1992), *Cudriana tricuspidata* (Tanaka, 1982), *Nicotiana tabacum* (Curtis & Emery, 1993), *Morinda citrifolia* (Kieran, 1993), *Solanum chrysotrichum* (Trejo-Tapia *et al.*, 2001) e *Beta vulgaris* (Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999; Sánchez *et al.*, 2002) são alguns dos exemplos de culturas que apresentam igualmente um comportamento pseudoplástico, como verificado neste trabalho.

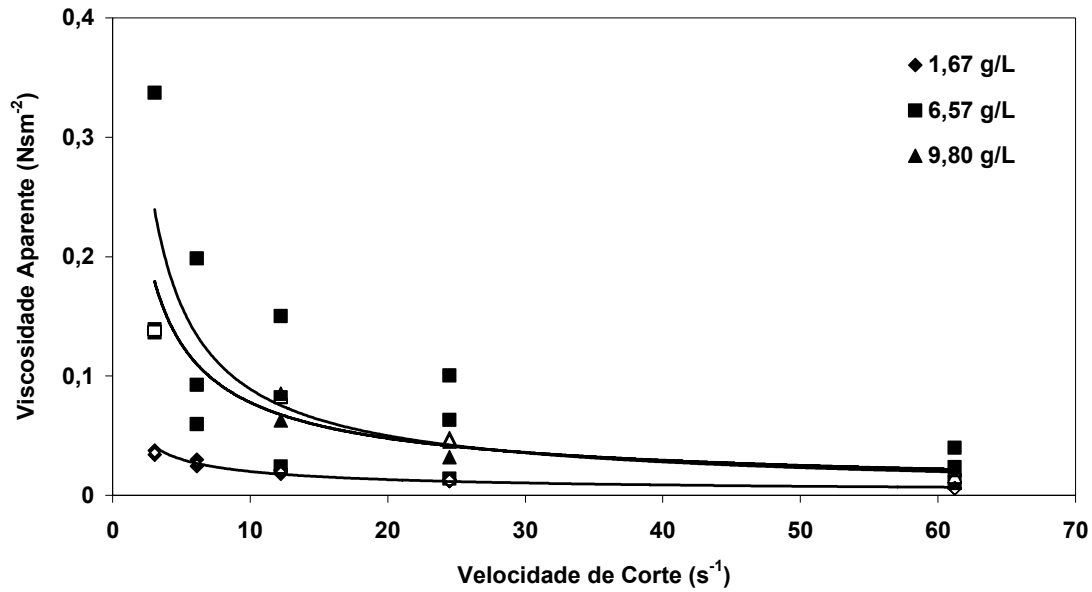


Figura 2.12. – Variação da viscosidade aparente da suspensão de *C. calcitrapa*, cultivada em Erlenmeyer, em função da velocidade de corte, para diferentes concentrações de biomassa.

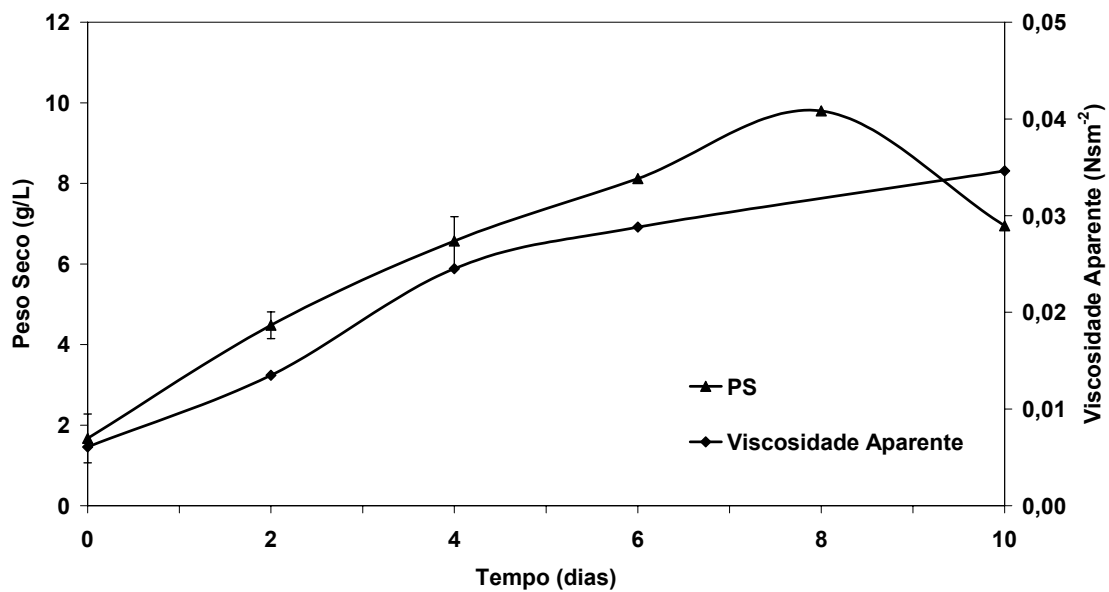


Figura 2.13. – Biomassa (PS) e viscosidade aparente (calculado a  $\gamma = 61,15 \text{ s}^{-1}$ ) ao longo do ciclo de crescimento da suspensão de *C. calcitrapa*, crescida em Erlenmeyer. Cada ponto resulta da média ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

Ballica e Ryu (1993) utilizaram o modelo de Casson para caracterizar o comportamento das suspensões de células de *Datura stramonium*. Estas suspensões celulares apresentaram

uma tensão de corte inicial, dependente da concentração celular elevada a um expoente de 4,0, seguida de um comportamento pseudoplástico.

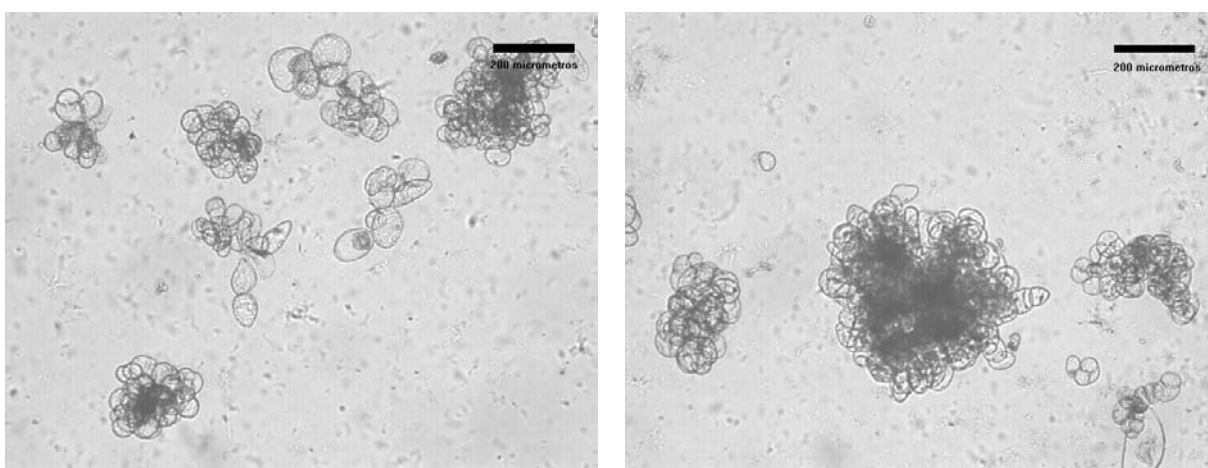
### 2.3.1.3. Caracterização morfológica das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*, cultivadas em Erlenmeyer

A caracterização morfológica das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer, foi feita ao longo do ciclo de crescimento. Estudou-se a variação de tamanho dos agregados recorrendo a duas técnicas: a análise digital de imagem e o *Focused Beam Reflectance Measurement* (FBRM).

#### 2.3.1.3.1. Análise digital de imagem

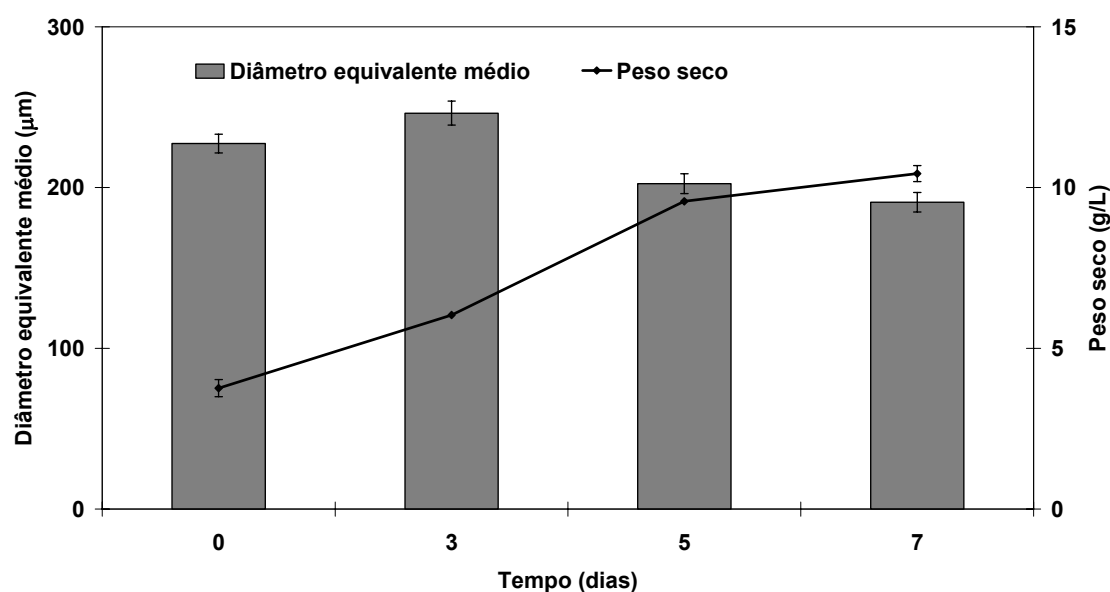
As culturas de células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer de 1 L e de 250 mL, foram caracterizadas morfolologicamente, através de amostras recolhidas aos dias 0, 3, 5 e 7.

A cultura de células de *C. calcitrapa* é constituída por um conjunto de células indiferentemente agregadas, constituindo agregados celulares, cujas dimensões variam entre 50 e 3000  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O número de células que constituem cada agregado pode variar bastante, podendo ir de 3 ou 4 células até 50 células. A forma destes é na sua maioria arredondada podendo no entanto, apresentar alguns agregados mais alongados (figura 2.14).



**Figura 2.14.** – Células em suspensão de *C. calcitrapa*, com 7 dias de cultura, cultivadas em Erlenmeyer.

Alguns autores (Mavituna & Park, 1987; Leckie *et al.*, 1991a; Taticek *et al.*, 1991; Zhong *et al.*, 1992; Kieran *et al.*, 1995; Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999) estudaram a variação do tamanho dos agregados celulares em suspensões celulares vegetais, crescidas em Erlenmeyer. No entanto, pouca atenção foi dada à relação que se estabelece entre o tamanho dos agregados celulares e o ciclo de crescimento e à forma como esta interacção pode afectar a cultura tornando-a susceptível a condições de stresse. No caso da cultura de células em suspensão de *C. calcitrapa*, a figura 2.15. mostra como evolui o diâmetro equivalente médio dos agregados celulares, ao longo do perfil de crescimento. Observa-se que o diâmetro médio dos agregados aumenta até ao 3º dia de cultura. Neste estágio, as células encontram-se a meio da fase exponencial de crescimento, encontrando-se activas na divisão celular. Há formação de agregados de menores dimensões, estando a suspensão num período de rápida divisão celular. Ao 5º dia de cultura, as células entram na fase de desaceleração do crescimento. Nesta fase, assiste-se à fragmentação dos agregados celulares, provocando assim a diminuição do diâmetro médio destes. As células, no final da fase exponencial e início da fase estacionária, são na sua generalidade mais susceptíveis às forças de tensão existentes no meio (Hooker *et al.*, 1989).



**Figura 2.15.** – Variação do diâmetro equivalente médio dos agregados celulares de *C. calcitrapa* ao longo do ciclo de crescimento, crescidos em Erlenmeyer de 1 L. Valores médios  $\pm$  erro padrão. O número de entidades analisadas para cada amostra variou entre 300 e 429.

Em muitas culturas, a presença de polissacáridos extracelulares (Taticek *et al.*, 1991), particularmente nas fases finais do crescimento celular, tem contribuído para o aumento da agregação celular (Mavituna & Park, 1987). No caso da suspensão de *C. calcitrapa*, não se

observou a presença de polissacáridos extracelulares, assistiu-se mesmo à formação de agregados de menores dimensões, o que sugere que as forças de tensão sobre os agregados celulares têm um efeito superior à adesividade entre as células.

Os valores dos diâmetros equivalentes médios, mínimos e máximos dos agregados de células cultivados em Erlenmeyers de 1 L e 250 mL são apresentados na tabela 2.6.. Os agregados celulares cultivados em Erlenmeyer de 1 L apresentam maiores dimensões do que os cultivados em Erlenmeyer de 250 mL, em termos de diâmetro médio e máximo. Esta pequena alteração nas dimensões dos agregados celulares pode estar relacionada com diferenças na agitação nos Erlenmeyers de diferentes dimensões. É possível que os agregados celulares, no Erlenmeyer de 250 mL, estejam sujeitos a uma agitação mais violenta, devido a base do Erlenmeyer ser menor do que o de 1 L, promovendo a formação de agregados de menores dimensões. Observando apenas os diâmetros médios dos agregados celulares de *C. calcitrapa*, estes variam entre 190,87 e 246,27  $\mu\text{m}$ , para as culturas crescidas em Erlenmeyers de 1 L, enquanto para as crescidas em Erlenmeyers de 250 mL, a variação é entre 170,99 e 204,42  $\mu\text{m}$ . No entanto, estes valores são diâmetros médios, havendo agregados com 910  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Em termos de diâmetros médios, a variação de tamanhos dos agregados celulares é significativa, sendo igualmente significativa a variação dos diâmetros mínimos e máximos.

**Tabela 2.6.** – Valores dos diâmetros equivalentes dos agregados de células em suspensão de *C. calcitrapa* crescidas em Erlenmeyers de 1 L e 250 mL.

DIAS	ERLENMEYER 1 L				ERLENMEYER 250 mL			
	DIÂMETRO EQ. MÉDIO ( $\mu\text{m}$ )	ERRO PADRÃO ( $\mu\text{m}$ )	DIÂMETRO EQ. MÍN ( $\mu\text{m}$ )	DIÂMETRO EQ. MÁX ( $\mu\text{m}$ )	DIÂMETRO EQ. MÉDIO ( $\mu\text{m}$ )	ERRO PADRÃO ( $\mu\text{m}$ )	DIÂMETRO EQ. MÍN ( $\mu\text{m}$ )	DIÂMETRO EQ. MÁX ( $\mu\text{m}$ )
0	227,41	$\pm 5,79$	68,00	910,13	182,97	$\pm 4,90$	62,52	513,24
3	246,27	$\pm 7,45$	68,99	834,77	204,42	$\pm 7,92$	67,58	638,93
5	202,41	$\pm 6,11$	65,08	682,34	194,06	$\pm 5,47$	63,01	651,48
7	190,87	$\pm 6,07$	64,11	729,94	170,99	$\pm 5,03$	71,03	682,50

O número de entidades analisadas para cada amostra variou entre 300 e 429, sendo o coeficiente de variabilidade inferior a 5%.

Idênticos resultados foram obtidos por Kieran *et al.* (1993) com células de *Morinda citrifolia*, cultivados em Erlenmeyer. O tamanho médio da cadeia de células diminui com o tempo de cultura, predominando as cadeias de maiores dimensões no início do ciclo de crescimento. Os tamanhos médios das cadeias celulares variam entre 450 e 700  $\mu\text{m}$ , sendo atingido ao 3º dia de cultura o diâmetro máximo. Contrariamente ao que se observa com os agregados de células de *C. calcitrapa*, o tamanho médio dos agregados celulares de *Beta vulgaris*, cultivados em Erlenmeyer, mantém-se praticamente constante, ao longo do ciclo de crescimento (Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999).

A distribuição log-normal tem sido aplicada a sistemas biológicos em que a variação do tamanho das células/agregados é grande e/ou em que há processos de agregação ou fragmentação. Tanaka (1987) sugeriu que o modelo log-normal era apropriado para as suspensões de *Agrostema githago* e *Nicotiana tabacum*. Scragg *et al.* (1987) verificaram que a distribuição bimodal descrevia bem o tamanho dos agregados celulares das suspensões de *Picrasma quassioides*, enquanto que as suspensões de *Catharanthus roseus* eram descritas pela distribuição log-normal. Mavituna & Park (1987) examinaram o perfil morfológico de *Capsicum frutescens*, que se apresentou como sendo uma cultura com bastantes agregados, com diâmetros superiores a 8 mm, e que após a fase exponencial o tamanho dos agregados era descrito por uma distribuição de Gauss. Igualmente, a distribuição log-normal foi usada com sucesso por Kieran (1993) para caracterizar a suspensão celular de *Morinda citrifolia*. Semelhante aproximação foi feita para caracterizar a suspensão de células de *Centaurea calcitrapa*.

Para qualquer variável  $x$ , neste caso o diâmetro equivalente do agregado celular, o valor da correspondente densidade de probabilidade  $p(x)$  para uma distribuição log-normal é dada pela expressão:

$$p(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{1}{\sigma_{\ln x}} \frac{1}{x} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left[ \frac{\ln x - \overline{\ln x}}{\sigma_{\ln x}} \right]^2 \right] \quad (2.19.)$$

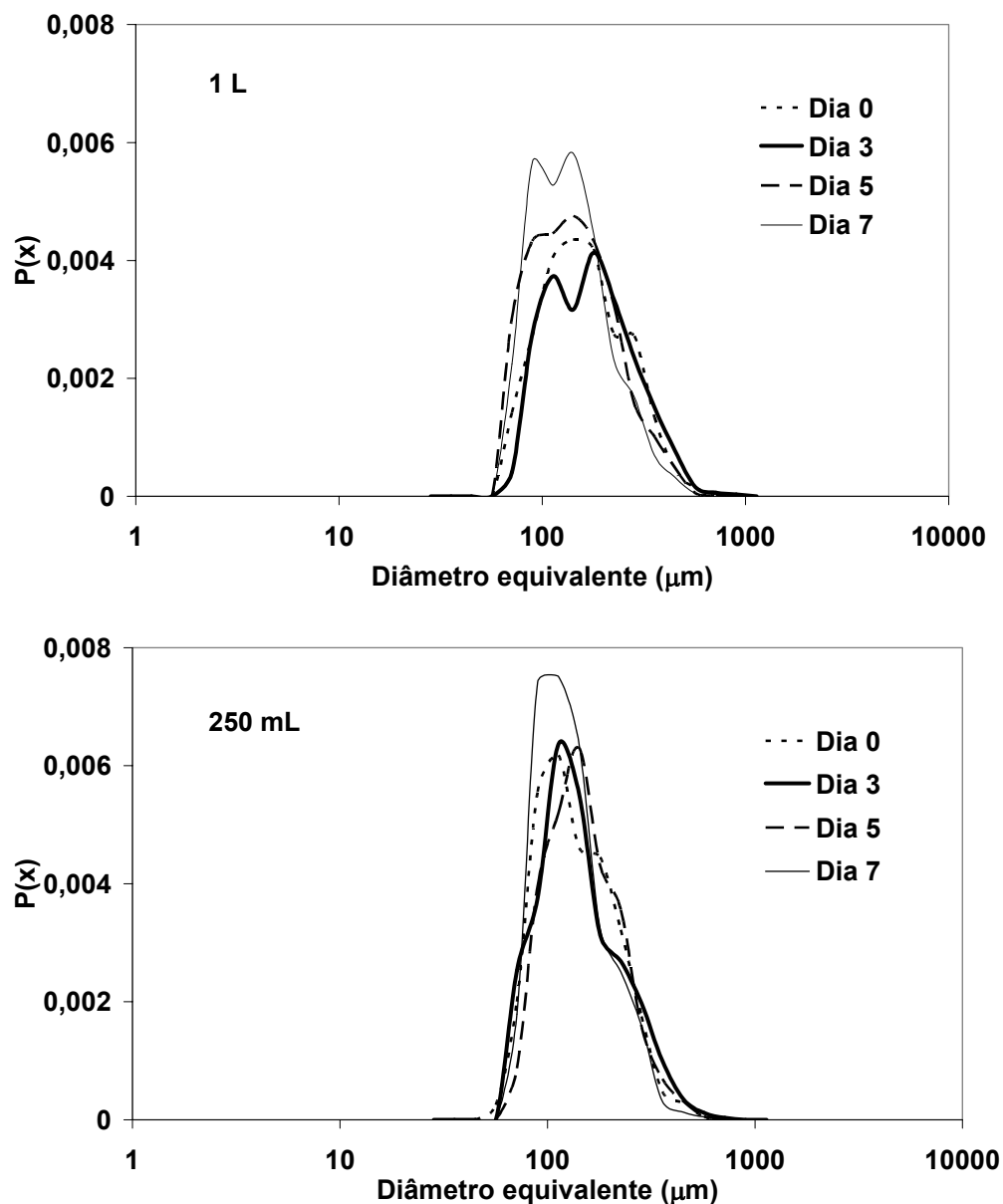
onde  $\overline{\ln x}$  é a média da variável  $\ln x$  e  $\sigma_{\ln x}$  é o desvio padrão da variável  $\ln x$ .

A densidade de probabilidade, para um determinado valor médio do intervalo, foi calculada dividindo o número de entidades nesse intervalo pelo produto do tamanho do intervalo e o número total de entidades (equação 2.20.).

$$p(x)_i = \frac{p(x)dx_i}{\text{Bin}_i - \text{Bin}_{i-1}} \quad (2.20.)$$

Através da figura 2.16. constatamos que a distribuição log-normal apresenta-se como um bom modelo para representar a variação de tamanho dos agregados celulares da

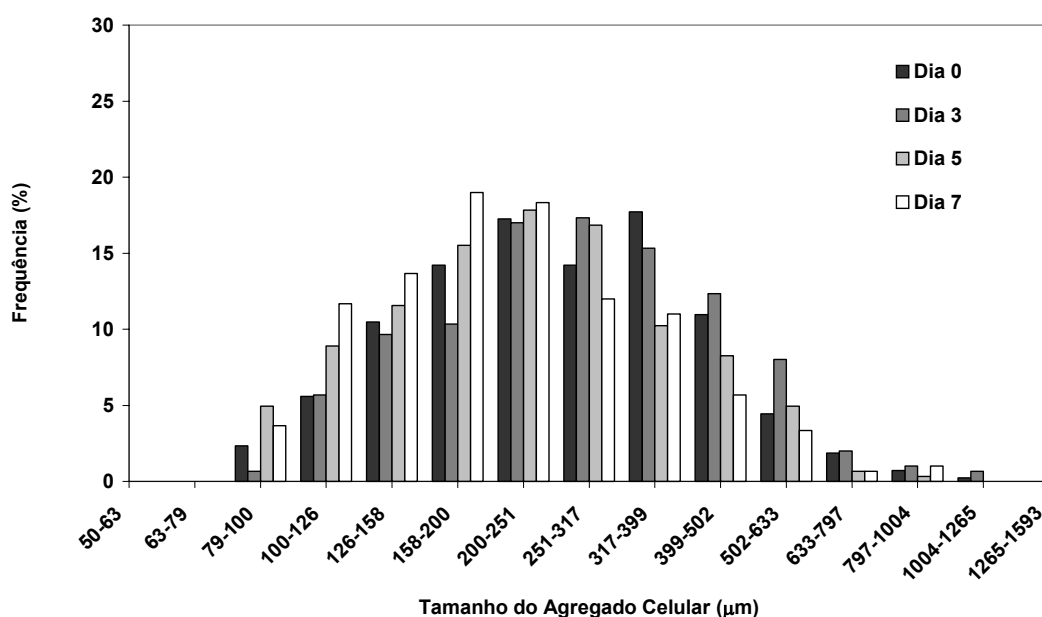
suspensão de *C. calcitrpa*. Os perfis obtidos para as suspensões celulares de *C. calcitrpa*, crescidas em Erlenmeyer de 1 L e 250 mL são bastante semelhantes. O tamanho dos agregados celulares, das suspensões crescidas em Erlenmeyer de 1 L é ligeiramente superior aos da suspensão crescida em Erlenmeyer de 250 mL, como já foi referido anteriormente. No caso do Erlenmeyer de 1 L, os valores das densidades são mais baixas e a curva apresenta-se mais larga, relativamente ao Erlenmeyer de 250 mL, indicativo de uma maior variação de tamanhos dos agregados celulares, como se pode constatar na tabela 2.6..



**Figura 2.16.** – Aplicação do modelo log-normal à distribuição do diâmetro equivalente médio das células em suspensão de *C. calcitrpa*, crescidas em Erlenmeyer de 1 L e 250 mL.

Ao longo do ciclo de crescimento, pode-se observar a diminuição do tamanho dos agregados celulares (figura 2.17.). No 0 dia de cultura, a suspensão apresenta uma maior

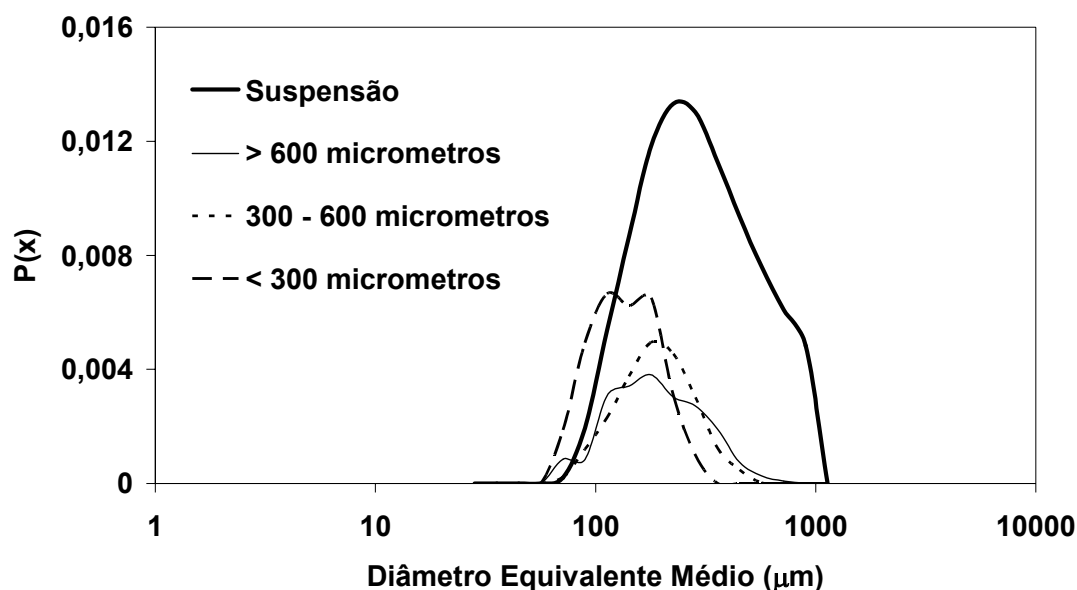
percentagem de agregados de pequenas dimensões, inferiores a 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio, comparativamente com o 3º dia de cultura. Ao 3º dia, a percentagem de agregados de pequenas dimensões diminuem, aumentando consideravelmente os de grandes dimensões. Na figura 2.16.(1 L), onde é apresentada a distribuição log-normal dos tamanhos dos agregados celulares, cultivados em Erlenmeyer de 1 L, observa-se um deslocamento da curva de distribuição para a direita, ao 3º dia, comparativamente com a do dia 0. Após este dia assistimos novamente a uma maior predominância dos agregados de pequenas dimensões, agregados celulares com diâmetros médios inferiores a 250  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.17.** – Distribuição do tamanho dos agregados ao longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer de 1 L.

Contrariamente ao observado com as células em suspensão de *C. calcitrapa*, Tanaka *et al.* (1988) constataram que a percentagem de agregados celulares de maiores dimensões nas suspensões celulares de *C. roseus* aumentavam ao longo do ciclo de crescimento.

De forma a determinar-se o tamanho de agregado predominante na cultura de *C. calcitrapa* no fim do seu ciclo de crescimento, procedeu-se à separação dos agregados celulares pelo tamanho destes. A suspensão celular foi passada por um sistema de crivos, donde se obtiveram 3 fracções: agregados com dimensões superiores a 600  $\mu\text{m}$ , agregados com dimensões entre 300 e 600  $\mu\text{m}$  e agregados com dimensões inferiores a 300  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, as diferentes fracções obtidas foram comparadas com a suspensão (figura 2.18.).



**Figura 2.18.** – Distribuição por tamanhos dos agregados celulares de *C. calcitrapa* cultivados em Erlenmeyer de 1 L e com 7 dias de cultura.

No caso das células de *C. calcitrapa* com 7 dias de cultura, os agregados celulares com dimensões superiores a 600  $\mu\text{m}$  representam cerca de 63 % da biomassa, enquanto que os agregados com dimensões entre 300 e 600  $\mu\text{m}$ , representam aproximadamente 20 % e os de menores dimensões, menores de 300  $\mu\text{m}$ , apenas 16 % da biomassa celular. Embora os agregados com dimensões superiores a 600  $\mu\text{m}$  não sejam predominantes na suspensão com 7 dias de cultura, como se pode observar na figura 2.17., estes são responsáveis por grande parte da biomassa formada, devido à sua elevada dimensão.

Zhong *et al.* (1992) verificaram que a distribuição de tamanhos dos agregados celulares de *Perilla frutescens*, crescidas em Erlenmeyer e no final do ciclo de crescimento, variavam significativamente. Os agregados celulares com tamanhos entre 250 e 500  $\mu\text{m}$  representam cerca de 53 % da biomassa celular, enquanto que os agregados celulares com tamanhos compreendidos entre 149 e 250  $\mu\text{m}$  e 74 e 149  $\mu\text{m}$  representam 31 % e 12 %, respectivamente. A variação de tamanho dos agregados celulares desta espécie encontra-se dentro da gama observada para outras linhas celulares vegetais (Tanaka, 1982; Zhong *et al.*, 1992), que habitualmente variam entre 40 e 2000  $\mu\text{m}$ . No entanto, o diâmetro médio dos agregados celulares de *Beta vulgaris*, crescidas em Erlenmeyers de 500 mL, varia entre 70 e 100  $\mu\text{m}$  (Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999) e os de *Catharanthus roseus* entre 25 e 170  $\mu\text{m}$ , valores estes bastante inferiores aos referidos anteriormente.

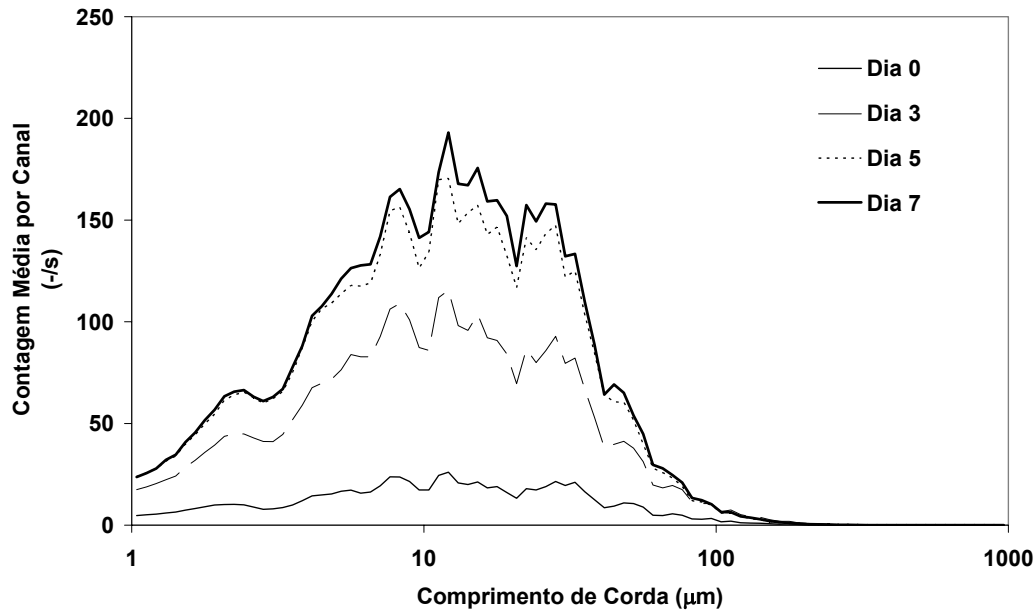
A importância de se caracterizar morfologicamente uma cultura, ao longo do ciclo de crescimento, possibilita por comparação com as distribuições de tamanhos dos agregados conhecidas observarem-se desvios destas, podendo ser indicativo do grau de homogeneidade da cultura. Alterações nas condições de cultura, no meio de crescimento ou nas condições de stresse impostas à cultura, em termos de agitação poderão ser determinantes no processo produtivo.

#### **2.3.1.3.2. Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM)**

Para a caracterização morfológica da cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* usou-se uma outra técnica, denominada *focused beam reflectance measurement* (FBRM), que permitiu corroborar os resultados obtidos pela análise digital de imagem. Embora a análise digital de imagem seja uma técnica que dê resultados fiáveis, é extremamente morosa pela captação das imagens e pela análise destas. Em contrapartida, a *focused beam reflectance measurement* (FBRM), é uma técnica que permite a recolha de uma grande quantidade de dados num curto período de tempo (aproximadamente 5 min).

Esta técnica tem sido usada na monitorização da agregação de partículas nos processos metalúrgicos (Richmond *et al.*, 1998) e actualmente tem larga aplicação na cristalização, dispersões líquido-líquido e emulsões (Dowding *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2002). A sua aplicação no estudo de culturas de células vegetais é recente. McDonald *et al.* (2001) caracterizaram em termos da concentração de biomassa e do tamanho dos agregados algumas culturas de células em suspensão de arroz (*Oryza sativa*), tabaco (*Nicotiana benthamiana*) e pepino (*Trichosanthes kirilowii*).

A figura 2.19. permite avaliar o número de contagens médias de partículas interceptadas pelo feixe laser da sonda de FBRM, neste caso agregados, em cada comprimento de corda. É nítido o aumento do número de contagens ao longo do ciclo de crescimento das células em cultura de *C. calcitrapa*. À medida que aumenta a biomassa formada, o número de contagens por canal aumenta também. Igualmente, os perfis ao 5º e ao 7º dia de cultura são praticamente sobrepostos, ou seja, a concentração de biomassa é semelhante no final do ciclo de crescimento, 160,58 g/L e 159,83 g/L, respectivamente.



**Figura 2.19.** – Distribuição dos agregados celulares de *C. calcitrapa*, ao longo do ciclo de crescimento, com base na contagem média.

A contagem ponderada, como foi explicado no ponto 2.2.2.4.2., refere-se à área do agregado celular. Na figura 2.20., podemos confirmar com esta técnica, os resultados obtidos pela análise digital de imagem, em que os agregados celulares com 3 dias de cultura são de maiores dimensões, comparativamente à suspensão com diferentes dias de cultura. Observa-se um deslocamento do perfil, em relação aos restantes, para a direita e uma diminuição dos agregados de menores dimensões, com formação de agregados maiores. Igualmente, os perfis das culturas com 5 e 7 dias encontram-se praticamente sobrepostos, sendo bastante idênticos.

Normalizando a contagem ponderada (figura 2.21.), a diminuição do tamanho dos agregados celulares com o aumento do tempo de cultura é ainda mais nítido. Há uma deslocação para a direita dos perfis das suspensões celulares com 0 e 3 dias, relativamente às suspensões com 5 e 7 dias.

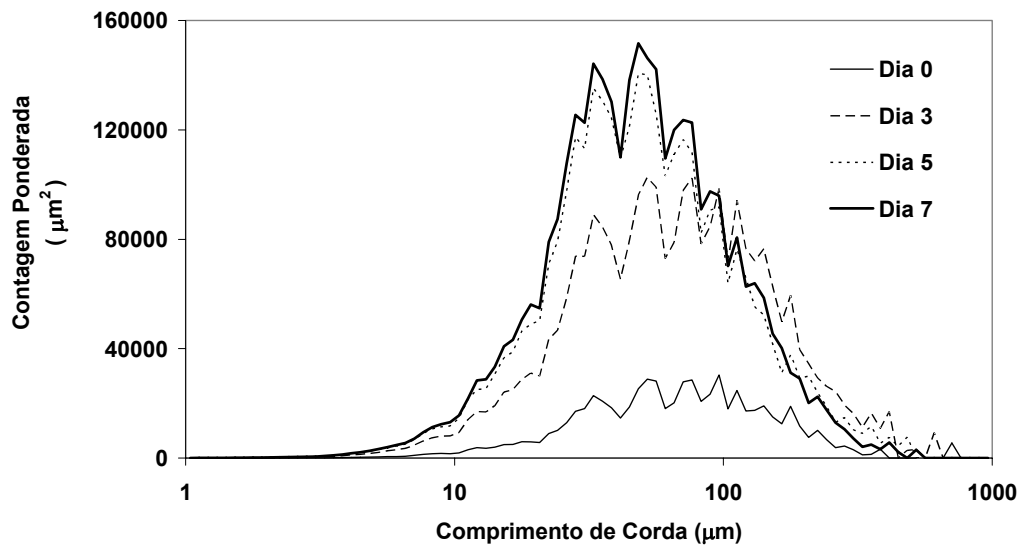


Figura 2.20. – Distribuição dos agregados celulares de *C. calcitrapa*, ao longo do ciclo de crescimento, com base na contagem ponderada.

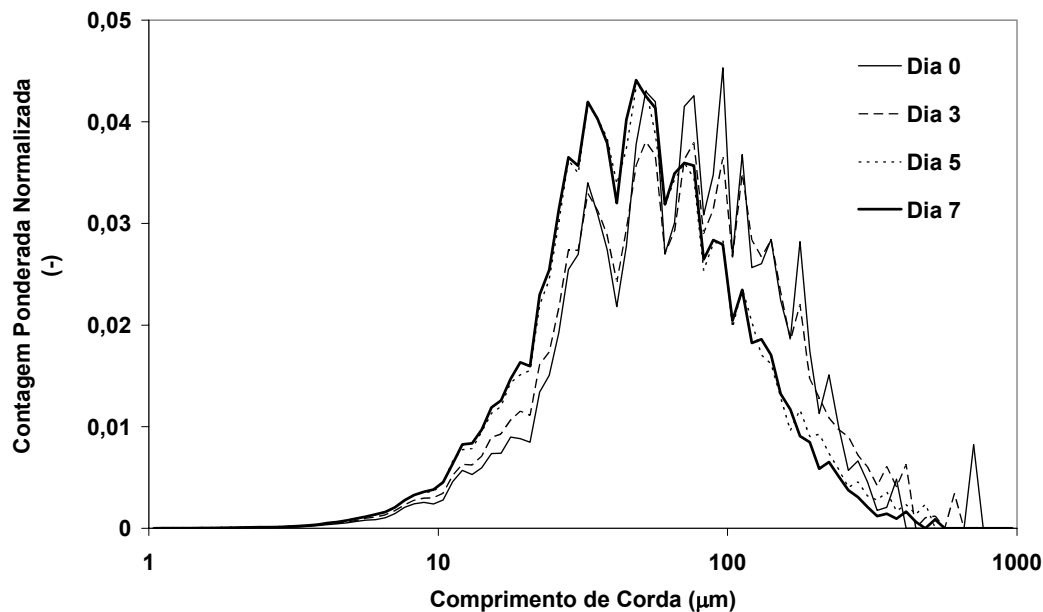
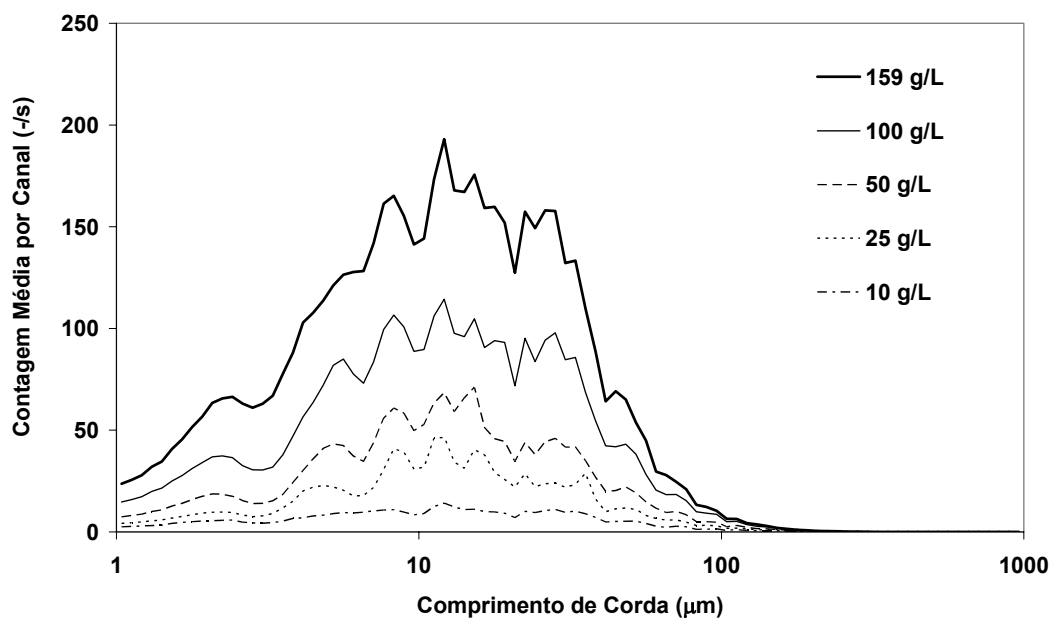


Figura 2.21. – Contagem ponderada normalizada dos agregados celulares de *C. calcitrapa*, cultivadas em Erlenmeyer de 1 L, ao longo do perfil de crescimento.

De forma a serem confirmados os resultados obtidos, em que o FBRM permite a detecção de variações de concentração de biomassa, procedeu-se à diluição de uma amostra de suspensão de células de *C. calcitrapa*, com 7 dias de cultura (figura 2.22.). Os perfis são

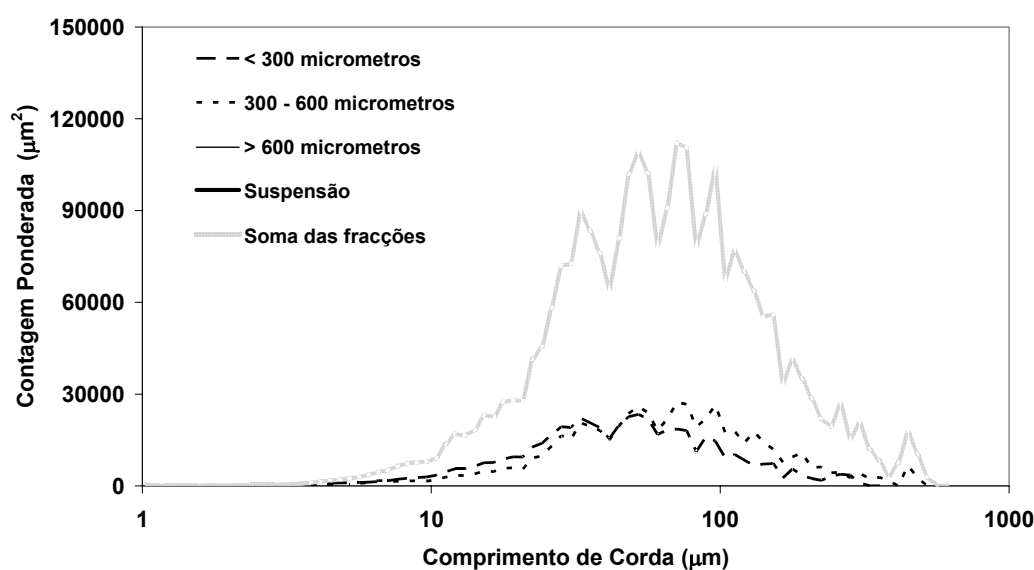
idênticos em todas as amostras diluídas, comparativamente com a suspensão original não diluída (159 g/L), apenas o número de contagens por canal diminui, com a diminuição da biomassa.



**Figura 2.22.** – Contagem média por canal das diferentes diluições de uma suspensão celular de *C. calcitraba*, cultivadas em Erlenmeyer de 1 L, com 7 dias de cultura.

Também McDonald *et al.* (2001) com células em suspensão de *Oryza sativa*, *Nicotiana benthamiana* e *Trichosanthes kirilowii*, verificaram o efeito da concentração de biomassa nas distribuições obtidas por FBRM. Verificaram que a área das distribuições diminui com o decréscimo de biomassa.

A figura 2.23. mostra os resultados da análise à suspensão de *C. calcitraba* com 7 dias de cultura que foi sujeita à passagem por um sistema de crivos, de forma a serem separados os agregados celulares por tamanhos. Constata-se que o perfil da suspensão é bastante similar ao obtido da soma das diferentes fracções celulares, separadas pelos crivos.



**Figura 2.23.** – Distribuição dos agregados celulares de uma suspensão de *C. calcitraba*, cultivada em Erlenmeyer de 1 L com 7 dias de cultura, separados por um sistema de crivos.

McDonald *et al.* (2001) apresentam os resultados de FBRM em termos de distribuições de comprimentos de cadeia ponderadas cubicamente. Este conceito, apresentado por estes autores, reflecte a noção de volume dos agregados. No caso das células em suspensão de *C. calcitraba*, dado a grande variabilidade de tamanho e forma dos agregados, os resultados obtidos, aplicando este conceito estatístico, não reflectiam o verdadeiro comportamento da cultura. Assim, optou-se por fazer uma abordagem em termos de área e em termos de contagem de partículas interceptadas pelo feixe laser da sonda. Os resultados apresentados e a abordagem estatística efectuada, são concordantes com os resultados obtidos da análise digital de imagem, podendo mesmo afirmar-se que estas duas técnicas se complementam.

### 2.3.1.3.3. Relação entre a análise digital de imagem e o FBRM

A análise morfológica da cultura de células em suspensão de *C. calcitraba* foi efectuada recorrendo à análise digital de imagem e à técnica óptica FBRM. Através dos resultados obtidos por estas duas técnicas observou-se que era possível estabelecer algumas correlações, relacionando-as ainda com a biomassa. Os dados obtidos pelo uso destas duas técnicas, assim como a variação de biomassa, em termos de peso fresco e peso seco, são apresentados na (tabela 2.7.).

**Tabela 2.7.** – Variação de biomassa (peso seco e peso fresco), ao longo do ciclo de crescimento, com o diâmetro médio equivalente (análise digital de imagem) e contagem total (FBRM) dos agregados celulares de *C. calcitrapa*, cultivada em Erlenmeyer de 1 L.

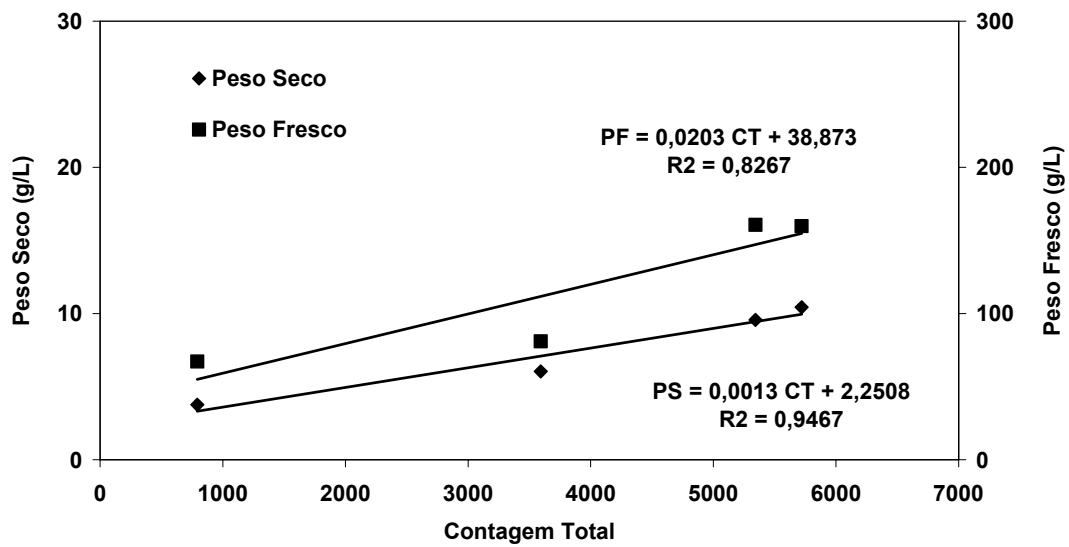
DIAS	CONTAGEM TOTAL	DIÂMETRO MÉDIO ( $\mu\text{m}$ )	PESO FRESCO (g/L)	PESO SECO (g/L)
0	793	227	67,19	3,76
3	3592	246	80,90	6,04
5	5343	202	160,58	9,57
7	5720	191	159,83	10,43

Analisando a tabela 2.7., observa-se o aumento do número de contagens dos agregados celulares com o peso fresco e o peso seco. Esse aumento dá-se até ao 5º dia de cultura, sendo os valores relativos ao 7º dia bastante semelhantes. Graficamente (figura 2.24.) pode-se constatar essa relação, obtendo-se uma boa correlação linear entre o peso seco e o número de contagens totais ( $R^2=0,95$ ). Entre o peso fresco e o número de contagens totais também se verifica uma correlação linear, no entanto, o coeficiente de correlação é menor ( $R^2=0,83$ ) do que o obtido com o peso seco, sugerindo uma maior variabilidade na obtenção do peso fresco, dependendo do conteúdo em água. Contudo, podemos afirmar que se verifica uma forte correlação entre os parâmetros de biomassa e as contagens totais.

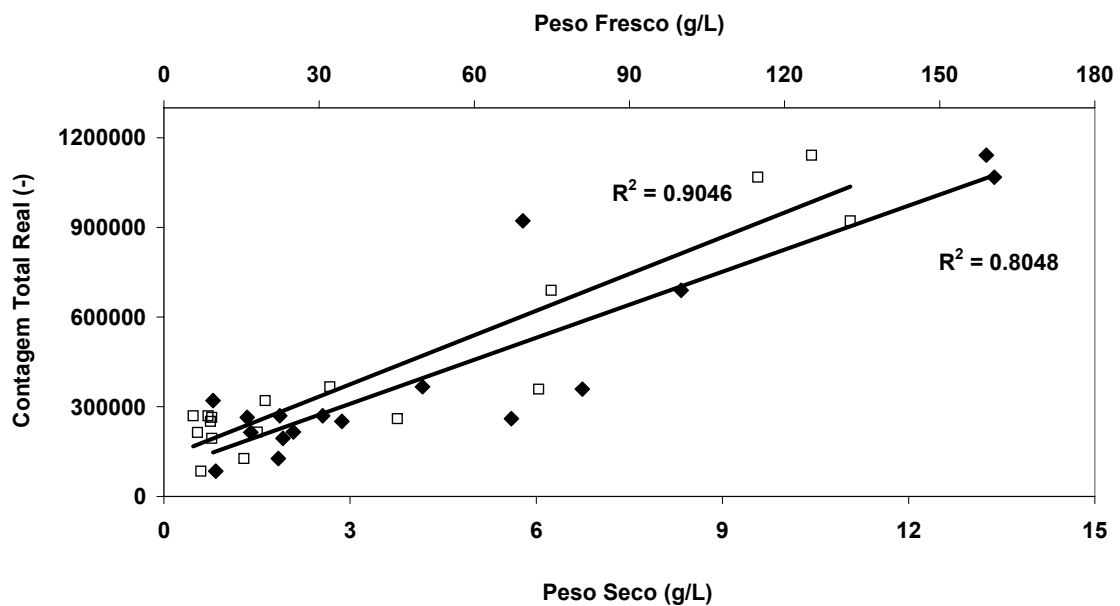
Como foi dito na secção 2.2.3.2., a diferença entre a contagem total e a contagem total real, reside no facto da contagem total ser a soma das médias das contagens de cada canal, enquanto a contagem total real é a soma de todas as contagens efectuadas pelo feixe laser ao interceptar as partículas. Assim, para a contagem total real, obtém-se igualmente uma relação linear para a biomassa, em termos de peso seco e peso fresco (figura 2.25.). Para a representação deste gráfico, diferentes concentrações de biomassa foram sujeitas ao FBRM.

McDonald *et al.* (2001) obtiveram igualmente, uma correlação linear entre a biomassa e as contagens totais por segundo para suspensões de arroz, tabaco e pepino, a diferentes concentrações celulares.

As correlações apresentadas têm em conta a variação de biomassa. O FBRM pode ser usado na monitorização da biomassa nos crescimentos celulares, no entanto, estas correlações são específicas da espécie em causa. Para cada espécie vegetal, é necessário primeiro determinar a relação que a define.



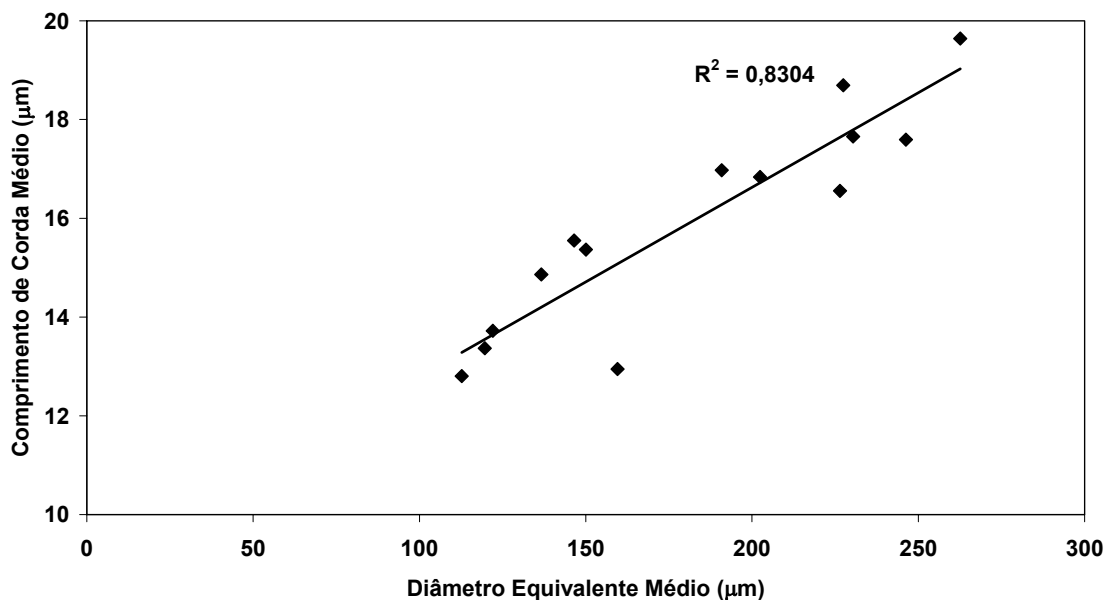
**Figura 2.24.** – Correlação linear entre a biomassa, expressa em termos de peso fresco e peso seco, e o número de contagens totais (CT), ao longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrpa*, crescidas em Erlenmeyer de 1 L.



**Figura 2.25.** – Correlação entre as contagens totais reais, obtidas por FBRM, e a concentração em biomassa (peso fresco  $\blacklozenge$ , peso seco  $\square$ ) das células em suspensão de *C. calcitrpa*, cultivadas em Erlenmeyer.

Igualmente, observando os resultados obtidos pela análise digital de imagem e pelo FBRM, verificou-se uma correlação entre os diâmetros equivalentes médios e o tamanho de corda

média (figura 2.26.). Obtém-se um elevado coeficiente de correlação tendo em conta os dados experimentais e a variabilidade existente nas culturas de células vegetais, devido à sua morfologia. Estes parâmetros têm em conta a variação do tamanho dos agregados celulares.



**Figura 2.26.** – Correlação entre o comprimento da corda médio e o diâmetro equivalente médio para as células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas em Erlenmeyer.

A aplicação da técnica FBRM ao estudo de culturas em suspensão de células vegetais é extremamente recente. É uma técnica sensível tanto às dimensões das partículas como à concentração de biomassa. As distribuições dos comprimentos das cadeias dependem da morfologia dos agregados, da densidade dos agregados e das propriedades reflectivas destes. No caso das culturas de células vegetais, estas propriedades são específicas da espécie vegetal. O tamanho dos agregados celulares depende não só da espécie vegetal, mas também das condições de cultura em biorreactor, como sendo as características do inóculo, a agitação, o arejamento e a acessibilidade aos nutrientes. Estas condições são extremamente importantes, principalmente a agitação e o arejamento, podendo provocar na cultura condições de stresse, que condicionam a quebra de agregados ou a coalescência destes.

Enquanto a concentração de biomassa, ao longo de um ciclo de crescimento, é facilmente visível e quantificável, as alterações na distribuição do tamanho dos agregados celulares são difíceis de serem monitorizadas. A análise digital de imagem permite a caracterização morfológica da suspensão, no entanto é uma técnica morosa, tanto pela captação das

imagens como pela sua análise. Assim, o FBRM poderá ser uma alternativa, sendo uma técnica em que a obtenção de resultados é rápida e que possibilita medições *in-situ*.

Concordando com McDonald *et al.* (2001), na aplicação desta técnica, é necessário determinar qual a melhor maneira de utilizar os valores das distribuições dos comprimentos de cadeia de forma a obterem-se correlações reproduzíveis para as diferentes espécies vegetais. No caso deste trabalho, a contagem média por canal e a contagem ponderada foram as medidas estatísticas que melhor avaliaram o comportamento da cultura em termos de variação de biomassa e tamanho dos agregados celulares, respectivamente. Para as suspensões de células de arroz, pepino e tabaco, as distribuições ponderadas ao cubo e os comprimentos de cadeia ponderados ao cubo são as que representam melhor as alterações em termos da concentração de biomassa e do tamanho dos agregados celulares, respectivamente (McDonald *et al.*, 2001). No caso destas espécies vegetais, que apresentam agregados com uma forma arredondada, as medidas estatísticas usadas reflectem um volume.

Sendo uma técnica recente, as suas aplicações às culturas de células vegetais ainda não se encontram todas determinadas. Além da monitorização das alterações na concentração de biomassa e do tamanho dos agregados celulares, esta técnica poderá ainda ter outras aplicações, como sendo a detecção de contaminantes microbianos nas culturas de células vegetais ou a presença de células mortas através da monitorização de fragmentos celulares, trabalhando com comprimentos de cadeia pequenos.

### **2.3.2. Crescimento das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em sistema descontínuo – Reactor Biológico Mecanicamente Agitado**

#### **2.3.2.1. Transferência de massa de oxigénio inicial**

Antes de se proceder ao estudo de optimização das condições para o crescimento da suspensão de células de *C. calcitrapa* em reactor descontínuo mecanicamente agitado, determinou-se o coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio –  $K_L a$  – nas condições iniciais dos ensaios, com a finalidade de padronizar as condições iniciais de transferência de massa. Assim, os valores de  $K_L a$  foram determinados para o meio SH, na ausência de células, e para as diferentes condições operacionais de agitação e arejamento, definidas para o processo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa* (tabela 2.8.).

Por análise da tabela 2.8., verifica-se que com o aumento do caudal de arejamento, a transferência de massa de oxigénio para o meio de cultura aumenta. Igualmente, com o aumento da agitação, observa-se o aumento dos valores de  $K_L a$ . O aumento da turbulência,

provocado pelo aumento da velocidade de agitação, promove a quebra de bolhas de ar, existentes no meio, favorecendo a formação de bolhas de menores dimensões. Este facto, faz com que a área interfacial de contacto do gás ( $a$ ) com o meio aumente, o que consequentemente, faz com que o  $K_L a$  aumente.

**Tabela 2.8.** – Valores de  $K_L a$  determinados pelo método dinâmico, para diferentes condições de agitação e arejamento, em reactor mecanicamente agitado de 2 L, na ausência de células.

AREJAMENTO (vvm)	AGITAÇÃO (rpm)			
	30	60	100	250
0,083	2,56	2,81	3,87	18,60
0,167	4,11	5,84	8,61	21,30
0,250	5,86	5,90	6,98	19,78
0,333	11,20	12,40	14,60	25,90
0,417	16,80	18,03	19,85	30,50

Analisando a figura 2.27. o coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio, determinado na ausência de células, varia linearmente em função do aumento da agitação.

Para os diferentes caudais de arejamento testados, é possível estabelecer regressões lineares entre o  $K_L a$  e a agitação (figura 2.27.). Estas relações estabelecidas permitem determinar o valor do  $K_L a$  para um determinado valor de agitação imposto, mantendo constante o caudal de arejamento fornecido à cultura. Linearidade idêntica, tanto para a agitação como para o arejamento, foi determinada por Lima-Costa (1994) para este tipo de biorreactor. Leckie *et al.* (1991b) para um reactor biológico equipado com uma turbina de 6 pás, obteve igualmente linearidade para o  $K_L a$  em função da agitação, variando esta entre 0 e 300 rpm. Também, Hong *et al.* (1989) estabeleceram correlações entre a agitação e o arejamento com o  $K_L a$ , para dois tipos de biorreactores, um *airlift* e um sistema em frasco com duas chicanas.

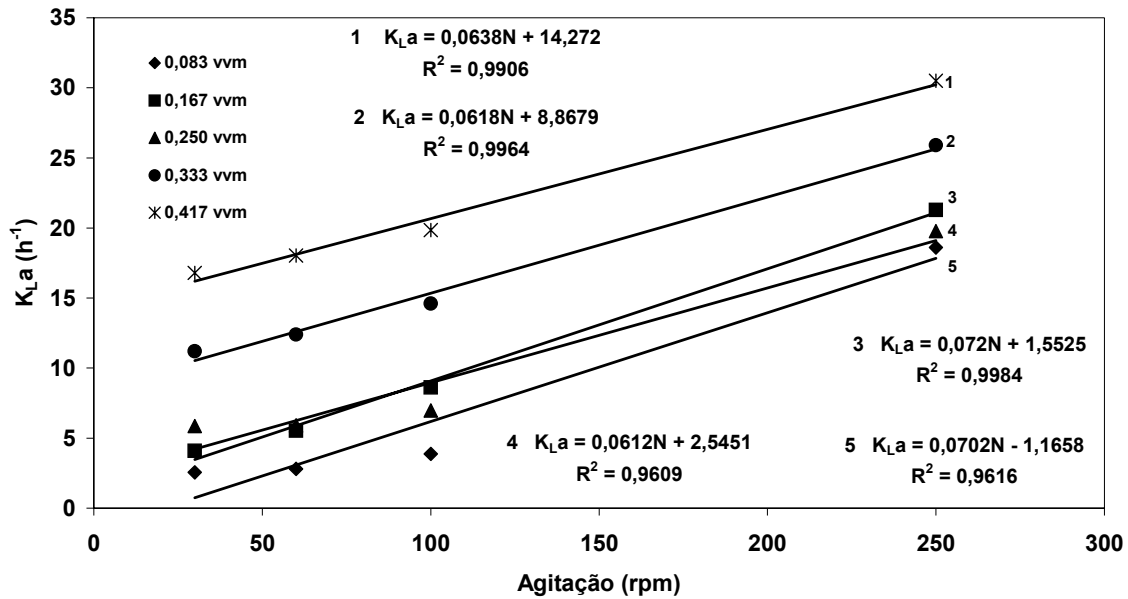
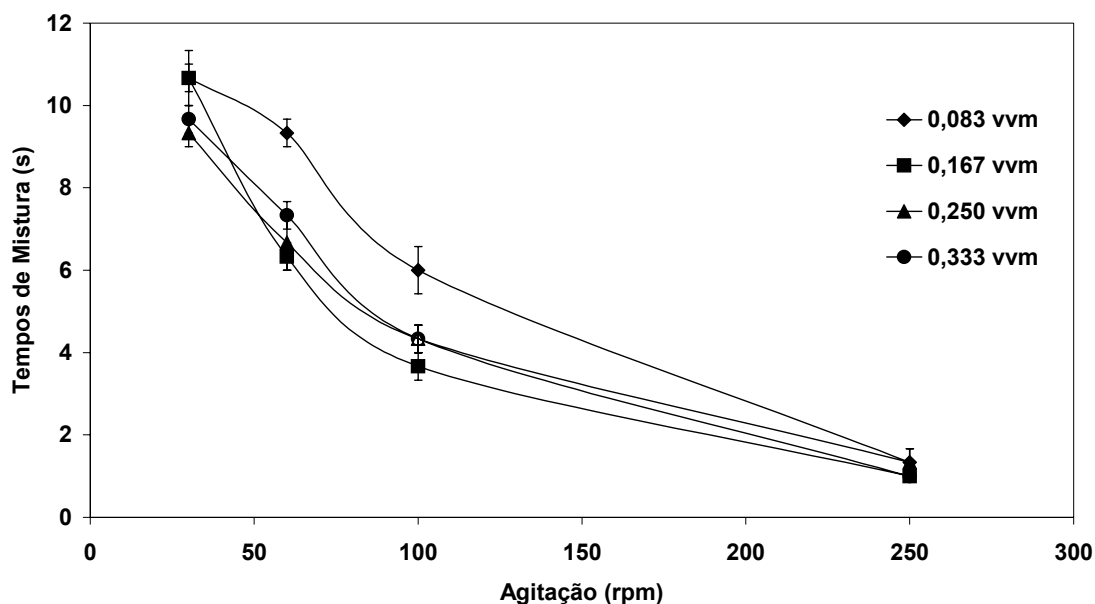


Figura 2.27. – Relações lineares, para diferentes arejamentos, do  $K_{La}$  em função da agitação.

### 2.3.2.2. Tempos de mistura

De modo a relacionar a homogeneidade da cultura com a agitação e a sua influência, foram determinados os tempos de mistura para o reactor biológico de 2 L. Este parâmetro foi determinado apenas com água destilada, com volume igual à da suspensão celular. Por análise da figura 2.28. observa-se que os tempos de mistura diminuem substancialmente com o aumento da velocidade de agitação. O arejamento tem fraca influência na diminuição dos tempos de mistura. Para as mesmas velocidades de agitação, o ensaio decorrido a um caudal de arejamento de 0,083 vvm apresenta tempos de mistura superiores aos obtidos para os outros caudais testados, sendo esta diferença dissipada para a velocidade de 250 rpm. As curvas obtidas dos tempos de mistura em função da velocidade de agitação praticamente sobrepõem-se para os caudais de 0,167, 0,250 e 0,333 vvm. A agitação é o principal parâmetro a ser considerado para promover a homogeneização da cultura. Verificou-se que apenas os tempos de mistura determinados para o caudal de arejamento de 0,083 vvm eram significativamente diferentes (teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ ,  $P \leq 0,05$ ).

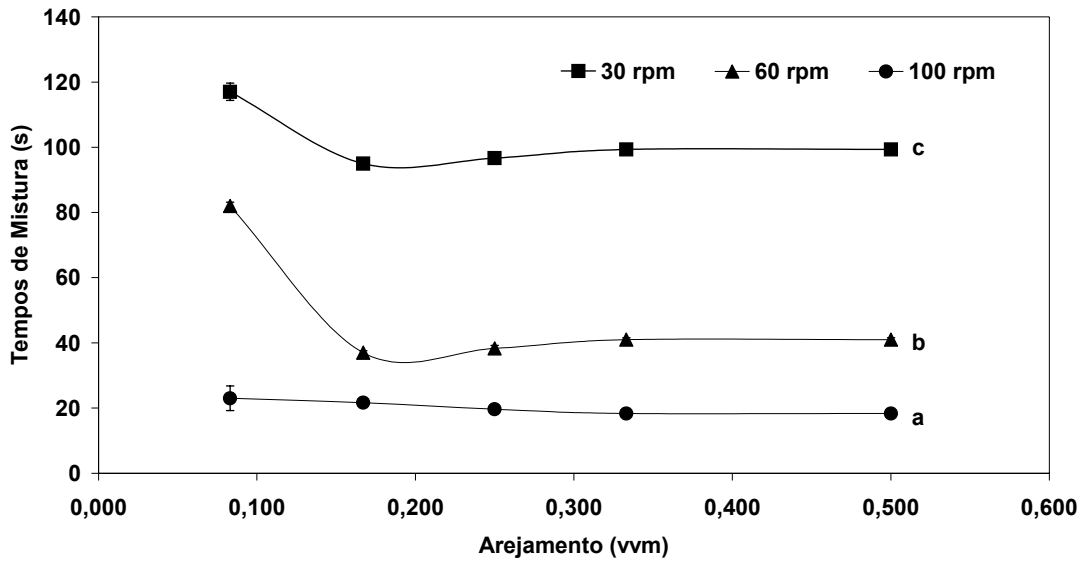
Estudos realizados por outros autores num biorreactor de 11 L com um agitador de dupla hélice, demonstraram que velocidades de agitação superiores a 120 rpm não aumentavam a eficiência de mistura (Jolicoeur *et al.*, 1992). Também velocidades de agitação inferiores a 60 rpm resultavam na sedimentação parcial da suspensão.



**Figura 2.28.** – Tempos de mistura em biorreactor de 2 L mecanicamente agitado, para diferentes condições de agitação/arejamento, utilizando água. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

Os tempos de mistura, apresentados na figura 2.28. foram determinados apenas para um sistema de fase simples, água destilada. Contudo, a presença de sólidos, como ocorre nas suspensões celulares, pode influenciar fortemente o tempo de mistura. De forma a estudar o comportamento de um fluido com viscosidade mais elevada, determinaram-se os tempos de mistura de uma suspensão de goma de xantano a 0,1% (p/v) (figura 2.29.). Os tempos de mistura obtidos com esta solução são significativamente superiores aos obtidos no sistema de fase simples. Os tempo de mistura para sistemas aquosos variam entre 1 e 12 s, aproximadamente, e para a suspensão de goma de xantano variam entre 20 e 120 s. Estes resultados são concordantes com os referidos por Kraume (1992), que verificou que a presença de sólidos numa solução aumenta cerca de 10 vezes o tempo de mistura relativamente a um sistema de fase simples. O mesmo se passa com a posição da sonda ou do observador para verificar a descoloração do vaso, visto este parâmetro ser determinado por uma reacção colorimétrica. Este autor também verificou que a posição da sonda é crítica, podendo influenciar a determinação do tempo de mistura.

Como se pode ver na figura 2.29., para a agitação de 30 e 60 rpm, a partir do caudal de arejamento de 0,167 vvm, os tempos de mistura mantêm-se praticamente constantes. A 100 rpm, o arejamento não influencia os tempos de mistura. A agitação é o parâmetro condicionante para uma boa homogeneização das culturas celulares.



**Figura 2.29.** – Determinação dos tempos de mistura em biorreactor de 2 L mecanicamente agitado, para diferentes condições de agitação/arejamento, utilizando uma solução de goma de xantano a 0,1 % (p/v). Valores médios  $\pm$  erro padrão (n=3, Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , curvas com letras diferentes representam curvas médias significativamente diferentes).

Galíndez-Mayer *et al.* (2001) em estudos realizados num reactor tipo *airlift* demonstraram que a altura do líquido no interior do vaso, tinha influência nos tempos de mistura, assim como no coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio. Os tempos de mistura aumentavam e o  $K_L a$  diminuía com o aumento da altura do líquido.

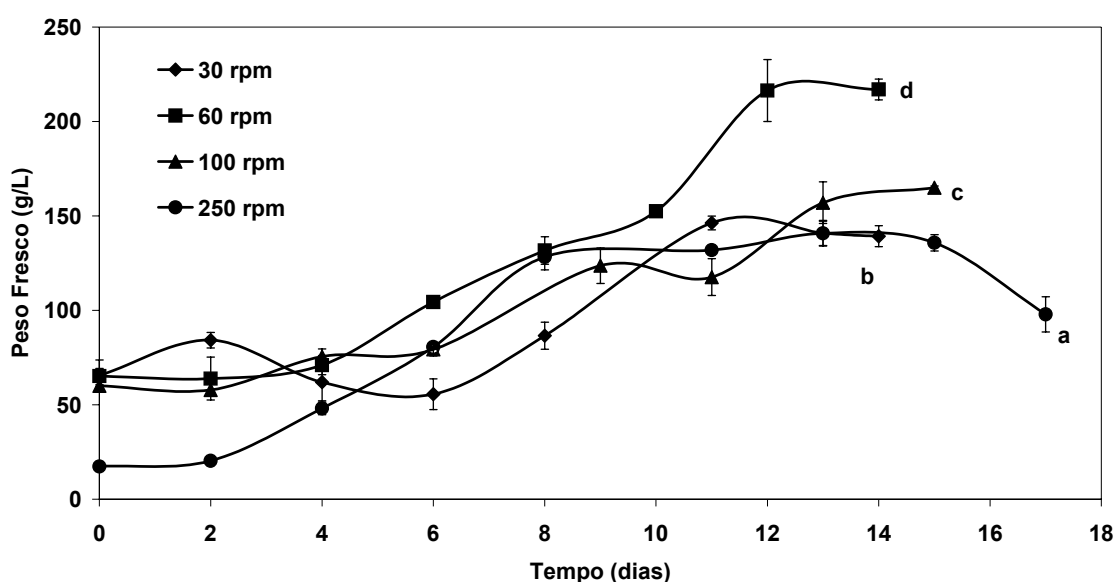
### 2.3.2.3. Efeito da agitação no crescimento das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*

O objectivo deste estudo é analisar a influência da agitação, mantendo constante o arejamento, no crescimento celular e na produção de metabolitos nas suspensões celulares de *Centaurea calcitrapa*.

Os ensaios de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa* foram realizados num biorreactor de 2 L mecanicamente agitado, para diferentes agitações (30,60, 100 e 250 rpm) e arejamento constante (0,083 vvm). Nestes ensaios foram usadas condições de baixo arejamento, com o objectivo de minimizar eventuais efeitos de stresse celular, visto as necessidades de arejamento das culturas de células vegetais serem reduzidas (Payne *et al.*, 1987). Estes ensaios enquadram-se nos estudos de longa duração, em que as células são expostas a forças de tensão durante o ciclo de crescimento.

### 2.3.2.3.1. Perfil de crescimento

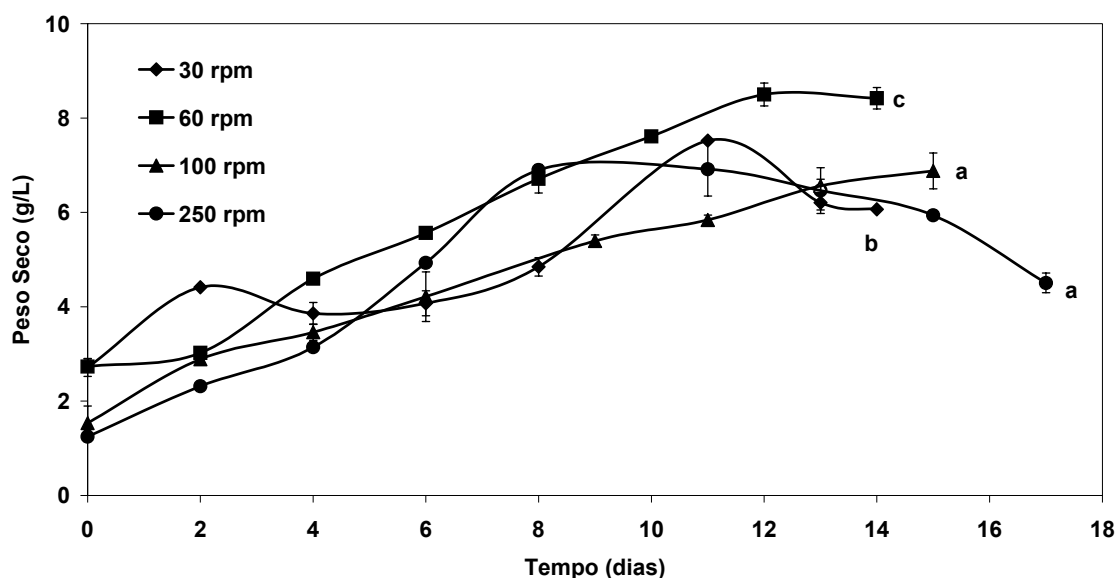
O crescimento das células em suspensão de *C. calcitraba*, crescidas em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado, para diferentes condições de agitação e arejamento constante (0,083 vvm), em que o  $K_L a$  varia entre 2,56 e  $18,6 \text{ h}^{-1}$ , são apresentados nas figuras 2.30. e 2.31.. A cultura que decorreu a 30 rpm, apresentou uma longa fase de adaptação de 6 dias, seguida de uma fase exponencial de 5 dias. Enquanto que a cultura que cresceu a uma agitação de 60 rpm, apresentou uma fase de adaptação de 2 dias, seguida de uma fase exponencial de 10 dias. As culturas que decorreram a 100 e 250 rpm têm, igualmente, uma fase de adaptação de 2 dias (figura 2.31.). A fase exponencial foi de 13 dias para a cultura a 100 rpm e de 6 dias, para a cultura a 250 rpm.



**Figura 2.30.** – Variação do peso fresco ao longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitraba*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , curvas com letras diferentes representam curvas médias significativamente diferentes).

A cultura cultivada a 30 rpm é a que apresenta fase de adaptação mais longa. Igualmente, esta cultura e a que decorreu a 250 rpm são as que apresentam menores fases exponenciais, comparativamente com as culturas a 60 e 100 rpm. A 30 rpm, a agitação pode não ser suficiente, provocando uma deficiente homogeneização da cultura e uma fraca acessibilidade dos nutrientes às células. Enquanto a 250 rpm, a agitação pode ser excessiva para a suspensão celular, provocando um maior stresse hidrodinâmico na cultura. A

suspensão celular tem uma fase exponencial relativamente curta, de 6 dias, possivelmente devido ao stresse hidrodinâmico, provocado pela agitação. Após o 8º dia, a cultura entra numa fase estacionária, seguida de uma fase de declínio.

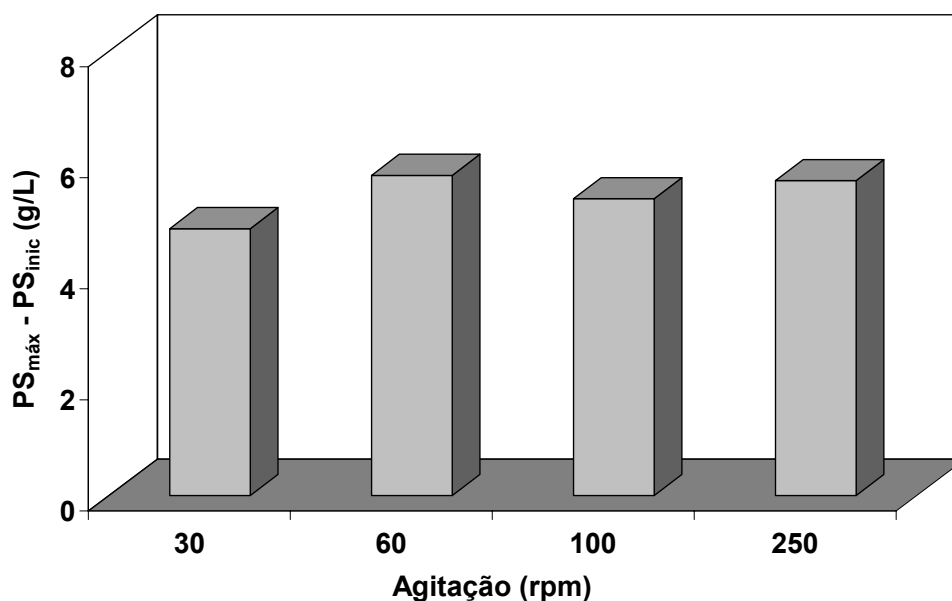


**Figura 2.31.** – Variação do peso seco ao longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrpa*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , curvas com letras diferentes representam curvas médias significativamente diferentes).

Contudo, observando a figura 2.32., em que é apresentada a biomassa máxima formada, obtida da diferença entre a biomassa máxima e a inicial, constatamos que os valores de biomassa formada são bastante semelhantes para as diferentes culturas. A cultura que decorreu a 30 rpm apresenta um valor ligeiramente inferior às outras culturas, enquanto a cultura a 60 rpm apresenta um valor ligeiramente superior. No entanto, estas diferenças na biomassa formada não são significativas. Assim, pode dizer-se que os valores de biomassa produzidas pelas diferentes culturas são semelhantes, indicando que o nível de agitação introduzido não interfere na capacidade produtiva das células.

A tabela 2.9. apresenta os parâmetros de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrpa*, cultivadas em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado, a diferentes  $K_L a$ . A cultura que decorreu a 250 rpm é a que apresenta taxa específica de crescimento e produtividade máxima mais elevadas, comparativamente com as restantes culturas. No entanto, estes parâmetros foram determinados tendo em conta a curta fase exponencial que esta cultura apresentou (6 dias), comparativamente com a das restantes culturas. Em

termos de rendimento de biomassa, a cultura cultivada a 60 rpm é a que tem maior valor, não sendo contudo muito diferente do obtido para 250 rpm (0,296 g PS/g glucose).



**Figura 2.32.** – Biomassa máxima formada para as células em suspensão de *C. calcitrata*, cultivadas em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado e a diferentes condições de agitação e arejamento constante.

**Tabela 2.9.** – Parâmetros de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrata*, crescidas em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

AGITAÇÃO (rpm)	$K_LA$ ( $h^{-1}$ )	$\mu_g$ ( $dia^{-1}$ )	PRODUTIVIDADE MÁXIMA (g PS/L.dia)	$Y_{x/s}$ (g PS/g glucose)	$q_s$ (g glucose/g PS.dia)
30	2,56	0,125	0,706	0,288	0,434
60	2,81	0,129	0,603	0,301	0,429
100	3,87	0,090	0,361	0,283	0,318
250	18,6	0,184	0,789	0,296	0,622

A cultura que decorreu a 100 rpm é a que apresenta os valores dos parâmetros de crescimento mais baixos, comparativamente com as restantes culturas. Este facto, poderá ser devido aos inóculos usados para iniciar as diferentes culturas, se encontrarem em diferentes estados de desenvolvimento. Embora se tente que os inóculos usados nas diferentes culturas sejam idênticos, estejam em idêntico estado fisiológico, com os mesmos

dias de cultura, existe sempre alguma variabilidade, devido a estarmos perante sistemas vivos.

Ho *et al.* (1995) observaram que as células em suspensão de *Nicotiana tabacum* eram sensíveis às condições de produção em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado. Aumentando a velocidade de agitação, a taxa específica de crescimento e a biomassa final formada de suspensões celulares de *N. tabacum*, diminuía. A quantidade de biomassa formada diminuía de 11,8 g PS/L, a 100 rpm para 8,6 g PS/L, a 325 rpm, o que corresponde a uma redução de 27% na densidade celular. Também as células em suspensão de *Stizolobium hassjoo* (Chen & Huang, 2000) crescidas em biorreactor mecanicamente agitado a diferentes velocidades de agitação (100 – 500 rpm), se mostraram sensíveis à agitação. A 300 rpm obtiveram a taxa específica de crescimento mais elevada, em relação às outras velocidades de agitação testadas. A concentração final de biomassa foi de 21,5 g PS/L. A 200 rpm, tanto a taxa específica de crescimento como a biomassa foram ligeiramente inferiores à obtida a 300 rpm. No entanto, tanto a 100 rpm como a 500 rpm, observaram uma diminuição significativa tanto da taxa específica de crescimento como da biomassa formada. A 100 rpm, a agitação foi insuficiente para obterem uma mistura homogénea da cultura enquanto que, a 500 rpm, a agitação foi demasiado vigorosa, provocando danos às células em suspensão (Chen & Huang, 2000).

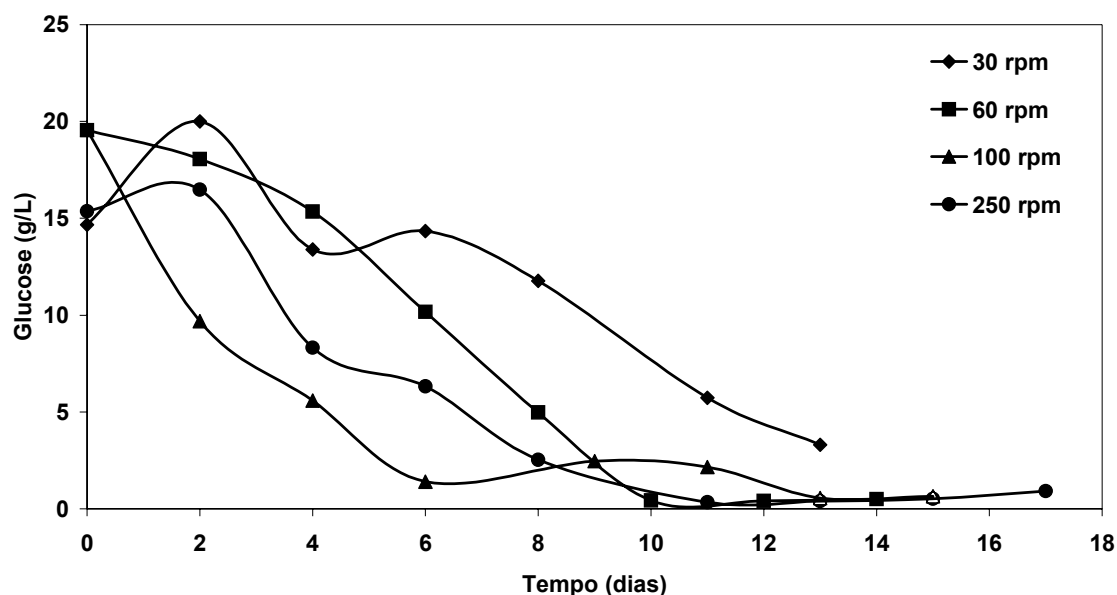
Lima-Costa *et al.* (1997) verificaram que as células em suspensão de *Cynara cardunculus*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado, eram sensíveis ao stresse hidrodinâmico para valores de  $K_L a$  superiores a  $14 \text{ h}^{-1}$ .

As células em suspensão de *Catharanthus roseus* são o exemplo de uma linha celular resistente ao stresse hidrodinâmico, provocado pela agitação mecânica, durante a fase activa do crescimento. A taxa específica de crescimento atinge o valor de  $0,45 \text{ dia}^{-1}$ , para uma agitação mecânica de 80-100 rpm (Drapeau *et al.*, 1986). Esta linha celular mostrou uma maior resistência ao stresse hidrodinâmico, ao suportar velocidades de agitação de 1000 rpm (Leckie *et al.*, 1991a). Igualmente, as células de *Picrasma quassioides*, após um ano de cultivo, adquiriram resistência ao stresse hidrodinâmico, provocado pela agitação (Scragg *et al.*, 1988).

De acordo com a figura 2.33. e analisando o consumo da fonte de carbono, para os diferentes crescimentos, a diferentes velocidades de agitação e arejamento constante, verifica-se que as culturas que decorreram a 100 e 250 rpm são as que apresentam um decréscimo mais rápido da concentração de glucose no meio. Este facto poderá ser devido a uma maior transferência de massa deste nutriente para as células, proporcionada pela elevada agitação (100 e 250 rpm). No entanto, o valor da taxa específica de consumo de glucose para a cultura a 100 rpm ( $0,318 \text{ g glucose/g PS dia}$ ) é baixo, comparativamente com

o das restantes culturas. Igualmente, esta cultura é a que apresenta menor taxa específica de crescimento, produtividade e rendimento de biomassa (tabela 2.9.), comparativamente com as culturas desenvolvidas a outras velocidades de agitação.

As células em suspensão de *S. hassjoo*, embora apresentem uma taxa específica de crescimento a 400 rpm menor do que a obtida a 200 rpm, o consumo da fonte de carbono era maior. Segundo os autores, este facto deveu-se às células consumirem mais energia de forma a compensarem os danos produzidos pela elevada agitação (Chen & Huang, 2000).

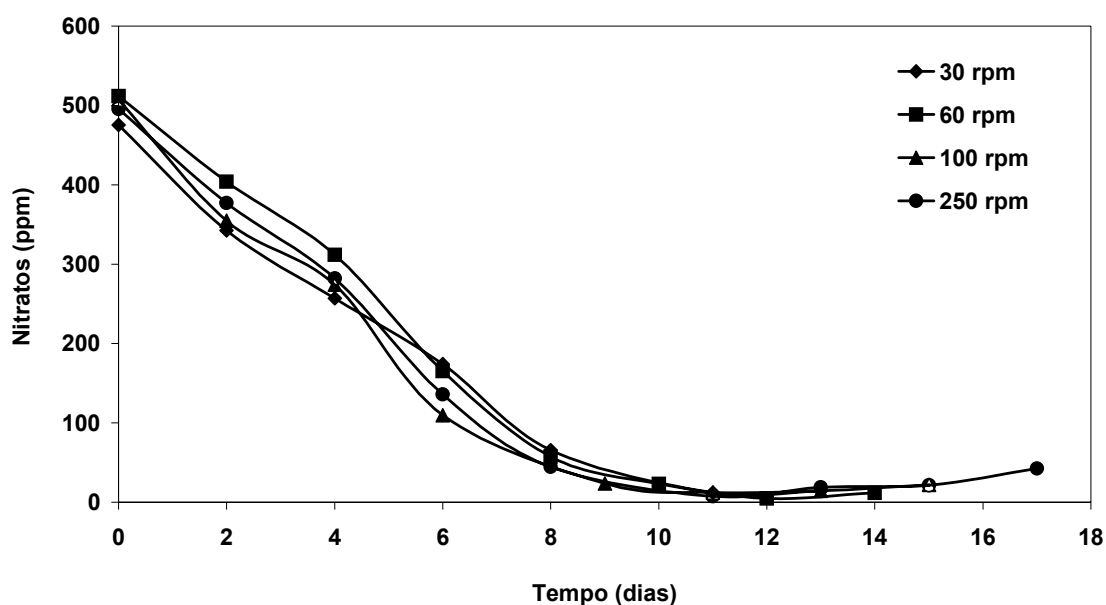


**Figura 2.33.** – Consumo da fonte de carbono (glucose) longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

Analisando a taxa específica de consumo de glucose ( $q_s$ ), apresentada na tabela 2.9., constata-se que a cultura que decorreu a 250 rpm é a que apresenta o valor mais elevado (0,622 g glucose/g PS.dia), confirmando uma elevada taxa de transferência de massa, devido à elevada agitação. Enquanto a cultura a 100 rpm apresentou o valor mais baixo (0,318 g glucose/g PS.dia). As culturas a 30 e 60 rpm têm valores idênticos de taxa específica de consumo de glucose. Contudo, a 30 rpm não houve esgotamento da fonte de carbono no final da fase exponencial, possivelmente devido à deficiente agitação, como já foi referido anteriormente.

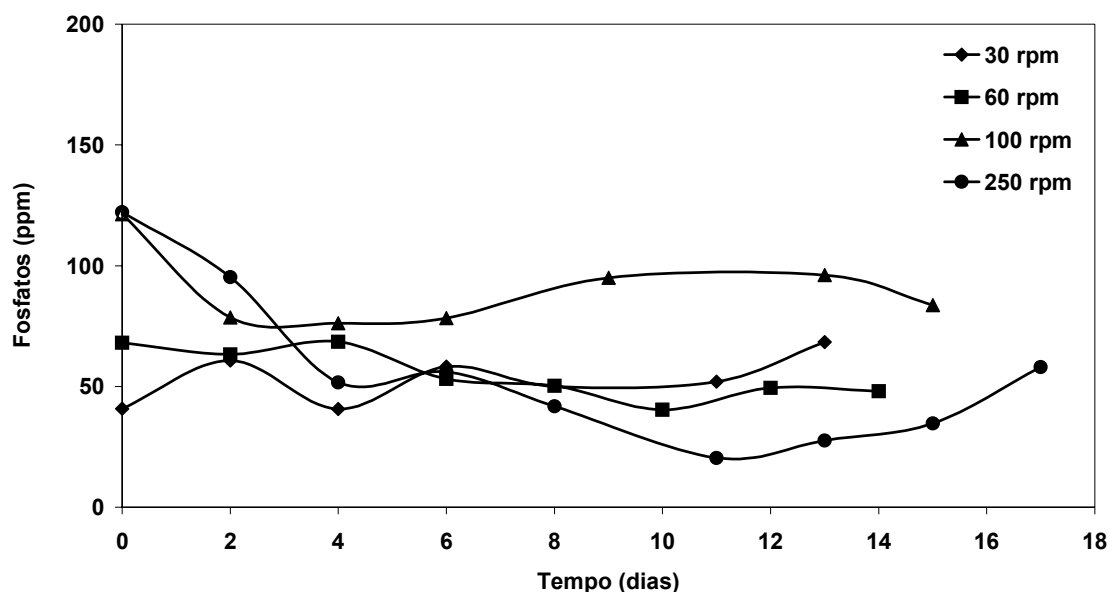
Para as culturas de *C. calcitrapa* crescidas nas diferentes condições de agitação e arejamento constante, foram também analisados os consumos dos nutrientes inorgânicos, fósforo e azoto, sob a forma de nitrato. Observa-se através da figura 2.34., que em todas as

culturas o perfil do consumo de nitratos é bastante semelhante. Ao 10º dia de cultura tem-se o esgotamento da fonte de azoto. Apenas a cultura que decorreu a 30 rpm se encontra na fase estacionária, ao 10º dia de cultura. As restantes culturas ainda se encontram na fase de crescimento activo. Nas condições estudadas, pensa-se que este nutriente não é limitativo do desenvolvimento celular da *C. calcitrapa*.



**Figura 2.34.** - Consumo dos nitratos longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

Em relação ao consumo da fonte de fósforo inorgânico (figura 2.35.) observa-se que não há esgotamento deste nutriente, ao longo do crescimento das culturas, crescidas em diferentes condições. O fósforo inorgânico é um dos nutrientes que mais influencia o crescimento e o metabolismo das plantas. É um constituinte essencial de numerosas moléculas biológicas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, glúcidos fosfatados, proteínas e nucleótidos. Actua como regulador da glicólise, respiração, fotossíntese e metabolismo do amido. No entanto, a sua principal função é desempenhada na transferência energética do ciclo ATP – ADP. Analisando a figura 2.35., observamos que não há esgotamento do fósforo inorgânico no meio de cultura. Este composto encontra-se em excesso ao longo de todo o ciclo de crescimento. A cultura que decorreu a 100 rpm apresenta um fraco consumo da fonte de fósforo inorgânico, podendo este dado ser indicativo do estado da cultura. Esta cultura pode não se encontrar em boas condições fisiológicas, ou pelo menos em idênticas condições das restantes culturas, como se pode constatar pelos valores dos parâmetros cinéticos, apresentados na tabela 2.9..



**Figura 2.35.** - Consumo do fósforo inorgânico longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

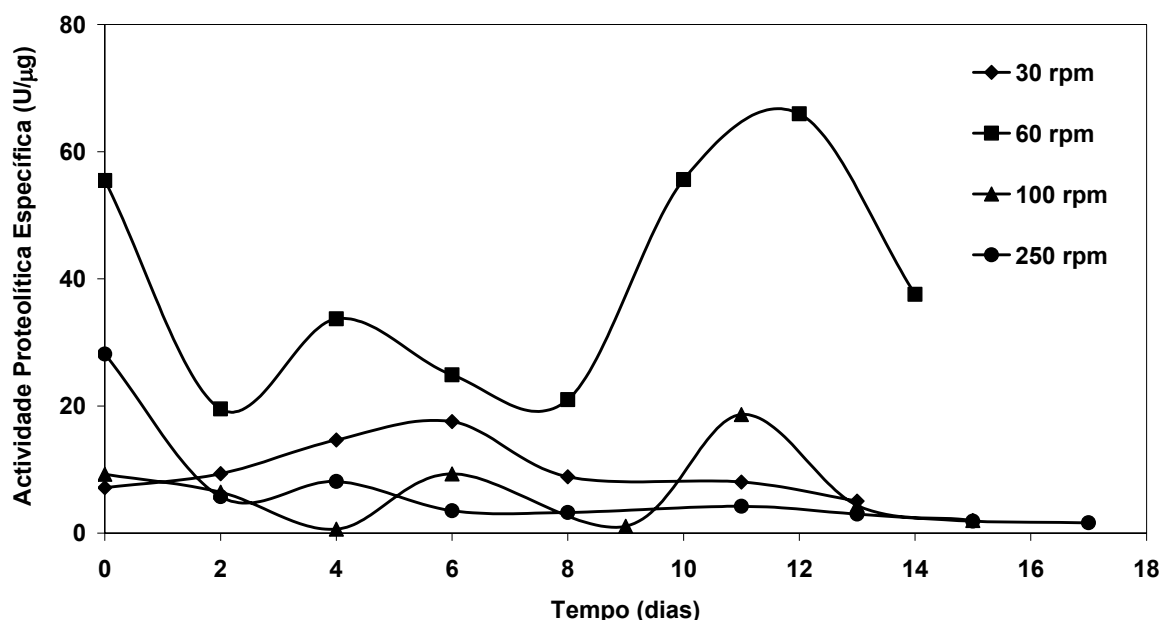
Comparando os valores dos parâmetros cinéticos obtidos neste ensaio, com os obtidos nas células em suspensão crescidas em Erlenmeyer (tabela 2.3.), com igual concentração de açúcar (30 g/L glucose), observa-se que o crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa* em Erlenmeyer se dá em melhores condições. Tanto a taxa específica de crescimento, como a produtividade de biomassa e o rendimento de consumo de substrato são superiores nos crescimentos realizados em Erlenmeyer.

A principal causa para as diferenças encontradas nos crescimentos em Erlenmeyer e em biorreactor mecanicamente agitado pode ser devidas às diferenças em teores de gases existentes entre estes dois sistemas, em particular à quantidade de  $O_2$  e  $CO_2$  dissolvido. Outras causas podem ser destacadas como sendo, a concentração de etileno e outros gases presentes, as necessidades nutricionais, as forças de tensão existentes no seio da cultura e ainda o volume de cultura (Zhao *et al.*, 2000).

#### 2.3.2.3.2. Efeito da agitação na produção de enzimas com actividade proteolítica

Com o intuito de se estudar o efeito da agitação na produção de metabolitos pela suspensão celular de *Centaurea calcitrapa*, avaliou-se quantitativamente a actividade proteolítica total não específica, ao longo do ciclo de crescimento, para diferentes agitações.

As melhores condições para a produção de enzimas com actividade proteolítica, pelas células em suspensão de *C. calcitraba* em reactor biológico mecanicamente agitado, foram obtidas para a agitação de 60 rpm, como se pode ver na figura 2.36. A fermentação que decorreu a 60 rpm destaca-se por se obter ao longo de todo o ciclo de crescimento valores mais elevados de actividade proteolítica, em relação às outras fermentações.



**Figura 2.36.** – Actividade proteolítica específica ao longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitraba*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

A 60 rpm tem-se a formação de um pico de actividade proteolítica específica ao 12º dia de cultura, correspondendo ao final da fase exponencial de crescimento. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Raposo (1997) em que o máximo de actividade proteolítica foi atingido no final da fase exponencial. Os resultados são indicativos de que as proteases quantificadas são metabolitos primários. Idêntico resultado foi obtido por Lima-Costa (1994), com células em suspensão de *C. cardunculus*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado.

A actividade proteolítica é perdida ao longo do ciclo de crescimento para as condições ensaiadas de 30, 100 e 250 rpm, sugerindo que as células não se encontram em boas condições para a produção de enzimas com actividade proteolítica.

Nas condições de arejamento testado (0,083 vvm), pensa-se que 60 rpm seja a velocidade de agitação indicada para a produção de enzimas com actividade proteolítica em reactor

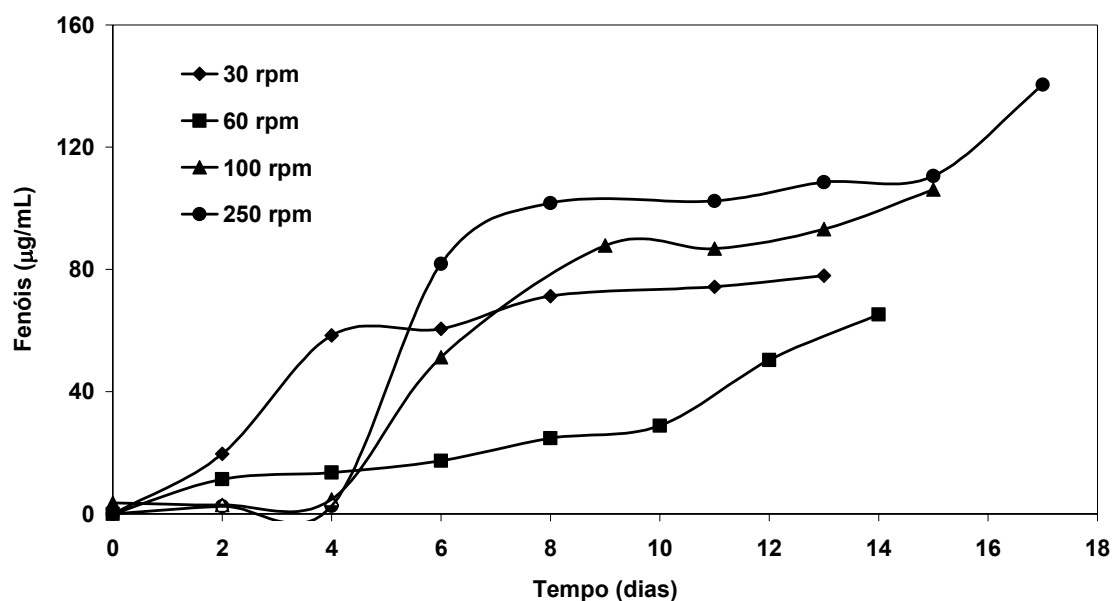
biológico mecanicamente agitado. Embora os parâmetros cinéticos determinados (tabela 2.9.) sejam indicativos de um bom crescimento celular das células de *C. calcitrapa* a 250 rpm, não há formação de enzimas com actividade proteolítica. Pensa-se que a secção a seguir apresentada, onde é estudada a influência da agitação no metabolismo celular, possa explicar este facto.

#### **2.3.2.3.3. A influência da agitação no metabolismo celular**

A resposta de um sistema biológico a um stresse imposto depende das características fisiológicas do sistema, assim como da natureza, intensidade e duração das condições de stresse. Habitualmente, o termo stresse está associado a aspectos prejudiciais para as células no entanto, a resposta do sistema pode ser positiva ou negativa.

A acumulação de compostos fenólicos no meio de cultura é utilizada, neste trabalho, como indicador metabólico de stresse. Um aumento na concentração de fenóis, é considerado em geral, um indicador de que as células não se encontram nas condições mais favoráveis de crescimento, visto os compostos fenólicos estarem associados ao metabolismo secundário. O metabolismo secundário é assim, activado resultando numa acentuada produção fenólica, que se encontra normalmente associado a uma situação de stresse ambiental (Hooker *et al.*, 1989).

A figura 2.37. apresenta a acumulação de compostos fenólicos no meio de cultura da suspensão de *C. calcitrapa*, para as diferentes condições de crescimento. Na generalidade, observa-se a acumulação deste tipo de compostos ao longo do ciclo de crescimento, atingindo um valor máximo na fase estacionária. No entanto, as culturas que decorreram a 100 rpm e 250 rpm apresentam um aumento considerável de compostos fenólicos no meio de cultura, comparativamente com as culturas a 30 e 60 rpm.



**Figura 2.37.** – Produção de compostos fenólicos longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

A cultura que decorreu a 60 rpm é a que apresenta menor acumulação de fenóis, em relação às outras culturas, tendo uma acumulação mais acentuada a partir do 10º dia de cultura, praticamente no final da fase exponencial e início da estacionária. Segundo Hooker *et al.* (1989) as culturas no final da fase exponencial e início da fase estacionária encontram-se mais susceptíveis aos danos provocados pelas diferentes forças de tensão, do que as culturas na fase de latência e início da exponencial ou mesmo no final da fase estacionária. Este facto é devido à expansão do volume celular e ao crescimento, que provoca a diminuição da elasticidade da parede celular e o aumento da permeabilização das células. A produção de fenóis tende a diminuir significativamente após o máximo da concentração destes ter sido atingida (Hooker *et al.*, 1989).

A 250 rpm tem-se um aumento drástico da acumulação de fenóis, entre o 4º e 8º dia de cultura, ou seja, durante a fase exponencial de crescimento. Os valores dos fenóis permaneceram elevados até ao 15º dia, sofrendo um novo aumento, com valores de aproximadamente 130 µg/mL de fenóis. Tendo em conta que, a acumulação de fenóis é um indicador de que a suspensão celular se encontra em condições de stresse hidrodinâmico, estes resultados sugerem que possivelmente a agitação de 250 rpm poderá ter sido agressiva para as células de *C. calcitrapa*. Embora os parâmetros cinéticos determinados (tabela 2.9.) demonstrem um bom crescimento, a fase exponencial de crescimento foi curta, de apenas 6 dias e, não houve produção de enzimas com actividade proteolítica,

comprovando que a agitação de 250 rpm poderá ter tido um efeito nefasto sob a cultura celular.

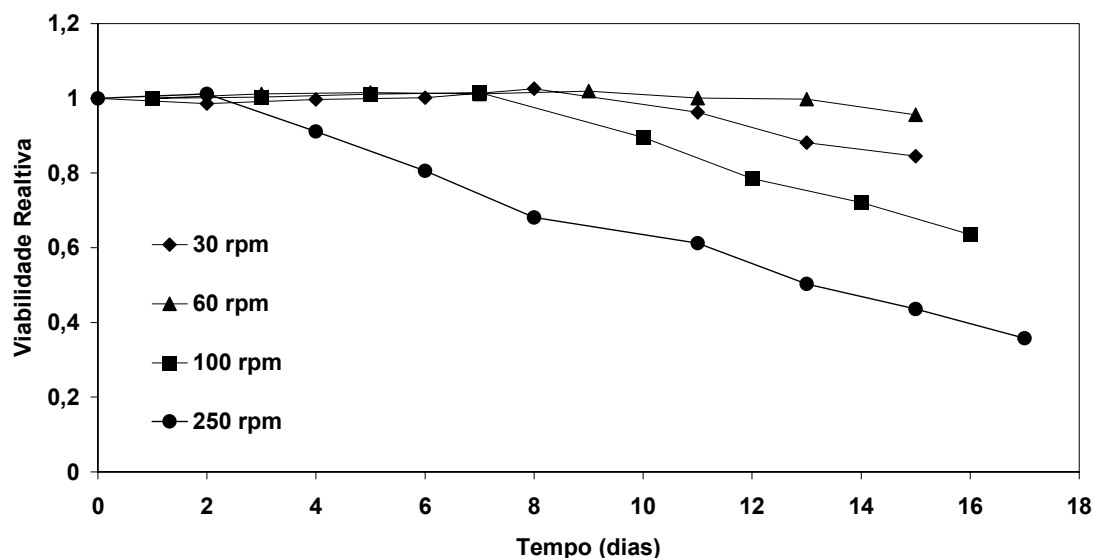
Resultados semelhantes foram obtidos por Lima-Costa *et al.* (1996) com células em suspensões de *Cynara cardunculus*, cultivadas em reactor mecanicamente agitado a 100 rpm. As células em suspensão de *C. cardunculus* apresentaram uma elevada acumulação de compostos fenólicos ao longo do ciclo de crescimento.

Igualmente, células em suspensão de *Catharanthus roseus*, cultivadas num sistema de leito fluidizado, apresentaram uma baixa produção de biomassa com elevada formação de compostos fenólicos, devido aos danos que as células sofreram, causadas pelas forças de tensão do forte caudal de arejamento no biorreactor (Zhao *et al.*, 2000). Foi ainda registado pelos autores, que as células cultivadas acastanhavam ao fim de poucos dias de cultura, restabelecendo a sua cor amarelada característica, após alguns dias de cultura. A observação microscópica permitiu observar a existência de células rebentadas, indicando que as células de *C. roseus* quando cultivadas em biorreactor de leito fluidizado são sensíveis às forças de tensão (Zhao *et al.*, 2000).

Analisando os valores da viabilidade celular, observa-se que as células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas a 30 e 60 rpm, apresentaram elevados valores de viabilidade, na ordem dos 80-90% ao longo do ciclo de crescimento (figura 2.38.). A 100 rpm, a viabilidade celular começou a diminuir a meio da fase exponencial, atingindo o valor de 64 % na fase estacionária. A cultura que decorreu a 250 rpm apresentou, logo desde o 2º dia de cultura, um decréscimo na viabilidade das células, atingindo um valor de 34 % no fim do ciclo de crescimento. A 250 rpm, as células de *C. calcitrapa* apresentaram um maior índice de mortalidade a partir do 8º dia, que é quando termina a fase exponencial e começa a estacionária. Este dado é concordante, com o referido por Hooker *et al.* (1989), em que as células no final da fase exponencial e início da fase estacionária encontram-se mais susceptíveis às forças de tensão, como já foi referido anteriormente.

A viabilidade das células de *C. calcitrapa*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado, decresce significativamente com o aumento da velocidade de agitação. Estes resultados são concordantes com os obtidos por outros autores (Takeda *et al.*, 1994; Keßler *et al.*, 1997; Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999), em que sugerem que, as células vegetais em suspensão podem sofrer danos provocados pela agitação em biorreactores agitados. Também, Ho *et al.* (1995) verificaram com suspensões celulares de *Nicotiana tabacum*, cultivadas em biorreactor mecanicamente agitado, que aumentando a agitação de 100 para 325 rpm, aumentavam os danos nas células, reflectindo-se estes na diminuição da biomassa formada e na diminuição da fracção de células viáveis. As taxas específicas de

crescimento diminuíram de  $0,175$  para  $0,077 \text{ dia}^{-1}$  e as taxas específicas de morte celular aumentaram de  $0,042$  para  $0,109 \text{ dia}^{-1}$ .



**Figura 2.38.** – Viabilidade relativa das células em suspensão de *C. calcitrapa*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

Outro indicador indirecto para avaliar se as células em suspensão de *C. calcitrapa* se encontram expostas a condições de tensão é o índice de expansão celular. Este índice definido como sendo a razão entre o peso fresco e o peso seco (PF/PS), é mais um indicador qualitativo das alterações do tamanho dos agregados/células. Analisando a tabela 2.10., observa-se que nas culturas que decorreram a 30, 60 e 100 rpm, o índice de expansão (PF/PS), medido na fase de latência e na fase estacionária, não apresentou grandes alterações no volume celular ao longo do ciclo de crescimento, em comparação com a cultura que decorreu a 250 rpm. Este facto, sugere que não houve uma redução do volume dos agregados celulares, devido à perda de água e/ou compostos intracelulares. Zhong *et al.* (1994) verificaram com células em suspensão de *Perilla frutescens* que o índice de expansão diminuía com o aumento da velocidade de agitação, indicando que as forças de tensão limitam a expansão do volume celular.

A cultura que decorreu a 250 rpm, ao contrário das culturas anteriores, apresenta um aumento do volume celular, com aumento do índice de expansão. Chen & Huang (2000) com células de *Stizolobium hassjoo* crescidas em biorreactor mecanicamente agitado, constataram que o índice de expansão aumentava com o tempo de cultura. Segundo estes autores, estes resultados eram indicativos de que as células em suspensão de *S. hassjoo*

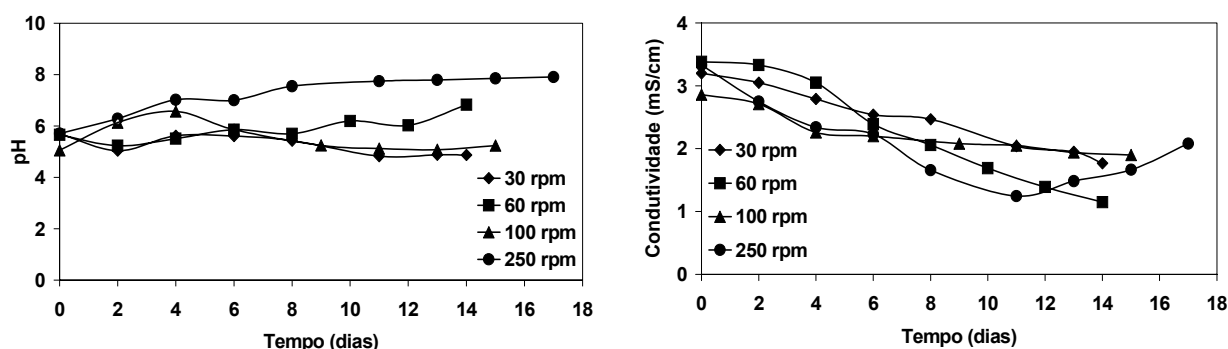
quando sujeitas a elevadas forças de tensão aumentavam a actividade da enzima polifenol oxidase, resultando na oxidação da L-tirosina em L-DOPA, que posteriormente armazenavam no vacúolo da célula, aumentando o volume desta.

**Tabela 2.10.** – Concentração de fenóis máxima e variação do índice de expansão, medido na fase de latência e estacionária.

AGITAÇÃO (rpm)	$K_{LA}$ ( $h^{-1}$ )	PF/PS <sub>latência</sub>	PF/PS <sub>estacionária</sub>	FENÓIS <sub>MÁX</sub> ( $\mu g/mL$ )
30	2,56	24,14	22,97	74,32
60	2,81	23,86	25,77	65,17
100	3,87	20,04	23,97	106,18
250	18,6	13,98	21,74	140,45

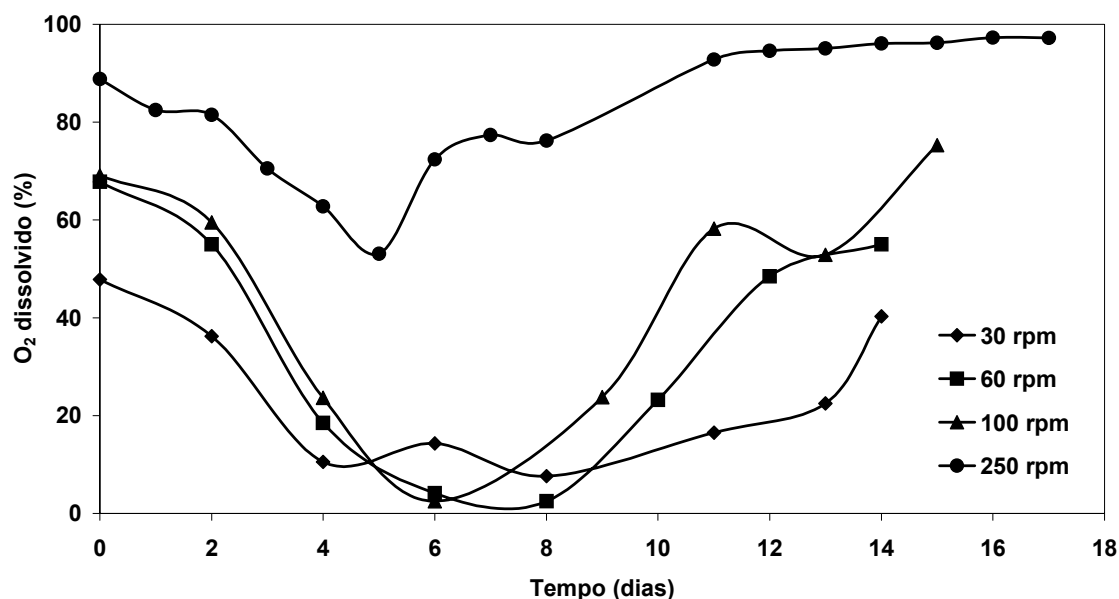
A figura 2.39. apresenta a variação dos valores de pH e da condutividade do meio de cultura. A variação dos valores de pH, ao longo das culturas de *C. calcitrapa*, não é significativa, apenas a cultura que decorreu a 250 rpm apresenta um pH mais elevado, variando este entre 5,7 e 7,9. Este aumento do pH da cultura pode estar relacionado com o aumento do stresse, causado pelo aumento da velocidade de agitação, provocando danos nas células que se reflectem pela possível libertação de material intracelular. Estes resultados vêm confirmar as alterações metabólicas que as células sofreram, com subsequente alteração do meio celular. No entanto, são contraditórios com os obtidos por Meijer *et al.* (1993) em que, segundo estes autores, a acidificação é uma resposta comum das células vegetais quando sujeitas a condições de elevado stresse.

O comportamento da condutividade ao longo do ciclo de crescimento é semelhante em todas as culturas desenvolvidas em diferentes condições de agitação (figura 2.39.). Observa-se o decréscimo dos valores da condutividade ao longo do tempo, indicativo do transporte dos sais existentes do meio de cultura. A cultura que decorreu a 250 rpm, apresenta a partir do 11º dia, início da fase declínio de crescimento celular, um aumento dos valores da condutividade, sugerindo que as células deixaram de transportar para o interior os nutrientes iónicos e acumulam no meio material intracelular.



**Figura 2.39.** – Variação do pH e da condutividade ao longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

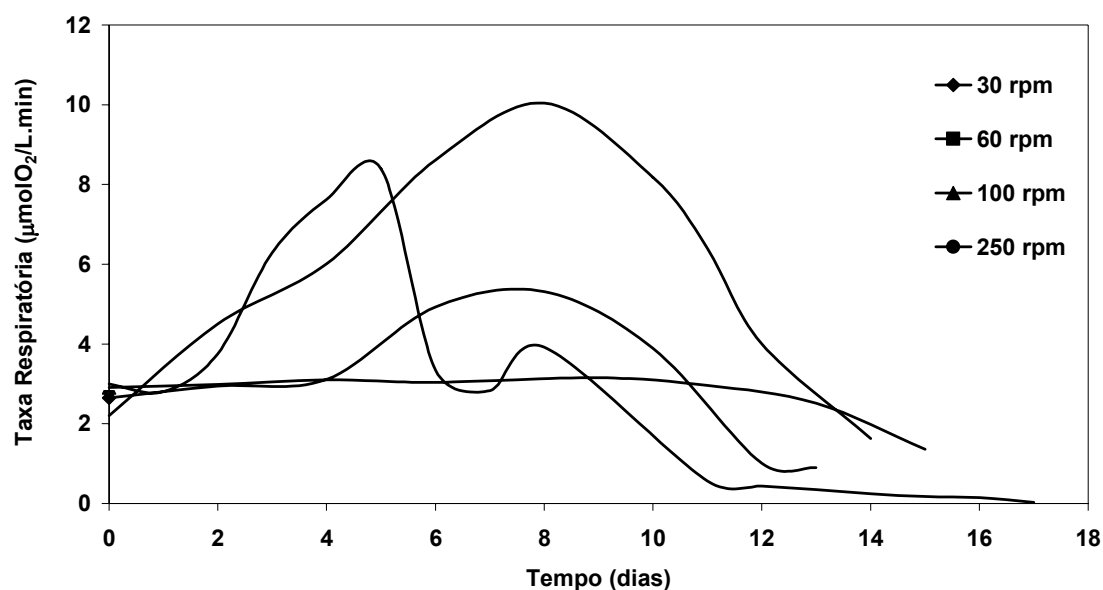
Um dos principais problemas associados à cultura de células vegetais, reside numa adequada transferência de massa do oxigénio, durante o ciclo de crescimento. A manutenção de um nível adequado de transferência de oxigénio das bolhas gasosas para o meio líquido, permitindo o controlo do oxigénio dissolvido e da homogeneidade da suspensão, é extremamente importante para que o crescimento celular da cultura não seja comprometido. A variação do oxigénio dissolvido nas culturas, que decorreram a diferentes condições de agitação e arejamento constante, é apresentado na figura 2.40.. Até ao 6º dia de cultura observou-se a diminuição da concentração de  $O_2$  no seio da cultura. A cultura a 250 rpm apresentou sempre níveis de  $O_2$  dissolvido elevados, acima dos 50 %, ou seja este nutriente não foi limitativo para o desenvolvimento da cultura. Esta cultura apresentou uma curta fase exponencial, que terminou ao 8º dia. O mesmo não se passou com as culturas que decorreram a 60 e 100 rpm, que sofreram limitação deste nutriente ao 6º dia de cultura, a meio da fase exponencial do crescimento. A menor disponibilidade de  $O_2$  dissolvido (< 20 %) no meio de cultura provocou uma diminuição na taxa respiratória (figura 2.41.), provocando stresse na cultura e consequentemente limitação no crescimento celular. A 30 rpm observou-se que não houve esgotamento do nutriente gasoso. Pensa-se que a baixa agitação (30 rpm) não tenha sido suficiente para o desenvolvimento da cultura, devido a deficiente transferência de massa. É importante que o crescimento das células em suspensão decorra do equilíbrio estabelecido entre um menor stresse hidrodinâmico e uma oxigenação adequada.



**Figura 2.40.** – Percentagem de oxigénio dissolvido ao longo do crescimento das células em suspensão de *C. calcitrans*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reator biológico de 2 L mecanicamente agitado.

Observando igualmente os perfis das taxas respiratórias para as diferentes culturas (figura 2.41.), verifica-se que a cultura que decorreu a 60 rpm é a que apresenta o aumento mais significativo deste parâmetro, diminuindo após o 8º dia de cultura, quando a concentração de oxigénio dissolvido é praticamente nula (figura 2.40.). Igualmente em todas as culturas, com excepção da 100 rpm, é visível o aumento da taxa respiratória nos primeiros dias de cultura, seguida de uma diminuição, a meio da fase exponencial, quando os níveis de oxigénio dissolvido nas culturas são mais baixos (figura 2.40.). A não disponibilidade deste nutriente torna-se limitativa, provocando stresse nas células, que é traduzido pela diminuição da TR.

O estado da cultura que decorreu a 100 rpm é igualmente reflectido por este parâmetro. A taxa respiratória da cultura que decorreu a 100 rpm apresentou sempre valores baixos, mantendo-se constante ao longo de todo o ciclo de crescimento, sendo indicador de baixa actividade metabólica, com baixa produção de biomassa.



**Figura 2.41.** – Valores da taxa respiratória ao longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, para diferentes condições de agitação e arejamento constante, em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

Analisando os perfis de oxigénio dissolvido (figura 2.40.) e taxa respiratória (figura 2.41.) da cultura que decorreu a 250 rpm, verifica-se que, a partir do 11º dia, a percentagem de oxigénio dissolvido é elevada, cerca de 90 %, e a taxa respiratória é praticamente nula. Combinando estes resultados com os obtidos do perfil de crescimento (peso seco, figura 2.31.), e da viabilidade celular relativa (figura 2.38.), em que se assiste ao declínio do crescimento celular, sugere-se que as células de *C. calcitrapa* são sensíveis ao stresse hidrodinâmico, provocado pela agitação.

Os parâmetros analisados neste trabalho mostraram ser bons indicadores para avaliar a resposta das células ao stresse hidrodinâmico, imposto pelas condições de cultura em biorreactor mecanicamente agitado. Os resultados obtidos neste ensaio, em condições de baixo arejamento (0,083 vvm), sugerem que as melhores condições para produção de biomassa e enzimas com actividade proteolítica foram a 60 rpm, com um  $K_La$  de  $2,81 \text{ h}^{-1}$ . Em termos dos parâmetros cinéticos, obtiveram-se valores elevados da taxa específica de crescimento, produtividade e rendimento de biomassa. A produção de compostos fenólicos foi baixa e não houve perda da viabilidade celular, ao longo do ciclo de crescimento. A 30 rpm, os valores da taxa específica de crescimento, rendimento e produtividade de biomassa foram baixos, reflectindo-se em baixos valores de biomassa formada. Assistiu-se igualmente, a uma deficiente transferência de massa devido à baixa agitação. A 250 rpm, os parâmetros cinéticos foram elevados. Com o aumento da agitação, houve uma maior

transferência de massa e uma maior homogeneização da cultura, ou seja, o consumo da glucose foi mais eficaz, reflectindo-se na produção de biomassa, com valores elevados da taxa específica de crescimento, produtividade e rendimento de biomassa. No entanto, estes valores de agitação provocaram a diminuição da fase exponencial de crescimento, aumentando igualmente a sensibilidade células, que se reflectiu na diminuição da viabilidade celular e elevada produção de compostos fenólicos. Assistiu-se igualmente à ausência de enzimas com actividade proteolítica, durante o ciclo de crescimento.

Assim, os resultados encontrados sugerem que, as suspensões de células de *C. calcitrapa* são sensíveis às forças de tensão, particularmente para valores de agitação de 250 rpm.

#### **2.3.2.3.4. Propriedades reológicas e aspectos morfológicos das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa***

As células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em reactor biológico para diferentes condições de agitação e arejamento constante, foram caracterizadas em termos reológicos. Estas características foram igualmente relacionadas com alguns aspectos morfológicos e fisiológicos da célula/agregado.

Foram construídos reogramas para diferentes concentrações de biomassa, das suspensões crescidas em biorreactor. Com base nos valores da velocidade de corte e da tensão de corte determinados, procedeu-se ao ajuste do modelo Ostwald-de Waele (Lei da Potência). As células em suspensão de *C. calcitrapa*, desenvolvidas em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado, apresentaram um comportamento típico de um fluido pseudoplástico (figuras 2.42. e 2.43.). Neste caso, a tensão de corte aumenta com a velocidade de corte a que a suspensão de células é sujeita, não se registando qualquer tensão inicial, quando a velocidade de corte é nula (figura 2.42.). Também a viscosidade aparente, para as diferentes concentrações de biomassa, diminui com o aumento da velocidade de corte (figura 2.43.).

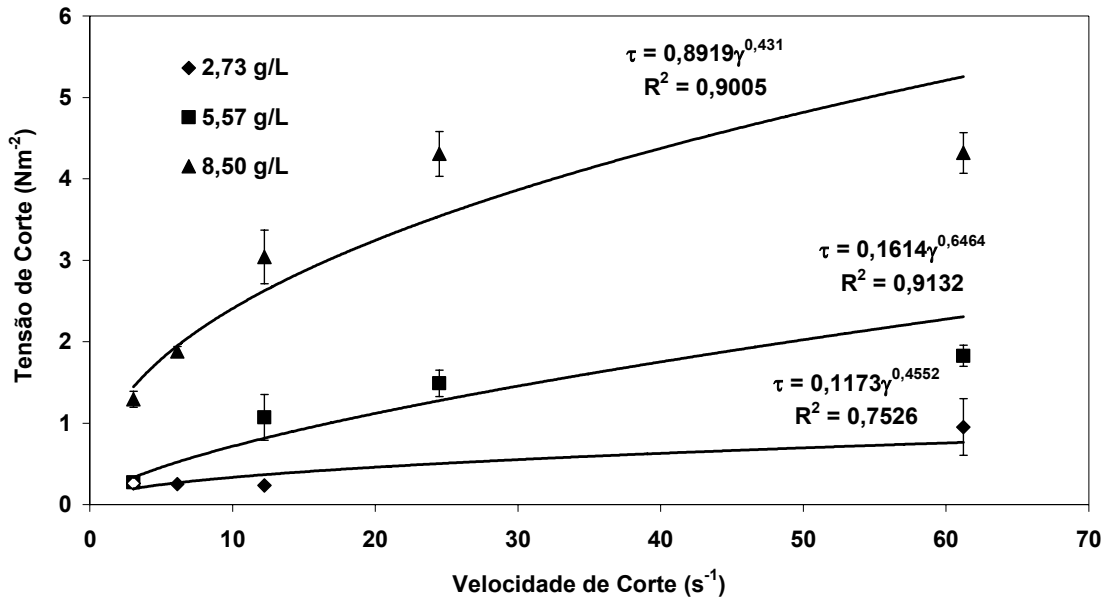


Figura 2.42. – Reograma das células em suspensão de *C. calcitraba*, para diferentes concentrações de biomassa, cultivadas em reactor biológico de 2 L, a 60 rpm. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão.

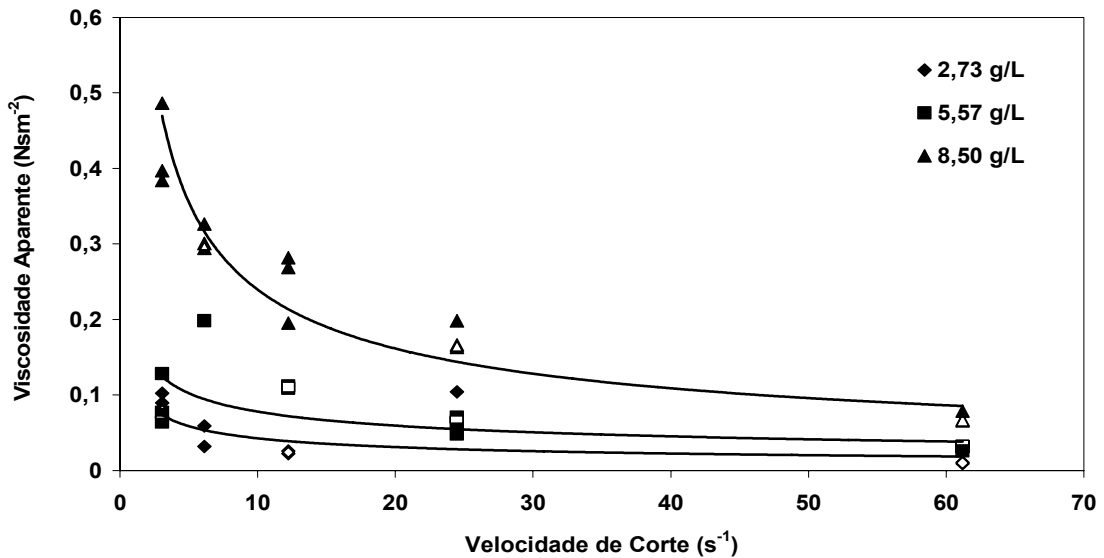
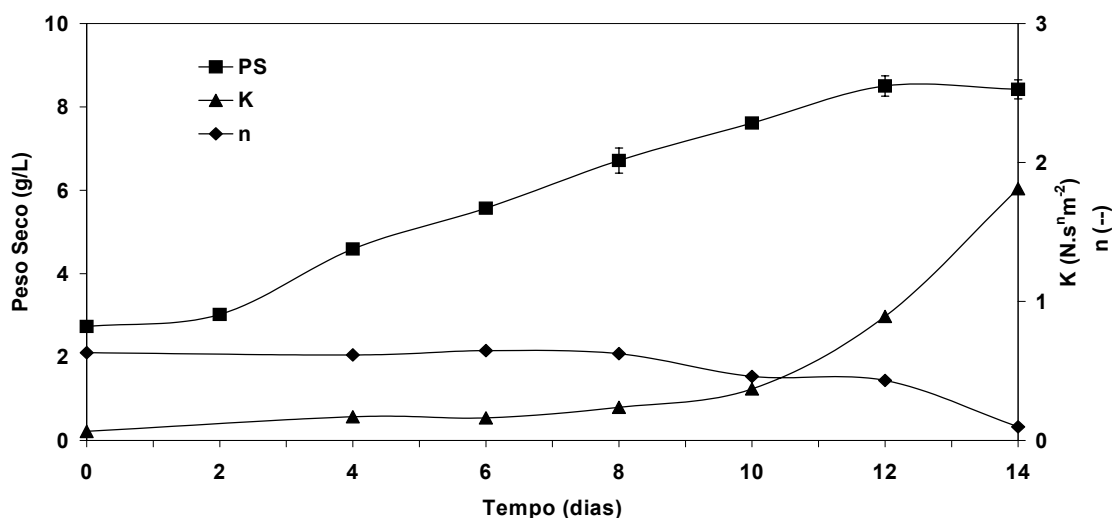


Figura 2.43. – Variação da viscosidade aparente das células em suspensão de *C. calcitraba*, cultivadas em reactor biológico de 2 L, a 60 rpm, em função da velocidade de corte.

A variação do índice de comportamento do fluido e do índice de consistência, ao longo do ciclo de crescimento, encontram-se representados na figura 2.44.. O índice de comportamento do fluido,  $n$ , decresce de 0,65 para 0,43, aproximadamente, com o aumento da concentração de biomassa, nos primeiros 12 dias de cultura. Entre o 12º e 14º dias de cultura, o índice de comportamento  $n$  atinge o valor de 0,1, enquanto a biomassa diminui

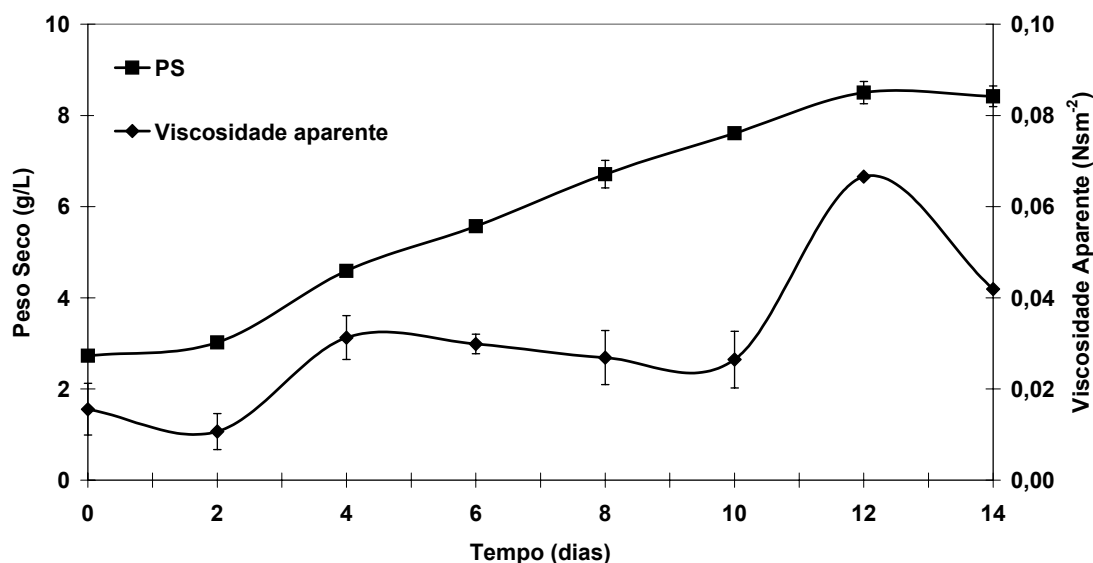
muito ligeiramente. Por outro lado, o índice de consistência,  $K$ , aumenta de 0,07 até ao valor de  $1,81 \text{ N}\cdot\text{s}^n\cdot\text{m}^{-2}$ , durante o ciclo de crescimento.



**Figura 2.44.** – Perfil de crescimento e evolução dos índices de comportamento do fluido e de consistência para as células em suspensão de *C. calcitraba*, crescidas em biorreactor mecanicamente agitado de 2 L. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

Tal como já foi referido anteriormente, *Cudriana tricuspidata* (Tanaka, 1982), *Catharanthus roseus* (Jolicouer *et al.*, 1992), *Nicotiana tabacum* (Curtis & Emery, 1993), *Morinda citrifolia* (Kieran, 1993) e *Solanum chrysotrichum* (Trejo-Tapia *et al.*, 2001) são alguns exemplos de culturas de células vegetais que apresentam comportamento pseudoplástico, tal como observado neste trabalho com as células de *C. calcitraba*. As células em suspensão de *Perilla frutescens* exibem características típicas de um fluido plástico de Bingham (Zhong *et al.*, 1992). Rodrigues-Monroy & Galindo (1999) observaram que as células em suspensão de *Beta vulgaris*, cultivadas em Erlenmeyer tinham um comportamento Newtoniano, para baixas concentrações de biomassa (4,1 g PS/L), tornando-se pseudoplástico para elevadas concentrações (9,8 g PS/L). Enquanto que, as células cultivadas em biorreactor mecanicamente agitado apresentam um comportamento pseudoplástico, para todos os níveis de biomassa produzidos.

A figura 2.45. apresenta a variação da viscosidade aparente, determinada para a velocidade de corte de  $61,15 \text{ s}^{-1}$ , ao longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitraba*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado. Com o início da fase exponencial, verifica-se o aumento da viscosidade aparente, permanecendo constante até ao 10º dia de cultura. Entre o 10º e o 12º dia, assiste-se ao incremento significativo da viscosidade aparente, diminuindo quando a cultura entra na fase estacionária.



**Figura 2.45.** – Variação da viscosidade aparente (calculado a  $\gamma = 61,15 \text{ s}^{-1}$ ) ao longo do perfil de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em biorreator mecanicamente agitado de 2 L. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

As diferenças observadas entre os perfis de crescimento das células de *C. calcitrapa*, crescidas em Erlenmeyer (figura 2.13.) e em biorreator mecanicamente agitado (figura 2.45.) podem ser causadas pelas diferenças observadas na dimensão dos agregados celulares das culturas crescidas nas diferentes condições. Em Erlenmeyer, como já foi referido no ponto 3.1.3.1., a dimensão dos agregados celulares decresce ligeiramente ao longo do ciclo de crescimento. No início do ciclo de crescimento, o diâmetro equivalente médio era de  $182,97 \mu\text{m}$  enquanto na fase estacionária era de  $170,99 \mu\text{m}$ . No entanto, nas culturas, desenvolvidas em reactor biológico de 2 L a uma velocidade de agitação de 100 rpm, observou-se uma redução acentuada no diâmetro equivalente médio, entre o início do ciclo de crescimento ( $174,05 \mu\text{m}$ ) e o final deste ( $83,13 \mu\text{m}$ ). Esta redução registada foi de cerca de 48 % do tamanho inicial dos agregados celulares, podendo influenciar o decréscimo na viscosidade aparente (figura 2.45.) observada ao 13º dia de cultura. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Takeda *et al.* (1994), em que o tamanho dos agregados celulares de *Cathamus tinctorius* diminui, quando cultivadas em reactor mecanicamente agitado ( $94 \mu\text{m}$ ) em comparação com as cultivadas em Erlenmeyer ( $106 \mu\text{m}$ ). Em oposição, Trejo-Tapia *et al.* (2001) observaram que a dimensão dos agregados de *S. chrysotrichum* se mantinha constante, quando crescidas em reactor biológico mecanicamente agitado. No entanto, estes autores também referem a tendência da forma dos agregados celulares para se alterar, de uma forma alongada para uma arredondada, podendo esta alteração influenciar o comportamento reológico da cultura.

#### **2.3.2.4. Influência do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_La$ ) no metabolismo das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa***

No ponto anterior (2.3.2.3.) estudou-se o efeito da agitação no crescimento das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* crescidas com baixo arejamento (0,083 vvm), em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado. Verificou-se que para as melhores condições de crescimento testadas (60 rpm e 0,083 vvm), o oxigénio se encontrava em concentrações limitantes, a partir do 8º dia de cultura, correspondendo a meio da fase exponencial de crescimento. De forma a tentar contornar este aspecto, em que o oxigénio e outros nutrientes não se encontrem em concentrações limitantes para o crescimento e a cultura se encontre com uma homogeneização adequada, foi planeado este ensaio. Assim, este ensaio consistiu em estudar a influência que o coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_La$ ), estimado para diferentes condições de arejamento-agitação, tem no crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*.

##### **2.3.2.4.1. O efeito do $K_La$ nas culturas de *Centaurea calcitrapa***

Uma das formas de adequar o oxigénio dissolvido às necessidades celulares, é através dos parâmetros de agitação-arejamento, que permite otimizar as condições de operação do reactor, de forma a que o oxigénio não se encontre em concentração limitante ao crescimento celular. Todavia, valores elevados de oxigénio dissolvido podem significar elevado  $K_La$  e como consequência elevado stresse hidrodinâmico para as células, o que pode levar à ruptura celular. Neste ensaio, procedeu-se ao crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, em biorreactor de 2 L mecanicamente agitado, a diferentes valores de  $K_La$ .

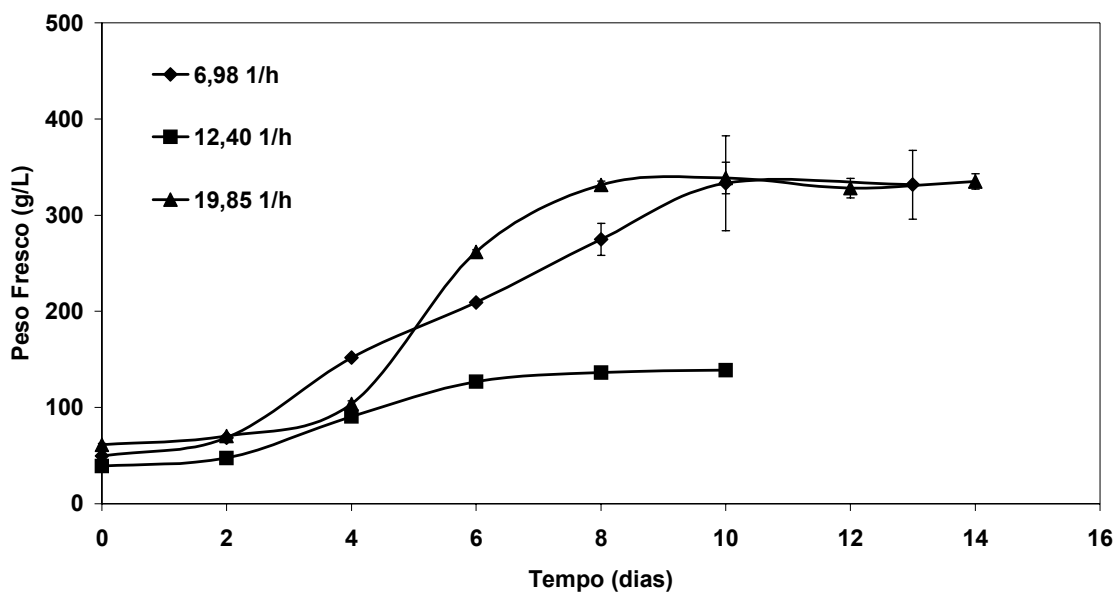
Como termo comparativo, apresenta-se também os resultados do ensaio anterior, sempre que se justificar. Assim, na tabela 2.11. são apresentados alguns parâmetros de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, referentes aos dois ensaios efectuados. O primeiro ensaio, apresentado na secção anterior, em que se manteve o arejamento e se variou a agitação e o presente ensaio, que foi realizado a diferentes  $K_La$ .

**Tabela 2.11.** – Parâmetros de crescimento da cultura de células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado, para diferentes  $K_{La}$  iniciais (determinados para meio SH, na ausência de células).

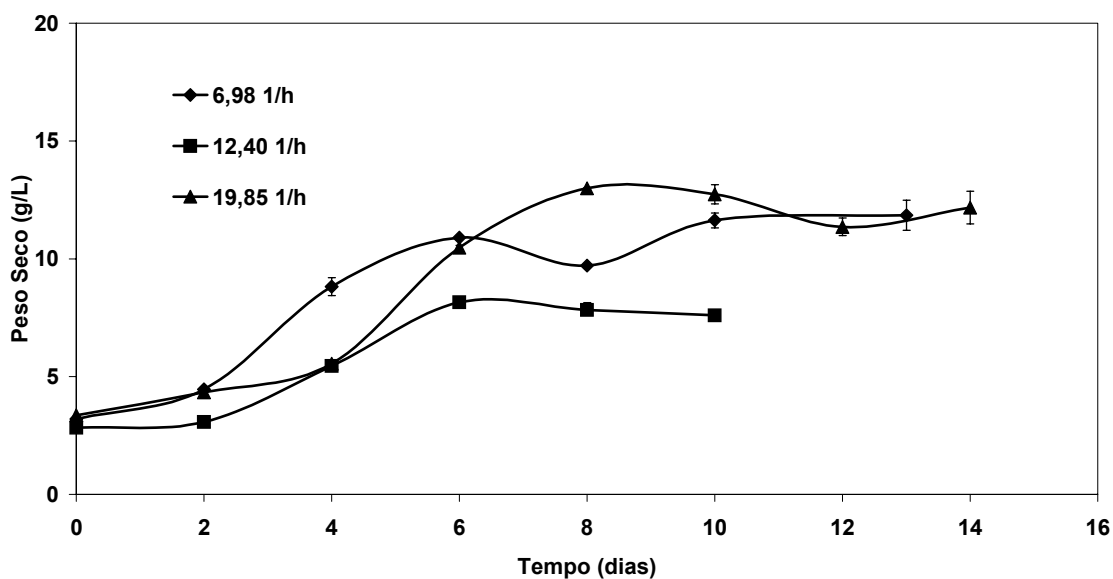
$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	AGIT./AREJ. (rpm/vvm)	$\mu_g$ ( $dia^{-1}$ )	PRODUTIVIDADE MÁXIMA (g PS/L.dia)	Yx/s (g PS/g glucose)	PS MÁXIMO (g/L)
2,56	30 / 0,083	0,125	0,706	0,288	7,52
2,81	60 / 0,083	0,129	0,603	0,301	8,50
3,87	100 / 0,083	0,090	0,361	0,283	6,88
6,98	100 / 0,250	0,223	1,610	0,254	11,85
12,40	60 / 0,333	0,244	1,270	0,246	8,16
18,60	250 / 0,083	0,184	0,789	0,296	6,92
19,85	100 / 0,417	0,213	1,860	0,402	12,99

A cultura que decorreu a um  $K_{La}$  de  $12,40 h^{-1}$  é a que apresenta maior taxa específica de crescimento,  $0,244 dia^{-1}$ . No entanto, cultura com um  $K_{La}$  de  $19,85 h^{-1}$  é a que apresenta maior produtividade, rendimento de biomassa e peso seco máximo. A cultura com um  $K_{La}$  de  $19,85 h^{-1}$  apresenta uma fase de adaptação de 4 dias, seguida de uma fase exponencial de igual duração (figura 2.46. e 2.47.). A biomassa formada pelas culturas crescidas a diferentes  $K_{La}$ , é bastante superior à obtida no ensaio realizado a baixo arejamento. As células em suspensão de *C. calcitrapa* apresentam um melhor crescimento perante condições de elevado arejamento. Contrariamente a estes resultados, Lima-Costa (1994) referiu que para valores de  $K_{La}$  superiores ou iguais a  $14 h^{-1}$ , as culturas de *Cynara cardunculus* crescidas em reactor biológico mecanicamente agitado apresentavam uma taxa específica de crescimento nula ou negativa e a produção de biomassa não era mensurável.

Comparando as culturas que decorreram a igual agitação de 60 rpm e diferente arejamento (0,083 e 0,333 vvm), com  $K_{La}$  de 2,81 e  $12,40 h^{-1}$ , respectivamente, constata-se que nas condições de maior arejamento se obteve uma taxa específica de crescimento e produtividade máxima de biomassa superiores. O peso seco máximo obtido foi idêntico nas duas culturas, no entanto, o rendimento de biomassa foi menor para a cultura com maior arejamento (0,333 vvm).



**Figura 2.46.** – Variação do peso fresco ao longo do perfil de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrpa*, crescidas em biorreactor mecanicamente agitado de 2 L, para diferentes  $K_{La}$ :  $6,98 \text{ h}^{-1}$  (100 rpm/0,250 vvm),  $12,40 \text{ h}^{-1}$  (60 rpm/0,333 vvm),  $19,85 \text{ h}^{-1}$  (100 rpm/0,417 vvm). Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.



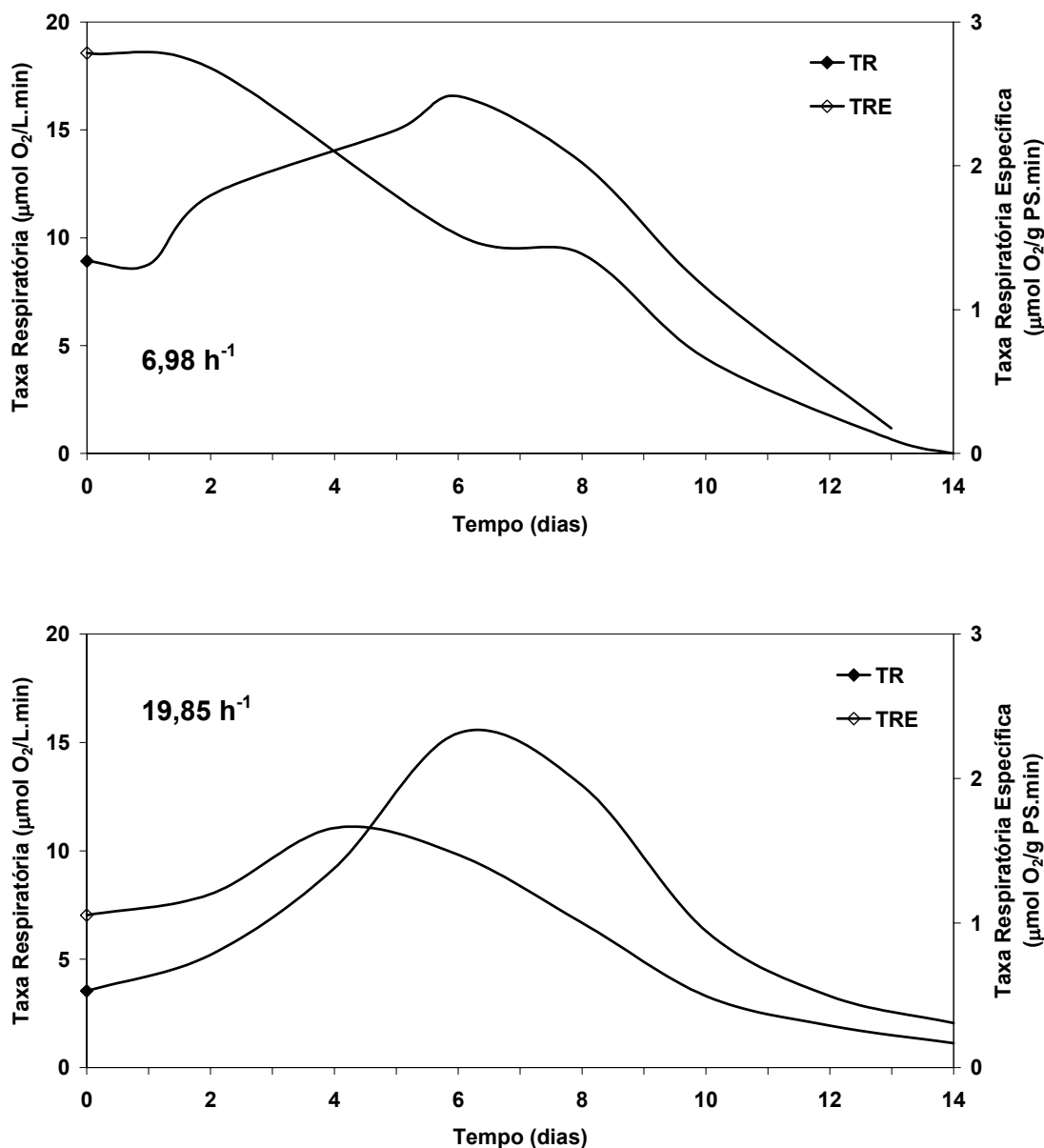
**Figura 2.47.** – Variação do peso seco ao longo do perfil de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrpa*, crescidas em biorreactor mecanicamente agitado de 2 L, para diferentes  $K_{La}$ :  $6,98 \text{ h}^{-1}$  (100 rpm/0,250 vvm),  $12,40 \text{ h}^{-1}$  (60 rpm/0,333 vvm),  $19,85 \text{ h}^{-1}$  (100 rpm/0,417 vvm). Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

Em relação às culturas que decorreram a 100 rpm e diferentes arejamentos (0,083, 0,250 e 0,417 vvm), com  $K_{La}$  de 3,87, 6,98 e 19,85  $h^{-1}$ , respectivamente, verifica-se que a taxa específica de crescimento é superior para a cultura com um arejamento de 0,250 vvm, comparativamente com as restantes a idêntica agitação. Contudo, a cultura com um arejamento de 0,417 vvm, é a que apresenta melhores valores de produtividade e rendimento de biomassa. Em termos de peso seco máximo, a cultura que decorreu a 0,417 vvm é a que apresentou o valor mais elevado (12,99 g/L) de biomassa. Estes resultados sugerem que um arejamento elevado, associado à agitação, proporciona uma maior transferência de massa de oxigénio no seio da cultura, promovendo o crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*.

A viabilidade celular das culturas mantém-se elevada ao longo de todo o ciclo de crescimento, variando entre 92 e 85 %. A cultura que decorreu a um  $K_{La}$  de 19,85  $h^{-1}$ , atinge o valor mínimo de viabilidade celular (77 %) na fase estacionária.

A figura 2.48. apresenta as taxas respiratórias (TR) e as taxas respiratórias específicas (TRE) das culturas crescidas com o  $K_{La}$  inicial de 6,98 e 19,85  $h^{-1}$ . Relativamente às TR, constatamos que os perfis de ambas as culturas são bastante semelhantes, a TR máxima é atingida ao 6º dia de cultura, diminuindo depois, até ao fim do ciclo de crescimento. No caso da cultura crescida a um  $K_{La}$  de 6,98  $h^{-1}$ , o 6º dia corresponde ao final da fase exponencial, enquanto que na cultura com um  $K_{La}$  de 19,85  $h^{-1}$ , a cultura encontra-se a meio da fase exponencial. Também, as células em cultura de *Catharanthus roseus* atingem a TR máxima na fase exponencial, com o valor de 41,7  $\mu\text{mol O}_2/\text{L}\cdot\text{min}$  (Snape *et al.*, 1989).

Embora os perfis das TR sejam idênticos, o mesmo não acontece com as TRE. A grande diferença nos perfis das TRE localiza-se no início da fermentação, durante a fase de latência das células. Enquanto que na cultura que decorreu a um  $K_{La}$  de 6,98  $h^{-1}$ , se observou o decréscimo da TRE desde o início do ciclo de crescimento, a cultura com um  $K_{La}$  de 19,85  $h^{-1}$ , apresenta um ligeiro aumento da TRE, até ao 4º dia de cultura, verificando-se depois a diminuição deste parâmetro ao longo do ciclo de crescimento. A partir do 6º dia de cultura, os valores das TRE são semelhantes em ambas as culturas. Esta diferença nas TRE poderá ser explicada pela diferente duração que as fases de latência têm em ambas as culturas. Enquanto que a cultura que decorreu a 6,98  $h^{-1}$ , tem uma fase de latência de 2 dias, a cultura que decorreu a 19,85  $h^{-1}$ , tem uma fase de latência de 4 dias. Igualmente, uma possível explicação para a diferença nas fases de latência poderá ser devido às células se encontrarem em estados fisiológicos diferentes, quando estas culturas foram iniciadas, e a adaptação destas às novas condições operacionais. Embora as células sejam inoculadas com uma cultura com o mesmo número de dias, o desenvolvimento destas nem sempre é igual, nem sempre se encontram em igual estado fisiológico.



**Figura 2.48.** – Taxas respiratórias e taxas respiratórias específicas das células em suspensão de *C. calcitrata*, cultivadas em biorreactor mecanicamente agitado de 2 L, para  $K_{La}$  de  $6,98 \text{ h}^{-1}$  e  $19,85 \text{ h}^{-1}$ .

Snape *et al.* (1989) com células em suspensão de *C. roseus*, obtiveram um perfil de TRE idêntico ao obtido neste trabalho, para as células em suspensão de *C. calcitrata*, cultivadas a um  $K_{La}$  de  $19,85 \text{ h}^{-1}$ . A TRE máxima foi de  $0,83 \mu\text{mol O}_2/\text{g PF}\cdot\text{min}$ , ocorrendo ao 4º dia de cultura, início da fase exponencial. Segundo estes autores o consumo de oxigênio é menor comparativamente com o crescimento celular. Também, Taticek *et al.* (1990) obtiveram para as células em suspensão de *Eschscholtzia californica*, cultivadas em Erlenmeyer e em reactor biológico agitado com ar pressurizado, um perfil de TRE bastante semelhante ao

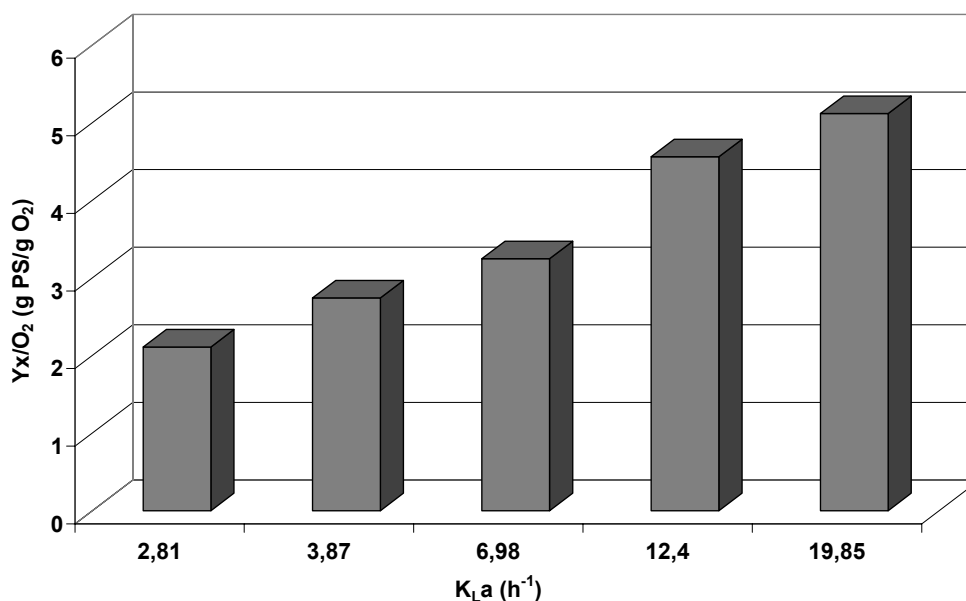
obtido para a *C. calcitrapa*, cultivada a  $19,85 \text{ h}^{-1}$ . A TRE das células em suspensão de *E. californica* aumenta de  $7,12 \text{ } \mu\text{mol/g PS.min}$  até  $9,33 \text{ } \mu\text{mol/g PS.min}$ , no fim da fase exponencial. Depois este valor decresce ao longo do ciclo de crescimento.

Os valores das TR e TRE, determinados para as células em suspensão de *C. calcitrapa*, encontram-se dentro da gama de valores de taxas respiratórias, determinados por outros autores, para diferentes células vegetais (Bond *et al.*, 1988; Hong *et al.*, 1989; Lima-Costa, 1994).

De modo a complementar as observações relativas às taxas respiratórias e de crescimento, determinaram-se os rendimentos de biomassa em função do oxigénio consumido, para condições distintas de transferência de oxigénio na cultura de células de *C. calcitrapa* (figura 2.49.). Constatou-se que o rendimento de biomassa em função do oxigénio consumido aumenta com o  $K_L a$ .

O valor mais elevado de  $Y_{x/O_2}$  ( $5,11 \text{ g PS/g O}_2$ ) foi obtido também na cultura que, apresenta produtividade de biomassa ( $1,86 \text{ g PS/ L.dia}$ ) mais elevada. Segundo Lima-Costa (1994) estes resultados sugerem que a fonte de carbono foi usada primordialmente no crescimento celular e, em menor proporção, nos mecanismos de manutenção.

Segundo Wilson (1987), a influência do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio sobre o aumento do rendimento de biomassa em função do oxigénio, revela uma relação estreita entre o consumo de oxigénio total e o aumento de biomassa. Com o aumento do oxigénio disponível no meio, as necessidades celulares de oxigénio também aumentam. Kato e Nagai (1979) com células em suspensão de *Nicotiana tabacum*, cultivadas em biorreactor com um  $K_L a$  de  $10 \text{ h}^{-1}$ , obtiveram um valor de  $1,91 \text{ g PS/g O}_2$  para o rendimento de biomassa em função do oxigénio consumido. Valor este bastante inferior ao obtido para as células em suspensão de *C. calcitrapa*, para um valor de  $K_L a$  semelhante.



**Figura 2.49.** – Influência do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigênio no rendimento de biomassa em função do oxigênio consumido, em células em suspensão de *C. calcitrapa* cultivadas em biorreactor mecanicamente agitado.

De uma maneira geral, é reconhecido que as condições de crescimento das células vegetais em biorreactor, decorrem do equilíbrio estabelecido entre um menor stresse hidrodinâmico e uma oxigenação adequada.

Os resultados deste ensaio confirmam os obtidos anteriormente, com baixos caudais de arejamento, em que as células em suspensão de *C. calcitrapa* são resistentes à agitação de 100 rpm. A agitação conciliada com o arejamento promove a transferência de massa numa cultura. Este é um parâmetro extremamente importante, do qual o desenvolvimento da cultura se encontra dependente, por facilitar a acessibilidade dos nutrientes às células. A agitação de 100 rpm, associada a elevados caudais de arejamento (0,250 e 0,417 vvm), conduz a uma transferência de massa eficaz para o bom desenvolvimento da cultura, proporcionando bons níveis de crescimento celular.

### 2.3.2.5. Parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico

Foram determinados cinco parâmetros para quantificação do stresse hidrodinâmico gerado pelo agitador nas culturas de células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado (tabela 2.12.). Os parâmetros utilizados foram a potência volumétrica ( $P/V$ ) transmitida pelo agitador, a energia dissipada média ( $\bar{\varepsilon}$ ), a

velocidade da ponta do agitador ( $v_i$ ), a velocidade de corte média ( $\gamma_{MÉDIA}$ ) e a velocidade de corte máxima. Para o cálculo da potência volumétrica transmitida pelo agitador foi utilizada a equação aplicada a sistemas não arejados (equação 2.16.). Em sistemas mecanicamente agitados com arejamento, a potência é menor do que a calculada. No entanto, o objectivo deste estudo é comparativo entre os diferentes ensaios realizados, sendo importante apenas a ordem de magnitude da potência volumétrica calculada. Assim, o erro cometido pode ser negligenciado, não colocando em risco as possíveis conclusões retiradas deste estudo. A velocidade de corte máxima foi calculada com base na equação 2.15., através do cálculo da velocidade da ponta do agitador ( $v_i$ ), segundo Midler e Finn (1966).

Em todas as culturas decorridas a diferentes  $K_La$  verifica-se o aumento da potência volumétrica transmitida pelo agitador e da energia dissipada média, entre o início e o final do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calctrapa*. No início, a concentração de biomassa é baixa, assim como a viscosidade da cultura. No entanto, com o decorrer da cultura a viscosidade aumenta, reduzindo a turbulência da mistura e consequentemente o número de Reynolds, o que faz com que a  $(P/V)$  e a  $\bar{\varepsilon}$  aumentem igualmente. Por outro lado, a tensão de corte resultante aumenta com o aumento da viscosidade da cultura.

Analisando ainda a tabela 2.12., pode-se observar que a cultura que decorreu a um  $K_La$  de  $18,60 \text{ h}^{-1}$  destaca-se dos restantes ensaios. A potência volumétrica dissipada pelo agitador, a energia dissipada média, assim como a velocidade de corte média e a velocidade da ponta do agitador apresentam valores bastante superiores aos das outras culturas, que decorreram a diferentes  $K_La$ . Este aspecto pode atribuir-se ao efeito da agitação, tendo esta cultura decorrido a 250 rpm. A cultura que decorreu a um  $K_La$  semelhante ( $19,85 \text{ h}^{-1}$ ), mas a uma agitação de 100 rpm, apresenta valores bastante inferiores dos parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico. Estes resultados são indicativos de que a agitação tem um papel preponderante em provocar stresse hidrodinâmico nas suspensões de células de *C. calctrapa*, encontrando-se a cultura que decorreu a 250 rpm, exposta a um maior stresse hidrodinâmico. Tal como verificado anteriormente, nos ensaios de viabilidade celular, na avaliação dos parâmetros cinéticos e análise do perfil de crescimento, taxa respiratória e actividade enzimática.

As culturas que decorreram a diferentes  $K_La$ , 3,87, 6,98 e  $19,85 \text{ h}^{-1}$ , apresentam valores bastantes semelhantes de  $P/V$  e  $\bar{\varepsilon}$  e, iguais valores de  $\gamma_{MÉDIA}$  e  $v_i$ . Estas culturas decorreram a igual agitação (100 rpm) e diferentes condições de arejamento. Estes dados comprovam que a agitação é o parâmetro que condiciona fortemente o stresse hidrodinâmico nas suspensões celulares.

**Tabela 2.12.** – Parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico determinados para diferentes  $K_{LA}$  na cultura de células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

$K_{LA}$ ( $h^{-1}$ )		P/V ( $W/m^3$ )	$\bar{\varepsilon}$ ( $W/Kg$ )	$\gamma_{MÉDIA}$ ( $s^{-1}$ )	$v_i$ ( $m/s$ )
2,56	Início	0,039	$3,76 \times 10^{-5}$	5,00	0,094
	Fim	0,073	$7,13 \times 10^{-5}$		
2,81	Início	0,319	$3,11 \times 10^{-4}$	10,00	0,189
	Fim	0,639	$6,22 \times 10^{-4}$		
3,87	Início	1,201	$1,15 \times 10^{-3}$	16,67	0,314
	Fim	1,968	$1,92 \times 10^{-3}$		
6,98	Início	1,758	$1,73 \times 10^{-3}$	16,67	0,314
	Fim	1,770	$1,74 \times 10^{-3}$		
12,40	Início	0,317	$3,11 \times 10^{-4}$	10,00	0,189
	Fim	0,365	$3,63 \times 10^{-4}$		
18,60	Início	13,180	$13,13 \times 10^{-3}$	41,67	0,785
	Fim	22,768	$22,50 \times 10^{-3}$		
19,85	Início	1,405	$1,39 \times 10^{-3}$	16,67	0,314
	Fim	3,634	$3,60 \times 10^{-3}$		

Os valores dos parâmetros para quantificar stresse hidrodinâmico, obtidos neste trabalho, encontram-se dentro da gama de valores referida na bibliografia. Pan *et al.* (2000) com células em suspensão de *Taxus chinensis* cultivadas num biorreactor tipo *airlift* obtiveram um valor de velocidade de corte média ( $7,05 s^{-1}$ ) bastante inferior ao obtido em reactor biológico mecanicamente agitado ( $55 s^{-1}$ ). No entanto, os valores da velocidade de corte média apresentados para as culturas em suspensão de *C. roseus*, crescidas em biorreactor mecanicamente agitado a diferentes agitações, são substancialmente mais elevados (Leckie *et al.*, 1991a). Igualmente Scragg *et al.* (1988) com diferentes suspensões celulares, crescidas em reactor biológico mecanicamente agitado, obtiveram valores de velocidade de corte média e máxima superiores aos determinados neste trabalho. As células de *C. roseus* cultivadas num biorreactor de 3 L a uma agitação de 1000 rpm e com uma velocidade de corte de  $167 s^{-1}$ , apresentam um decréscimo no peso fresco e no peso seco, devido à perda

de água ou de matéria orgânica. No entanto, o crescimento destas células, após terem sido sujeitas a condições de stresse, não apresentou qualquer alteração na sua taxa específica de crescimento. Resultados semelhantes foram obtidos para células de *Helianthus annuus* (Scragg *et al.*, 1988). As células de *Picrasma quassiodes*, não apresentam crescimento em biorreactor mecanicamente agitado, nas mesmas condições das culturas anteriores, crescendo no entanto, em reactor tipo *airlift* (Scragg *et al.*, 1988). Estas observações mostram que a sensibilidade ao stresse das suspensões celulares dependem da célula em causa. Zhong *et al.* (1994) verificaram que o crescimento das células de *Perilla frutescens* em biorreactor agitado, era condicionado pelos valores da velocidade de corte média e pela velocidade de ponta do agitador. Assim, a taxa específica de crescimento sofreu uma redução quando a velocidade de corte média foi superior a  $30 \text{ s}^{-1}$  e a velocidade da ponta do agitador foi superior a  $0,8 \text{ m/s}$ . Também verificaram que a concentração de biomassa era relativamente elevada para valores da velocidade de corte média situados entre  $20$  e  $30 \text{ s}^{-1}$  e velocidades de ponta do agitador entre  $0,5$  e  $0,8 \text{ m/s}$ . A biomassa era reduzida a elevados valores de velocidade de corte, acima de  $30 \text{ s}^{-1}$  ou a velocidades da ponta do agitador acima de  $0,8 \text{ m/s}$ .

Os resultados obtidos nos ensaios realizados e a análise dos parâmetros, que permitem quantificar o stresse hidrodinâmico (tabela 2.12.), são indicativos de que a agitação é a principal componente a provocar stresse hidrodinâmico na suspensão celular, condicionando o desenvolvimento da cultura, como já foi referido. As culturas de células em suspensões de *C. calcitrapa*, que decorrem à agitação de  $250 \text{ rpm}$ , sofrem danos celulares, provocados pela exposição a condições de stresse.

## 2.4. CONCLUSÕES

Neste capítulo realizaram-se estudos hidrodinâmicos de longa duração, onde se procedeu à caracterização reológica, cinética e morfológica de uma cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*, cultivadas em Erlenmeyer e em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado.

Dos estudos realizados em Erlenmeyer podem-se tirar as seguintes conclusões:

1. A concentração óptima de fonte de carbono (glucose) para o crescimento celular, nas condições estudadas, é de 30 g/L de glucose.
2. A cinética de utilização do substrato pelas células em suspensão de *C. calcitrapa* é satisfatoriamente descrita pelo modelo não estruturado de Monod, sendo o  $K_m$  11,8 g/L e o  $\mu_{m\acute{a}x}$  0,38 dia<sup>-1</sup>, valores concordantes com os referidos na literatura.
3. As células crescidas em Erlenmeyer apresentam um comportamento pseudoplástico ao longo de todo o ciclo de crescimento, em que o índice de comportamento do fluido varia entre 0,4 e 0,2 e o índice de consistência entre 0,082 e 0,611 Ns<sup>n</sup>m<sup>-2</sup>.
4. A análise morfológica da suspensão celular foi efectuada recorrendo à análise digital de imagem e ao FBRM. Através da análise digital de imagem verificou-se que, o tamanho dos agregados celulares varia entre 50 e 3000  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O diâmetro equivalente médio do agregado diminui ao longo do ciclo de crescimento, variando entre 246,27 e 190,87  $\mu\text{m}$ , para as culturas crescidas em Erlenmeyers de 1 L. Dos estudos em FBRM, constatou-se que o número de contagens médias de agregados celulares aumenta com a biomassa, enquanto que a contagem ponderada reflecte a dimensão do agregado celular. Estabeleceram-se correlações entre a biomassa (PF e PS) e a contagem total e a contagem total real. Entre o diâmetro equivalente médio e o comprimento de corda médio estabeleceu-se uma correlação linear. As correlações apresentadas são específicas da espécie.
5. A distribuição log-normal caracteriza a distribuição dos agregados na suspensão celular de *C. calcitrapa*.
6. A aplicação da técnica óptica – FBRM - às culturas de células vegetais é muito recente, podendo ser uma alternativa à análise digital de imagem, por permitir a obtenção rápida de resultados e possibilitar medições *in-situ*.

A cultura das células em suspensão de *C. calcitrapa* foi estabelecida em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado com um agitador de pás inclinadas e a operar em sistema descontínuo. Deste estudo resultaram as seguintes conclusões:

1. A agitação tem um papel preponderante na sensibilidade das células, sendo a condicionante principal para o desenvolvimento das culturas de *C. calcitrapa*.
2. As células cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado com um sistema de pás inclinadas, apresentaram sensibilidade ao stresse hidrodinâmico para a agitação de 250 rpm. Este pressuposto foi confirmado pela perda da viabilidade celular (cerca de 70 % relativamente à viabilidade inicial) e aumento da concentração de compostos fenólicos no meio nutriente. Igualmente, os valores de energia dissipada média e da potência volumétrica foram elevados, para a suspensão cultivada a 250 rpm em reactor biológico mecanicamente agitado com as pás inclinadas.
3. No estudo do efeito da agitação, a cultura que apresentou melhor crescimento e produção com enzimas com actividade proteolítica foi a que decorreu a 60 rpm. A concentração de compostos fenólicos foi baixa, não havendo praticamente perda da viabilidade celular, ao longo de todo o ciclo de crescimento. A energia dissipada média e a potência volumétrica, determinadas para a suspensão cultivada a 60 rpm em reactor biológico mecanicamente agitado com as pás inclinadas, apresentaram valores baixos, comparativamente com as restantes velocidades de agitação ensaiadas.
4. Ao longo de todo o ciclo, a cultura apresenta um comportamento pseudoplástico, tal como em Erlenmeyer, em que o índice de comportamento do fluido variou entre 0,65 e 0,1 e o índice de consistência entre 0,07 e 1,81  $\text{Ns}^n\text{m}^{-2}$ .
5. A agitação influencia fortemente o valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio. Valores elevados de agitação poderão originar valores elevados de  $K_La$  ( $18,60 \text{ h}^{-1}$ ). Contudo, o crescimento celular poderá ser comprometido pela sensibilidade que as células apresentam à agitação. O aumento do arejamento proporciona igualmente, valores elevados de  $K_La$  ( $19,85 \text{ h}^{-1}$ ) não perigando o desenvolvimento da cultura.

Com base nos ensaios realizados de longa duração, em reactor biológico mecanicamente agitado com pás inclinadas, pode-se afirmar que as células em suspensão de *C. calcitrapa* são sensíveis às forças de tensão, provocadas pela agitação a 250 rpm. Um possível causa, para a sensibilidade que esta linha celular apresenta a condições de stresse poderá ser

atribuída a questões morfológicas e à geometria do agitador. As células formam agregados de elevadas dimensões, que com o aumento das forças de tensão, podem ser quebrados, formando agregados de menores dimensões. No entanto, esta hipótese carece de confirmação através de uma análise morfológica da cultura, cultivada em biorreactor mecanicamente agitado, a diferentes condições operacionais (agitação/arejamento).

## 2.5. REFERÊNCIAS

- Akalezi, C., S. Liu, Q. Li, J. Yu & J. Zhong (1999) Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. *Proc. Biochem.* **34**: 639-642.
- Anselmo, A. M., M. Mateus, J. M. Cabral & J. M. Novais (1985) Degradation of phenol by immobilized cells of *Fusarium flociferum*. *Biotechnol. Lett.* **7**: 889 – 894.
- Ausubel, I. & M. Frederick (1989) Current protocols in molecular biology. V.II: (cap.10), Molecular biology - Laboratory Manuals. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Bailey, J. E. & D. F. Ollis (1991) *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Ballica, R. & D. D. Ryu (1993) Effects of rheological properties and mass transfer on plant cell bioreactor performance: production of tropane alkaloids. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 1181 – 1189.
- Bernfeld, P. (1955) *Methods Enzymol.* **1**: 149-150.
- Blanco, A., E. De la Fuente, C. Negro, M. C. Monte & J. Tijero (2002) Focused beam reflectant measurement as a tool to measure flocculation. *Tappi Journal.* **1**: 14-20.
- Bond, P. A., M. W. Fowler & A. H. Scragg (1988) Growth of *Catharanthus roseus* cell suspensions in bioreactors: on-line analysis of oxygen and carbon dioxide levels in inlet and outlet gas streams. *Biotechnol. Lett.* **10**: 713 – 718.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248 - 254.
- Calderbank, P. H. & M. B. Moo-Young (1959). The prediction of power consumption in the agitation of non-newtonian fluids. *Trans. Instn. Chem. Engrs.* **37**: 26 - 33.
- Chen, S. Y. & S. Y. Huang (2000) Shear stress effects on cell growth and L-DOPA production by suspension culture of *Stizolobium hassjoo* cells in an agitated bioreactor. *Bioproc. Eng.* **22**: 5-12.
- Chiou, S. Y., W. W. Su & Y. C. Su (2001) Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. *J. Biotechnol.* **85**: 247-257.
- Curtis, W. R. & A. H. Emery (1993) Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 520 – 525.
- Domingos, A. (1997) An aspartic proteinase from flowers of *Centaurea calcitrapa*: purification, molecular cloning and modelling of its three-dimensional structure. Ph. D. Thesis. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Doran, P. (1998) "Fluid Flow and Mixing" in *Bioprocess Engineering Principles*, 129-163, Academic Press. London.
- Doran, P. (1999) Design of Mixing Systems for Plant Cell Suspensions in Stirred Reactors. *Biotechnol. Prog.* **15**: 319-335.
- Doran, P.M. (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin Biotechnol.* **11**, 199–204.
- Dowding, P. J., J. W. Goodwin & B. Vincent (2001) Factors governing emulsion droplet and solid particle size measurements performed using the focused beam reflectance technique. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **192**: 5-13.
- Drapeau, D., H. W. Blanch & C. R. Wike (1986). Growth kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 1555 - 1563.

- Ducos, J. P. & A. Pareilleux (1986) Effect of aeration rate and influence of pCO<sub>2</sub> in large-scale cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 101 – 105.
- Ducos, J. P., G. Feron & A. Pareilleux (1988) Growth and activities of enzymes of primary metabolism in batch cultures of *Catharanthus roseus* cell suspension under different pCO<sub>2</sub> conditions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **13**: 167-177.
- Fevereiro, M. P. (1991) Produção de proteases e metabolitos secundários em culturas de células em suspensão de *Silybum marianum* Gaertn. Ph. D. Thesis. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Fischer, R., N. Emans, F. Schuster, S. Hellwig & J. Drossard (1999) Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**: 109-112.
- Gagnom, H., J. Thibault, F. Cormier & C. B. Do (1999) *Vitis vinifera* in a non-conventional bioreactor: the reciprocating plate bioreactor. *Bioproc. Eng.* **21**: 405 – 413.
- Galindez-Mayer, J., O. Sanchez-Teja, E. Cristiani-Urbina & N. Ruiz-Ordaz (2001) A novel split-cylinder airlift reactor for fed-batch cultures - Effect of the liquid height on the hydrodynamic characteristics and the volumetric oxygen transfer coefficient of the reactor. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **24**: 171-177.
- Giri, A., V. Dhingra, C. Giri, W. Singh, O & M. Narasu (2001) Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol. Adv.* **19**: 175-199.
- Ho, C.-H., K. Henderson & G. Rorrer (1995) Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **11**: 140-145.
- Hong, Y., T. Labuza & S. Harlander (1989) Growth kinetics of strawberry cell suspension cultures in shake flask, airlift, stirred-jar, and roller bottle bioreactors. *Biotechnol. Prog.* **5**: 137-143.
- Hooker, B. S., J. M. Lee & G. An (1989) Response of plant tissue culture to a high shear environment. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 484-490.
- Hooker, B. S., J. M. Lee & G. An (1990) Cultivation of plant cells in a stirred vessel: effect of impeller design. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 296 – 309.
- Houghton, P. J. (1995) The future of phytopharmaceuticals-plant-derived medicines face the new millennium. *Agr-Food-Industry Hi-Tech.* **July / August**: 12 - 16.
- Hulst, A., M. Meyer, H. Breteler & J. Tramper (1989) Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 18-25.
- Ibaraki, Y. & K. Kenji (2001) Application of image analysis to plant cell suspension cultures. *Comp. Electr. Agr.* **30**: 193-203.
- Jianfeng, X., X. Jian, F. Pusun & S. Zhiguo (1998) Suspension nodule culture of the chinese herb, *Rhodiola sachalinensis*, in an airlift reactor: kinetics and technical characteristics. *Biotechnol Tech.* **12**: 1 – 5.
- Jolicoeur, M., C. Chavarie, P. J. Carreau & J. Archambault (1992) Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 511 - 521.
- Joshi, J., C. Elias & M. Patole (1996) Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Chem. Eng. J.* **62**: 121-141.
- Kato, A., S. Kawazoe & Y. Soh (1978) Viscosity of the broth of tobacco cells in suspension culture. *J. Ferment. Technol.* **56**: 224 – 228.

- Kato, A. & S. Nagai (1979). Energetics of tobacco cells, *Nicotiana tabacum* L., growing on sucrose medium. *Appl. Microb. Biotechnol.* **7**: 219 - 223.
- Kato, A. & K. Tsuji (1981) Growth-substrate relationship of tobacco cells in suspension culture. *J Ferment. Technol.* **59**: 33 – 36.
- Keßler, M., H. J. ten Hoopen, J. J. Heijnen & S. Furusaki (1997) O<sub>2</sub> uptake rate measurements as a novel tool to study shear effects on suspended strawberry cells. *Biotechnol Tech.* **11**: 507 – 510.
- Keßler, M. & S. Furusaki (1997). Unsuitability of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride(TTC) as a viability assay for plant cells in suspension. *J. Chem. Eng. Jpn.* **30**(4): 718 - 723.
- Keßler, M., J. G. ten Hoopen & S. Furusaki (1999) The effect of the aggregate size on the production of ajmalicine and tryptamine in *Catharanthus roseus* suspension culture. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 308 – 315.
- Kieran, P. (1993) An investigation of the hydrodynamic shear susceptibility of the suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Ph. D. Thesis. Department of Chemical Engineering. Faculty of Engineering and Architecture. University College Dublin.
- Kieran, P. M., D. M. Malone & MacLoughlin (1993) Variation of aggregate size in plant cell suspension batch and semi-continuous cultures. *Trans IChemE.* **71**: 40 – 46.
- Kieran, P. M., H. J. O'Donnell, D. M. Malone & P. F. MacLoughlin (1995) Fluid Shear effects on suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Biotechnol. Bioeng.* **45**: 415 – 425.
- Kieran, P., P. MacLoughlin & D. Malone (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J. Biotechnol.* **59**: 39 – 52.
- Kieran, P., D. Malone & P. MacLoughlin (2000) Effects of Hydrodynamic and Interfacial Forces on Plant Cell Suspension Systems. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **67**: 139-177.
- Kim, S.-I., H. K. Choi, J. H. Kim, H. S. Lee & S. S. Hong (2001) Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Enzyme Microb. Technol.* **28**: 202 – 209.
- King, P. J. (1977) Studies on the growth in culture of plant cells. XXII: Growth limitation by nitrate and glucose in chemostat cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *J. Exp. Bot.* **28**: 142 – 155.
- Kraume, M. (1992) Mixing times in stirred suspensions. *Chem. Eng. Technol.* **15**: 313 – 318.
- Kresta, S. (1998) Turbulence in stirred tanks: anisotropic, approximate, and applied. *Can. J. Chem. Eng.* **76**: 563-576.
- Kurata, H., T. Takemura, S. Furusaki & Cl. Kado (1998) Light-controlled expression of a foreign gene using the chalcone synthase promoter in tobacco BY-2 cells. *J. Ferment. Bioeng.* **86**: 317 – 323.
- Larkin, P. (1976) Purification and viability determination of plant protoplasts. *Planta.* **128**: 213 – 216.
- Leckie, F., A. H. Scragg & K. L. Cliffe (1991a) Effect of bioreactor design and agitator speed on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 296 – 305.
- Leckie, F., A. H. Scragg & K. L. Cliffe (1991b) An investigation into the role of initial K<sub>L</sub>a on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 364 – 370.
- Lima-Costa, M. E. (1994) Cinética do crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* em reactores biológicos. Ph. D. Thesis. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

- Lima-Costa, M. E., W. M. Gulik, H. J. ten Hoopen, M. S. Pais & J. M. Cabral (1996) Protease and phenol production of *Cynara cardunculus* L. cell suspension in a chemostat. *Enzyme Microb. Technol.* **19**: 493 – 500.
- Lima-Costa, M. E., S. Raposo, A. Clemente, M. S. Pais & J. Cabral (1997) Mass transfer studies on *Cynara cardunculus* L. & *Centaurea calcitrapa* suspension cultures. The influence of oxygen vectors. *Bioreactor/Process Fluid Dynamics* **27** – 43.
- Liu, F. & J.M. Lee (1999) Effect of culture conditions on monoclonal antibody production from genetically modified tobacco suspension cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **4**: 259 – 263.
- Magnuson, N.S., P.M. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. HayGlass & J.M. Lee (1998) Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expr. Purif.* **13**: 45 – 52.
- Mavituna, F. & J. M. Park (1987) Size distribution of plant cell aggregates in batch culture. *Chem. Eng. J.* **35**: B9 - B14.
- McDonald, K. A., A. P. Jackman & S. Hurst (2001) Characterization of plant suspension cultures using the focused beam reflectance technique. *Biotechnol. Lett.* **23**: 317-324.
- Meijer, J. J., H. J. ten Hoopen, K. C. Luyben & K. R. Libbenga (1993) Effects of hydrodynamics stress on cultured plant cells: a literature survey. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 234 – 238.
- Meijer, J. J., H. J. ten Hoopen, Y. M. van Gameren, K. C. Luyben & K. R. Libbenga (1994) Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 467 – 477.
- Menisher, T., M. Metghalchi & E. B. Gutoff (2000). Mixing studies in bioreactors. *Bioproc. Eng.* **22**: 115-120.
- Metzner, A. B., R. H. Feehs, H. L. Ramos, R. E. Otto & J. D. Tuthill (1961) Agitation of viscous newtonian and non-newtonian fluids. *AIChE J.* **7**: 3 - 9.
- Midler, M. & R. K. Finn (1966) A model system for evaluating shear in the design of stirred fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **8**: 71 – 84.
- Miguel, G. (1989) *Centaurea calcitrapa*: Obtenção de “calli” e extracção de proteases com actividade coagulante do leite. *Dissertação de Mestrado em Secreção Vegetal e Recursos Naturais Renováveis*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Miller Jr, J. A. & V. Nagarajan (2000) The impact of biotechnology on the chemical industry in the 21st century. *TIBTECH.* **18**: 190-191.
- Miyanaaga, K., M. Seki & S. Furusaki (2000) Quantitative determination of cultured strawberry-cell heterogeneity by image analysis: effects of medium modification on anthocyanin accumulation. *Biochem. Eng. J.* **5**: 201-207.
- Monod, J. (1942) *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Herman et Cie eds. Paris.
- Nielsen, J. (2001) “Microbial Process Kinetics” in *Basic Biotechnology*, 127-149, 2<sup>nd</sup> ed, Cambridge University Press.
- Pan, Z.-W. & H.-Q. Wang, Zhong, J-J (2000) Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. *Enzyme Microb. Technol.* **27**: 714-723.
- Payne, G. F., N. N. Payne & M. L. Shuler (1987) Bioreactor considerations for secondary metabolite production from plant cell tissue culture: indole alkaloids from *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 905 – 912.

- Pirt, J. S. (1975) "Energy and carbon source requirement" in: *The principles of Microbe and Cell Cultivation*, 63 – 80, Blackwell Scient. Publications. London, UK.
- Prokop, A. & R. Bajpai (1992) The sensitivity of biocatalysts to hydrodynamic shear stress. *Ad. Appl. Microb.* **37**: 165-232.
- Quer, P. (1981) Plantas Medicinales. El Dioscorides Renovado Editorial Labor, S. A.
- Raposo, S. (1993) Proteases com actividade coagulante do leite obtidas a partir de culturas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*- Extracção, purificação e caracterização. *Tese de Licenciatura*. Universidade do Minho.
- Raposo, S. (1997) Proteinases aspárticas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*: produção, purificação e caracterização. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Richmond, W. R., R. L. Jones & P. D. Fawell (1998) The Relationship between particle aggregation and rheology in mixed silica-titania suspensions. *Chem. Eng. J.* **71**: 67 – 75.
- Roberts, S. C. & M. Shuler (1997) Large-scale plant cell culture. *Curr. Op. Biotechnol.* **8**: 154 – 159.
- Rodrigues, V. (2002) Optimização da extracção de proteases de uma cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*. Efeito da fonte de carbono. *Tese de Licenciatura*. Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais. Universidade do Algarve.
- Rodríguez-Monroy, M. & E. Galindo (1999) Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 687 – 693.
- Rocha-Valadez, J. A., E. Galindo & L. Serrano-Carreón (2000) Effect of the impeller-sparger configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. *Bioproc. Eng.* **23**: 403-410.
- Rushton, J. H., E. W. Costich & H. J. Everett (1950). Power characteristics of mixing impellers - Part II. *Chem. Eng. Prog.* **46**(9): 469 - 476.
- Sahai O. P. & M. L. Shuler (1984) Multistage continuous culture to examine secondary metabolite formation in plant cells: phenolics from *Nicotiana tabacum*. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 27 – 36.
- Sajc, L., D. Grubisic & G. Vunjak-Novakovic (2000) Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochem. Eng. J.* **4**: 89-99.
- Sánchez, M., A. Jimenez-Aparicio, G. Lopez, G. Tapia & M. Rodriguez-Monroy (2002) Broth rheology of *Beta vulgaris* cultures growing in an air lift bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **12**: 37 – 41.
- Sato, K., M. Nakayama & J. Shigeta (1996) Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Science.* **113**: 91-98.
- Scragg, A. H., P. Morris, E. J. Allan, P. Bond & M. W. Fowler (1987) Effect of scale-up on serpentine formation by *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 619 - 624.
- Scragg, A. H., E. J. Allan & F. Leckie (1988) Effect of shear on the viability of plant cell suspensions. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 361 – 367.
- Scragg, A.H. (1992) "Bioreactors for the mass cultivation of plant cells" in *Plant Biotechnology*, 45-98, Fowler, M., 2<sup>nd</sup> ed, Pergamon Press.
- Schenk, R. & A. Hildebrandt (1972) Medium techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* **22**: 55-64.

- Sehnke, P.C. & R.J. Ferl (1999) Processing of preproricin in transgenic tobacco. *Protein Expr. Purif.* **15**: 188 – 195.
- Snape, J., N. Thomas & J. Callow (1989) How suspension cultures of *Catharanthus roseus* respond to oxygen limitation: small-scale tests with applications to large-scale cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 1058-1062.
- Sharp, J.M. and P.M. Doran (1999) Effect of bacitracin on growth and monoclonal antibody production by tobacco hairy roots and cell suspensions. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **4**, 253–258.
- Sharp, J.M. and P.M. Doran (2001) Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 338–346.
- Sun, X. & J. C. Linden (1999) Shear stress effects on plant cell suspension cultures in a rotating wall vessel bioreactor. *J. Ind. Microb. Biotechnol.* **22**: 44 – 47.
- Tanaka, H. (1982) Oxygen transfer in broths of plant cells at high density. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 425 – 442.
- Tanaka, H. (1987) Large-scale cultivation of plant cells at high density: a review. *Proc. Biochem.* **22**: 106-113.
- Tanaka, H., H. Semba, T. Jitsufuchi & H. Harada (1988) The effect of physical stress on plant cells in suspension cultures. *Biotechnol. Lett.* **10**: 485 – 490.
- Takeda, T., M. Seki & S. Furusaki (1994) Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus tinctorius* in a stirred tank reactor. *J. Chem. Eng. Jpn.* **27**: 466 – 471.
- Takeda, T., T. Kitagawa, Y. Takeuchi, M. Seki & Furusaki (1998) Metabolic responses of plant cell culture to hydrodynamic stress. *Can. J. Chem. Eng.* **76**: 267 – 275.
- Taticek, R. A., M. Moo-Young & R. Legge (1990) Effect of bioreactor configuration on substrate uptake by cell suspension cultures of the plant *Eschscholtzia californica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 280 – 286.
- Taticek, R., M. Moo-Young & R. Legge (1991) The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* **24**: 139-158.
- Taussky, H. H. & E. Shorr (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* **202**: 675 - 685.
- Terashima, M., Y. Murai, M. Kawamura, S. Nakanishi, T. Stoltz, L. Chen, W. Drohan, R.L. Rodriguez & S. Kato (1999a) Production of functional human  $\alpha_1$ -antitrypsin by plant cell culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 516 – 523.
- Terashima, M., Y. Ejiri, N. Hashikawa & H. Yoshida (1999b) Effect of osmotic pressure on human  $\alpha_1$ -antitrypsin production by plant cell culture. *Biochem. Eng. J.* **4**: 31 – 36.
- Trejo-Tapia, G., A. Jiménez-Aparicio, L. Villarreal & M. Rodríguez-Monroy (2001) Broth rheology and morphological analysis of *Solanum chrysotrichum* cultivated in a stirred tank. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1943-1946.
- Tsoi, B. & P. Doran (2002) Effect of medium properties and additives on antibody stability and accumulation in suspended plant cell cultures. *Biotechnol Appl Biochem.* **35**: 171 – 180.
- Twining, S. S. (1984). Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* **143**: 30 - 34.
- van Gulik, W., H. ten Hoopen & J. Heijnen (2001) The application of continuous culture for plant cell suspensions. *Enzyme Microbial Technol.* **28**: 796-805.

- Verdelhan dês Molles D., V. Gomord, M. Bastin, L. Faye & D. Courtois (1999) Expression of a carrot invertase gene in tobacco suspension cells cultivated in batch and continuous culture conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 302 – 306.
- Wang, S.-J. & J.-J. Zhong (1997) Comparison of O<sub>2</sub> transfer characteristics between a new centrifugal impeller and flat-bladed turbine impeller. *Biotechnol Tech.* **11**: 763 – 767.
- Wilson, G. (1987) On-line stimulation of biomass using dynamic oxygen balancing. *Biotechnol. Techniq.* **1**: 151 – 156.
- Wongsamuth, R. & P. Doran (1997a) The filtration properties of *Atropa belladonna* plant cell suspension; Effects of hydrodynamic shear and elevated carbon dioxide levels on culture and filtration parameters. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**: 15 – 26.
- Wongsamuth, R. & P. Doran (1997b) Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 401–415.
- Zhang, Y.-H., H.-Q. Wang, S. Liu, J.-T. Yu & J.-J. Zhong (1997) Regulation of apparent viscosity and O<sub>2</sub> transfer coefficient by osmotic pressure in cell suspensions of *Panax notoginseng*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 943 – 945.
- Zhao, J., W.-H. Zhu & Q. Hu (2000) Enhanced ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment: from shake-flask to 20-l airlift bioreactor. *Biotechnol. Lett.* **22**: 509-514.
- Zhong, J.-J., T. Seki, S.-I. Kinoshita & T. Yoshida (1992) Rheological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1256 – 1262.
- Zhong, J.-J., K. Fujiyama, T. Seki & T. Yoshida (1994) A Quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens* in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 649-654.
- Zhong, J.-J., J.-T. Yu & T. Yoshida (1995) Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. *World J. Microb. Biotechnol.* **11**: 461 - 467.
- Zhong, J.-J., & T. Yoshida (1995) High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme Microbial Technol.* **17**: 1073-1079.

## **CAPÍTULO 3**

**Efeito do stresse hidrodinâmico na cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* quando aplicadas no Fluxo Turbulento Submerso**

**RESUMO**

O stresse hidrodinâmico foi avaliado nas células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*, quando estas são sujeitas a forças de tensão intensas e bem definidas, como é o Jacto Turbulento Submerso. As células são sujeitas a condições de stresse de curta duração e de elevada intensidade por intermédio deste equipamento. Após a passagem pelo sistema de fluxo turbulento, observou-se degradação celular, com redução da biomassa. Verificou-se uma redução da viabilidade celular com o aumento do tempo de exposição às condições de stresse. Esta redução é bem descrita por um modelo de cinética de morte celular de primeira ordem.

Em termos da cultura, os agregados celulares de maiores dimensões são os preferencialmente quebrados, por acção das forças de tensão, e com o aumento do tempo de exposição. O diâmetro equivalente máximo,  $D_{99}$ , foi usado como indicador dos danos celulares. Este parâmetro diminui com o aumento das forças de tensão e com o aumento do tempo de exposição.

A energia dissipada média apresentou-se como sendo um bom indicador para quantificar os danos nas suspensões celulares.

**ABSTRACT**

Hydrodynamic stress was assessed in *Centaurea calcitrapa* cell suspensions when these are subjected to intense and well-defined shear forces, such as those existing in the Submerged Turbulent Jet apparatus. By using this equipment, the cells are subjected to short-term high intensity stress conditions. Cell degradation and biomass reduction were observed in the suspensions after passage through the turbulent flow system. A reduction in cell viability was observed with increased time of exposure to these stress conditions. This reduction is well described by a first order cell death kinetic model.

Concerning the cell culture, the larger cell aggregates are those that are preferentially broken by the action of shear forces, and with increased exposure time. Maximum equivalent diameter,  $D_{99}$ , was used as an indicator of cell damage. This parameter decreases with increased shear forces or increased exposure time.

Average energy dissipation was shown to be a good indicator to quantify cell damage.

### 3.1. INTRODUÇÃO

As suspensões de células quando sujeitas a determinadas forças hidrodinâmicas podem responder de diferentes maneiras. Em alguns casos, quando impostas determinadas condições de tensão pode dar-se um aumento do rendimento e mesmo da produtividade da biomassa, ou seja, os efeitos de tensão tanto podem ser prejudiciais como benéficos para a cultura.

No entanto, em geral, as células quando expostas a condições hidrodinâmicas intensas apresentam perda de viabilidade e uma redução na produtividade de biomassa. Igualmente, em muitos casos, as células e agregados celulares sofrem danos físicos, como resultado das interações com o fluido.

A susceptibilidade das suspensões celulares à tensão pode ser quantificada através de testes de curta duração ou de longa duração, dependendo da sua duração relativamente ao ciclo de crescimento das células.

Neste capítulo, as suspensões de células de *Centaurea calcitrapa* foram sujeitas a testes de curta duração, onde foram submetidas a condições intensas e bem definidas de tensão ao serem aplicadas no Fluxo Turbulento Submerso (ou Jacto Submerso).

Este sistema apenas foi aplicado a uma linha celular com características particulares, a *Morinda citrifolia*, que é uma suspensão celular vegetal, em que as células apresentam uma forma alongada e se encontram agrupadas em cadeias lineares, com um comprimento a variar entre 100 e 1700  $\mu\text{m}$  (Kieran, 1993; MacLoughlin *et al.*, 1998). As células em suspensão de *C. calcitrapa*, apresentam-se sob a forma de agregados (Raposo, 1997), podendo estes variar entre 50 e 3000  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Jeffers *et al.*, 2003).

Bronnenmeier & Märkl (1982) foram os pioneiros na aplicação do jacto submerso a culturas de células ao *stresse* turbulento com pressões superiores a 25 bar. O equipamento de jacto submerso encontrava-se incorporado num turbidostato mecanicamente agitado, usado no cultivo de algas verdes e cianobactérias.

Gallagher (1987) estudou os efeitos de tensão em suspensões de células de *Morinda citrifolia*, a baixas concentrações (10 – 50 g/L), quando estas foram sujeitas repetidamente, a baixas pressões a um jacto turbulento submerso. Observou-se que a viabilidade celular sofria uma redução significativa quando a pressão imposta era igual ou superior a 3 bar. Esta pressão corresponde a uma potência específica de 3 W/kg. Um modelo de morte celular de primeira ordem descreve a perda de viabilidade celular como uma função do tempo de exposição. Usando o mesmo sistema de jacto submerso, Curtis (1991) determinou que as células na fase de latência e início da fase exponencial eram menos resistentes ao

stresse hidrodinâmico do que as células que se encontravam no final das fases exponencial ou estacionária do crescimento. Esta redução na resistência das células sugere que o modelo de morte de primeira ordem poderá não ser aplicável às células novas, que se encontram no início do ciclo de crescimento. Este autor observou igualmente que, as cadeias de células de maiores dimensões eram preferencialmente deterioradas quando sujeitas a condições de tensão.

Murtagh (1994) mediu o tamanho das cadeias celulares de *M. citrifolia* antes e depois da passagem pelo sistema de jacto submerso. A média da tensão de corte e da taxa de morte celular foi relacionada através da lei de potência de expoente de 1,9. A distribuição log-normal apresentou-se como sendo um bom modelo para a distribuição do tamanho das cadeias, antes e depois de sujeitas a tensão. Este autor apresenta uma descrição completa do sistema, com um modelo matemático, que explicam o fluxo turbulento submerso.

Ryan (1997) continuou o trabalho de Murtagh (1994) com a *M. citrifolia*, concentrando-se na redução da distribuição do tamanho das cadeias da suspensão celular usando a análise de imagem digital. Uma distribuição inicial do tamanho das cadeias foi construída pela determinação das dimensões de pelo menos 100 cadeias não sujeitas a condições de tensão. Um ajuste não linear de Levenburg-Marquardt, desenvolvido por Kieran (1993), foi usado para determinar os parâmetros que descrevem a distribuição log-normal, que melhor se ajustam aos dados experimentais. Neste estudo, a suspensão celular foi sujeita a diferentes condições no sistema de fluxo turbulento submerso, durante 20 ciclos. A energia dissipada média variou entre 8 e 670 kW/kg. A distribuição do tamanho das cadeias foi medida em vários ciclos, no decurso das experimentações. A energia dissipada média  $\bar{\varepsilon}$  (kW/Kg) foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\bar{\varepsilon} = C_g \frac{U_0^3}{d_0} \quad (3.1.)$$

onde  $C_g$  é uma constante igual a 0,0057,  $U_0$  é a velocidade de saída do bocal (m/s) e  $d_0$  é o diâmetro do bocal (m).

MacLoughlin *et al.* (1998) continuaram o estudo nas suspensões celulares de *M. citrifolia* verificando a cinética de morte de primeira ordem. Observaram diferenças significativas nas células antes e depois destas serem sujeitas a condições de stresse. Neste trabalho foi assumido que as forças mais destrutivas eram geradas na região que começa no centro, estendendo-se por mais 10 diâmetros a jusante do bocal. Estes resultados suportam a escolha da energia dissipada como parâmetro para medir o potencial destrutivo do fluxo turbulento. Os autores observaram igualmente que, as cadeias longas eram mais susceptíveis às condições de tensão do que as cadeias menores. Esta conclusão levou a

que fosse considerado o conceito de tamanho máximo da cadeia. Foi assim estabelecido que o tamanho era um factor crítico para determinar a susceptibilidade das cadeias celulares. Dunlop & Namdev (1994), usando um biorreactor mecanicamente agitado, notaram que era inadequado usarem o tamanho médio para caracterizarem as culturas celulares de cenoura. Uma distribuição bimodal, com agregados entre 50 – 250  $\mu\text{m}$  e outros com dimensões entre 650 – 1000  $\mu\text{m}$ , não poderiam ser representativos para definir a média do tamanho dos agregados. Ayazi-Shamlou *et al.* (1994) usaram o  $d_{90}$  como medida estatística representativa para mostrarem o efeito na distribuição de tamanhos dos precipitados proteicos quando expostos a condições de tensão no biorreactor mecanicamente agitado. O  $d_{90}$  é definido como sendo o diâmetro equivalente a que 90% do volume de todas as partículas de proteína têm um tamanho maior. Foi determinado que a frequência inicial de quebra das proteínas precipitadas eram apenas e unicamente função da taxa de energia dissipada.

Hiney (1999) sujeitou também, culturas de células de *M. citrifolia* ao jacto turbulento. A pressão variou entre 1 e 10 bar e os diâmetros de saída dos bocais entre 1,5 e 2 mm, tendo a energia dissipada variado entre 12 e 170 kW/kg. O efeito provocado nas suspensões celulares foi quantificado pela perda de viabilidade, determinada pela coloração com o corante Evans Blue. Foi encontrado um modelo de primeira ordem para descrever a redução da viabilidade nas cadeias celulares em função do tempo de exposição no sistema de jacto turbulento, sendo observada uma dependência linear com a energia dissipada. As distribuições do tamanho das cadeias celulares durante os diferentes ciclos que constituem uma corrida neste sistema, foram determinadas usando a análise de imagem digital. As distribuições foram descritas pelo modelo log-normal.

Comparando os resultados do trabalho desenvolvido por Hiney (1999) com os de Murtagh (1994) no jacto submerso com diferentes tamanhos do bocal, estes sugerem que o rebentamento das células está mais dependente da natureza da turbulência do fluido do que da geometria específica do bocal. A partir dos estudos realizados por Kieran (1993) é conhecido que as cadeias de maiores dimensões são mais susceptíveis às forças hidrodinâmicas. O tamanho máximo da cadeia, representado pelo  $L_{99}$ , foi estudado como sendo um parâmetro importante para a caracterização do tamanho das cadeias celulares após serem sujeitas a condições de tensão. O  $L_{99}$  foi definido como sendo o nonagésimo nono percentil da distribuição do tamanho das cadeias e é calculado pela fórmula:

$$\int_0^{L_{99}} p(l)dl = 0,99 \quad (3.2.)$$

onde  $p(l)$  é a probabilidade da função de densidade do ajuste não-linear de Levenburg-Marquardt. Segundo Hiney (1999), valor de  $L_{99}$  diminui com o aumento do tempo de exposição ao jacto submerso, aproximando-se de um valor limite  $L_E$ .

Neste trabalho, as células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* são sujeitas a condições de stresse de curta duração e de elevada intensidade por intermédio do equipamento de Fluxo Turbulento Submerso. A viabilidade celular é quantificada de forma a avaliar o efeito nas suspensões celulares. A análise digital de imagem e a medição em FBRM (*Focused Beam Reflectance Measurement*) serão as principais técnicas usadas para avaliar os danos provocados na distribuição dos agregados.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Manutenção das culturas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em Erlenmeyer

Foram usadas suspensões celulares de *Centaurea calcitrapa* com 5 e 7 dias após subcultivo e mantidas conforme descrito no capítulo 2, secção 2.2.1..

### 3.2.2. Fluxo Turbulento Submerso

#### A. Descrição do equipamento

Este sistema pode ser visto na figura 3.1., sendo os principais componentes que o constituem os seguintes:

**Vaso de pressão:** vaso metálico onde as células se encontram para serem sujeitas a um fluxo de pressão. Este vaso pode ser pressurizado até pressões de 10 bar, por meio de ar comprimido, que se encontra ligado ao topo do vaso. Uma válvula de segurança, que suporta até 24 bar de pressão e uma outra válvula de libertação do ar, quando este já não é necessário, encontram-se no topo do vaso.

**Vaso de vidro:** este recipiente de 5 L contém a suspensão celular que vai ser bombeada para o vaso de pressão através de uma bomba peristáltica.

**Tubo de saída:** o tubo de saída (Aço Inoxidável 304) com um diâmetro interno de 3 mm, está ligado à base do vaso de pressão com um sistema hermético que suporta pressões até 10 bar.

**Bocal de saída:** usou-se um bocal de saída com o diâmetro de 2 mm. Este bocal de saída foi construído com base em estudos anteriores (Hiney, 1999), de forma a reduzir a turbulência no final da tubagem e a diminuir a transição do fluxo em jacto.

**Bomba peristáltica:** uma bomba peristáltica (Watson Marlow Modelo nº 302S) foi usada para transferir a suspensão celular do reservatório para o vaso de vidro, no início da experiência, e do vaso de vidro para o vaso de pressão, antes das células serem sujeitas a cada ciclo.

**Manómetro de pressão:** está ligado ao topo do vaso de pressão.

**Ar comprimido:** foi usado como gás de propulsão para promover a saída das células em jacto.

**Tubo flexível:** usou-se tubo de silicone (Tygon) com um diâmetro interno de 6,4 mm e um diâmetro externo de 9,6 mm. Este tubo foi usado para ligar o reservatório, onde se

encontrava a suspensão celular à bomba, e desta ao vaso de vidro. Foi também utilizado para bombear a suspensão do vaso de vidro para o vaso de pressão.

Válvulas: todas as válvulas usadas neste sistema eram de metal (Nupro).



**Figura 3.1.** – Sistema de Fluxo Turbulento Submerso

#### B. Procedimento experimental:

O equipamento de jacto turbulento submerso é normalmente usado para suspensões celulares bastante diluídas (10 – 50 g/L). Assim, foi necessário proceder-se ao tratamento da suspensão, como se encontra a seguir descrito.

1. A suspensão de células de *C. calcitrpa* foi cuidadosamente passada por dois crivos (300  $\mu\text{m}$  e 250  $\mu\text{m}$ ), de forma a retirar os agregados de maiores dimensões. Apenas foi utilizada para este estudo a fracção celular menor que 250  $\mu\text{m}$ .

2. Determinou-se o peso fresco da suspensão celular (fracção celular menor que 250  $\mu\text{m}$ ), de modo a obtermos um volume final de 2,5 L da suspensão diluída com uma concentração celular de 15 g/L. A suspensão foi diluída com uma solução de 2,5 g/L  $\text{KNO}_3$ . A concentração de  $\text{KNO}_3$  utilizada é a que se encontra no meio de cultura SH, de forma a evitar fenómenos de plasmólise celular ou turgescência das células.
3. Bombeou-se 2,2 L de suspensão celular para o vaso de vidro do equipamento de Fluxo Turbulento.
4. Cerca de 1,2 L do volume da suspensão foi bombeado para o vaso de pressão, tendo a certeza que a válvula de escape, no topo do vaso, se encontrava aberta.
5. Manteve-se a pressão no vaso constante, mantendo a linha de ar aberta. A válvula de saída, colocada no topo do tubo de saída foi aberta, cronometrando-se o tempo que demorou a expelir 1 L da suspensão para o vaso de vidro.
6. Após um volume de 1 L da suspensão ter sido expelido para o vaso de vidro (volume final no vaso de vidro 2 L), fechou-se a válvula de saída do vaso de pressão.
7. Um novo ciclo foi iniciado pelo bombeamento de 1,0 L da suspensão do vaso de vidro para o vaso de pressão, repetindo-se os passos anteriores.

Um ensaio no aparelho de Fluxo Turbulento envolveu 26 ciclos, com recolha de amostras pela válvula de saída do vaso de vidro, após 0, 6, 13, 19 e 26 ciclos. Cada ensaio foi repetido duas vezes.

No fim de todo o processo, o vaso de pressão foi esvaziado para o vaso de vidro e a suspensão celular foi bombeada novamente para o reservatório inicial.

As fórmulas usadas nos cálculos experimentais do sistema de jacto turbulento encontram-se no Anexo C. No Anexo D são apresentados os dados dos ensaios realizados no sistema de jacto turbulento.

### **3.2.3. Parâmetros para avaliar o efeito de tensão na suspensão celular de *Centaurea calcitrapa***

Procedeu-se à determinação do peso fresco, peso seco, viabilidade celular, recolha de imagens para ulterior análise e ensaios no *FBRM* das amostras, antes da passagem pelo Fluxo Turbulento (0 ciclos) e após a passagem do último ciclo (26 ciclos). Nos ciclos intermédios (6, 13, 19) apenas foi recolhida amostra suficiente para a captação de imagens para posterior análise.

### 3.2.3.1. Peso Fresco e Peso Seco

O peso fresco é expresso em gramas por unidade de volume (mL) e foi obtido, por pesagem de 30 mL da suspensão celular, previamente diluída com uma solução de  $\text{KNO}_3$  2,5 g/L, após remoção do sobrenadante por filtração. Previamente, os filtros foram secos, em estufa a 80 °C durante 4 horas. Após arrefecimento foram pesados.

O peso seco, expresso em gramas por unidade de volume (mL), foi determinado após secagem das células numa estufa a 80 °C, durante 48 horas.

### 3.2.3.2. Viabilidade celular

Utilizou-se o método apresentado por Keβler & Furusaki (1997) para estimar a viabilidade celular, utilizando o corante Evans Blue, conforme descrito no capítulo 2, secção 2.2.7.1..

A viabilidade é expressa em percentagem, como sendo a razão entre o número de células viáveis e o número total de células presentes.

### 3.2.3.3. Análise digital de imagem

Técnicas digitais de análise de imagem foram usadas para determinar o diâmetro equivalente dos agregados celulares e o diâmetro equivalente máximo ( $D_{99}$ ), conforme descrito no capítulo 2, secção 2.2.3.1..

### 3.2.3.4. *Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM)*

As amostras recolhidas foram analisadas usando o *Focused Beam Reflectance Measurement* (FBRM), modelo M400LF, com uma sonda M400L acoplada (Lasentec ®, Redmond, Washington, USA). Esta técnica encontra-se descrita no capítulo 2, secção 2.2.3.2.

As medidas estatísticas usadas na análise dos dados foram a média, contagem normalizada por canal, comprimento médio de corda e contagem total, encontrando-se descritas no capítulo 2, secção 2.2.3.2..

### 3.2.4. Cálculo do tempo de exposição

Num determinado ciclo, nem todas as células da suspensão são sujeitas a tensão ao passar pelo sistema em jacto. Assim, o número médio de células expostas ao efeito de tensão não será igual ao número de ciclos bombeados. O factor de probabilidade a que as células se

encontram sujeitas a condições de tensão tem de ser incorporado no cálculo do tempo de exposição por ciclo. No início do primeiro ciclo, 2 L da suspensão celular encontra-se no vaso de vidro e 200 mL no vaso de pressão. Durante um ciclo, 1 L é bombeado para o vaso de pressão e então 1 L dos 1,2 L são novamente expelidos sob pressão para o vaso de vidro. Assumindo que estamos perante condições de mistura ideal em ambos os vasos, a probabilidade de um determinado volume de células ser exposto ao fluxo turbulento é dado pela seguinte relação:

$$\begin{aligned} \text{Probabilidade de exposição} &= \left[ \begin{array}{l} \text{Probabilidade} \\ \text{das células serem} \\ \text{transferidas para o} \\ \text{vaso de pressão} \end{array} \right] \times \left[ \begin{array}{l} \text{Probabilidade} \\ \text{das células serem} \\ \text{expostas ao} \\ \text{fluxo turbulento} \end{array} \right] \\ &= \frac{1000}{2000} \times \frac{1000}{1200} = 0,4167 \end{aligned}$$

No primeiro ensaio que se realizou com o sistema de jacto turbulento, a probabilidade de exposição foi diferente, devido aos volumes de suspensão utilizados serem diferentes. Verificou-se a formação de espuma e bastante degradação celular logo no primeiro ciclo, não sendo esta devido ao efeito da tensão que se queria observar na suspensão, mas sim ao impacto no vaso de vidro. Assim, decidiu-se diminuir o volume da suspensão sujeita ao fluxo turbulento e aumentar o volume de suspensão no vaso de vidro. Inicialmente a probabilidade de exposição era:

$$= \frac{1300}{2000} \times \frac{1300}{1500} = 0,5633$$

### 3.2.5. Crivagem da suspensão e sua caracterização

Antes das células serem sujeitas à passagem pelo sistema de jacto turbulento, foram passadas por um sistema de crivos, de forma a eliminar os agregados com dimensões superiores a 250  $\mu\text{m}$ . Observou-se a viabilidade celular da suspensão de forma a verificar se esta tinha sofrido alguns danos pela passagem pelos crivos. Verificou-se igualmente, a estabilidade da cultura, ao longo de 5 horas, após a passagem pelos crivos (tabela 3.1.). Observou-se que os valores de viabilidade celular se mantiveram idênticos aos obtidos nas suspensões originais. Embora a viabilidade da suspensão antes da passagem pelos crivos seja ligeiramente superior à obtida após a passagem por estes, pode dever-se à questão de

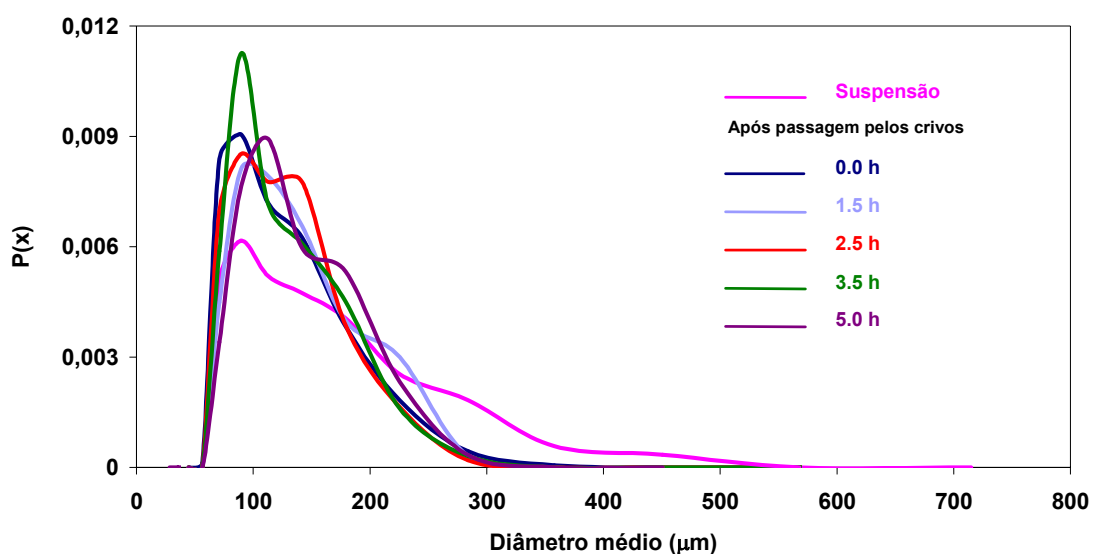
ser difícil contar as células devido a estas se encontrarem em agregados de grandes dimensões, dificultando a leitura da viabilidade e assim, introduzindo algum erro nas leituras.

**Tabela 3.1.** – Parâmetros analisados da suspensão antes e após a passagem pelos crivos.

AMOSTRAS		PESO FRESCO (g/L)	PESO SECO (g/L)	VIABILIDADE (%)
Suspensão		256,00	9,36	92,46
Crivos	0,0 h	22,15	0,82	93,22
	1,5 h	29,56	0,86	90,63
	2,5 h	30,71	0,90	90,67
	3,5 h	27,91	0,85	89,12
	5,0 h	29,66	1,03	89,23

Coefficiente de variabilidade inferior a 5%.

O sistema de análise digital poderá resolver ou minimizar as flutuações observadas e o erro presente. Como se pode observar na figura 3.2., por análise do número de densidade em função do diâmetro médio, o perfil da suspensão após passagem pelos crivos é bastante semelhante. Em relação à suspensão inicial, verifica-se uma redução significativa do número de entidades de maiores dimensões, como seria de esperar, após a passagem pelos crivos.



**Figura 3.2.** – Distribuição do diâmetro médio dos agregados de *C. calcitraba* antes e após passagem pelos crivos.

De forma a ter-se a certeza que os danos celulares eram apenas resultado da exposição ao elevado stresse hidrodinâmico do sistema de jacto turbulento, determinou-se a viabilidade das células após estas terem sido bombeadas continuamente. Foram recolhidas amostras antes de serem bombeadas, ao fim de 3, 6, 13, 19 e 26 vezes pela bomba. Como se pode observar pela tabela 3.2., a viabilidade da suspensão manteve-se constante ao longo dos 26 ciclos de bombeamento.

A passagem da suspensão pela bomba peristáltica para o vaso de vidro e depois deste para o vaso pressurizado, não provoca danos nas células.

**Tabela 3.2.** – Viabilidade celular da suspensão de *C. calcitrpa* após passagem pela bomba peristáltica.

AMOSTRAS	VIABILIDADE CELULAR (%)
Antes da passagem pela bomba T <sub>0</sub>	87,41
Após passagem pela bomba T <sub>3</sub>	87,64
T <sub>6</sub>	86,36
T <sub>13</sub>	87,70
T <sub>19</sub>	86,80
T <sub>26</sub>	87,32

Coeficiente de variabilidade inferior a 5%.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suspensão de células de *Centaurea calcitrapa* foi sujeita ao Fluxo Turbulento Submerso durante 26 ciclos., com recolha de amostras após 0, 6, 13, 19 e 26 ciclos. As amostras recolhidas, dos ciclos intermédios (6,13 e 19) foram analisadas em termos de viabilidade celular e análise digital de imagem. Nas amostras, antes da passagem pelo Jacto Turbulento (0 ciclos) e após passagem do último ciclo (26 ciclos) determinou-se o peso fresco, peso seco, viabilidade celular e recolheram-se imagens para ulterior análise, procedendo-se igualmente à análise das amostras em FBRM.

#### 3.3.1. Variação da viabilidade celular nas suspensões de *Centaurea calcitrapa*

A suspensão celular de *C. calcitrapa* foi sujeita à passagem pelo sistema de jacto turbulento, a diferentes energias dissipadas médias. Com o aumento do tempo de exposição observou-se uma redução na viabilidade celular (figura 3.3.). Como se pode observar nesta figura, para diferentes energias dissipadas e suspensões celulares com diferentes tempos de cultura, a perda de viabilidade celular segue uma tendência de um processo de cinética de morte de primeira ordem (equação 3.3).

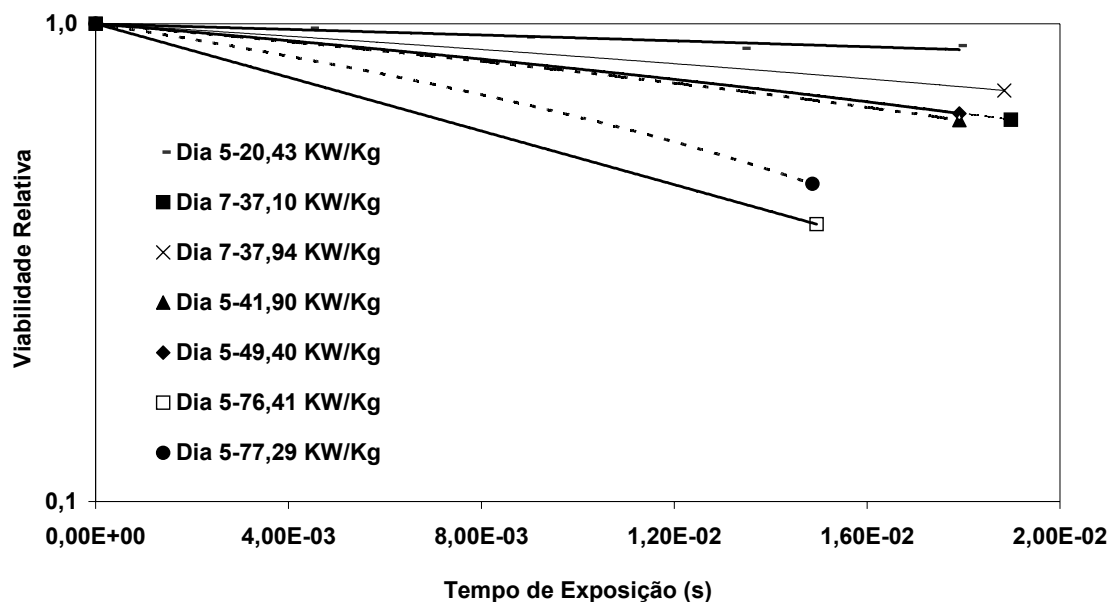
$$-\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = k_d \quad (3.3.)$$

Em que X é a viabilidade celular, t é o tempo de exposição e  $k_d$  é a taxa específica de morte. Através da representação semi-logarítmica da viabilidade relativa em função do tempo de exposição é possível determinar o valor de  $k_d$  (tabela 3.3.). Este parâmetro é extremamente útil sendo habitualmente usado como um indicador da resposta celular ao stresse hidrodinâmico imposto.

O tempo de exposição para um determinado número de ciclos foi estimado como sendo o produto do tempo médio de residência de um ciclo, pela probabilidade de exposição à tensão e pelo número de ciclos em causa (ver anexo C).

Apenas para o ensaio realizado a 20,43 KW/Kg de energia dissipada média, foram determinados valores de viabilidade no início da passagem (0 ciclos), ao fim de 6, 13, 19 e 26 ciclos. Obteve-se uma boa aproximação ao modelo cinético de morte de primeira ordem, com um coeficiente de correlação de 0,93. Nos restantes ensaios realizados, apenas aplicamos o modelo aos valores de viabilidade determinados no início e no fim da passagem pelo sistema de jacto turbulento, o que logicamente permite a obtenção de um coeficiente de correlação perfeito (figura 3.3.). Esta limitação experimental deveu-se ao facto do processo

ser extremamente moroso e neste estudo ser mais importante a recolha de imagens para posterior análise.



**Figura 3.3.** – Viabilidade relativa da cultura de células em suspensão de *C. calcitrapa*, em função do tempo de exposição, após passagem pelo sistema de jacto turbulento (26 ciclos), a diferentes energias dissipadas médias.

**Tabela 3.3.** – Valores das taxas de morte celular das células em suspensão de *C. calcitrapa*, determinadas para diferentes tempos de cultura e diferentes energias dissipadas médias.

ENSAIO	ENERGIA DISSIPADA (KW/Kg)	VARIAÇÃO DA VIABILIDADE RELATIVA	$k_d$ ( $s^{-1}$ )
Cultura 5 dias – 2,0 bar (-)	20,43	1,00 – 0,90	6,50
Cultura 5 dias – 5,6 bar (◆)	49,40	1,00 – 0,65	19,60
Cultura 5 dias – 5,6, bar (▲)	41,90	1,00 – 0,63	20,72
Cultura 7 dias – 5,6, bar (■)	37,10	1,00 – 0,63	19,50
Cultura 7 dias – 5,6 bar (x)	37,94	1,00 – 0,73	14,59
Cultura 5 dias – 9,0 bar (□)	76,41	1,00 – 0,38	41,43
Cultura 5 dias – 9,0 bar (●)	77,29	1,00 – 0,46	36,17

Analisando a figura 3.3. e a tabela 3.3., à medida que aumentou o tempo de exposição da suspensão celular às condições de turbulência, a viabilidade relativa das células diminuiu. Observou-se que nos ensaios realizados a 76,41 e a 77,29 KW/Kg, a viabilidade decresceu mais rapidamente do que nos ensaios realizados a energias dissipadas médias inferiores. Idênticos resultados foram obtidos para a suspensão celular de *Morinda citrifolia* (Murtagh, 1994).

Tendo por base os valores apresentados na tabela 3.3. e a figura 3.3., pode-se observar que o ensaio realizado a 20,43 KW/Kg não provocou danos significativos na suspensão celular. Os valores da viabilidade celular, ao fim de 26 ciclos, continuam relativamente elevados e o valor da taxa específica de morte celular é baixo ( $6,50 \text{ s}^{-1}$ ), relativamente aos valores obtidos nos outros ensaios. Para os ensaios a 5,6 bar, verifica-se que os valores da taxa específica de morte celular aumentam significativamente, obtendo-se igualmente uma redução significativa da viabilidade, comparativamente com o ensaio realizado a 2,0 bar. A situação mais drástica foi observada com o ensaio realizado a 9 bar de pressão (76,41 e 77,29 KW/Kg), em que a viabilidade celular é reduzida a menos de 50 % do valor inicial. O valor da taxa específica de morte celular é 6 vezes superior ao obtido no ensaio a 20,43 KW/Kg de energia dissipada média. Nesta situação o stresse sofrido pelas células é significativo, provocando uma perda considerável da viabilidade da cultura.

Comparando a idade da suspensão, 5 e 7 dias, podemos constatar que não há diferenças significativas no comportamento das culturas em termos de viabilidade celular (tabela 3.3.). As pequenas variações observadas poderão ser inerentes à dificuldade de reprodutibilidade de obtenção de dados experimentais em sistemas biológicos. Mesmo sendo a mesma cultura, crescida em idênticas condições, a sensibilidade da suspensão ao stresse poderá variar nos diferentes erlenmeyers. O mesmo pode ser reflectido aquando da recolha das amostras do sistema de jacto turbulento, mesmo com uma agitação vigorosa e uma boa mistura, o processo de recolha poderá induzir alguma variabilidade de resultados.

Estudos realizados anteriormente, demonstraram que a perda de viabilidade é bem descrita pelo modelo cinético de morte de primeira ordem (Murtagh, 1994; Ryan, 1997; Hiney, 1999).

As taxas específicas de morte celular obtidas em sistemas de fluxo capilar por O'Donnell (1992), Leonard (1995) e Kieran *et al.* (1995), são da ordem de  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Estes valores das taxas específicas de morte celular bastante inferiores, comparativamente com os obtidos no jacto turbulento. Murtagh (1994) realizou também ensaios neste sistema de jacto turbulento, utilizando bocais de 1 e de 2 mm. Este autor obteve valores de taxas específicas de morte celular relativamente baixos, inferiores a  $1 \text{ s}^{-1}$ , para o bocal de 2 mm, quando comparados com os obtidos para 1 mm, que variaram entre 0,1 e  $6 \text{ s}^{-1}$ . Com base nos resultados obtidos

por estes autores e neste trabalho poder-se-ia sugerir que a ruptura celular está mais dependente da turbulência do fluido do que da geometria do sistema.

No entanto, uma desvantagem do método da viabilidade celular é que não pode ser usado para quantificar ou mesmo detectar a fragmentação celular. Comparando as amostras antes e após sofrerem stresse, observou-se visualmente a existência de agregados de menores dimensões, resultado da fragmentação de agregados de maior tamanho. Por análise da tabela 3.4., verificou-se um decréscimo significativo no peso fresco e no peso seco após exposição das células ao sistema de jacto turbulento. Este facto poderá ser o resultado da ocorrência de lise celular devido à fragmentação das células.

**Tabela 3.4.** – Variação do peso fresco e peso seco das células de *C. calcitraba*, antes e após passagem no jacto turbulento, a diferentes energias dissipadas médias. Valores médios (n=3).

ENERGIA DISSIPADA (KW/Kg)	PESO FRESCO (g/L)		PESO SECO (g/L)	
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS
49,40	15,30	13,11	0,77	0,54
41,90	16,89	14,89	0,77	0,71
37,10	15,99	13,79	0,75	0,47
37,94	15,42	13,77	0,67	0,54
76,41	15,60	12,20	0,83	0,58
77,29	13,63	12,65	0,84	0,59

Coeficiente de variabilidade inferior a 5%.

### 3.3.2. Análise Digital de Imagem

A técnica da análise digital de imagem foi usada para avaliar a morfologia dos agregados celulares através da determinação de alterações no diâmetro dos agregados celulares, antes e após serem sujeitos a condições de elevada tensão, após passagem pelo sistema de jacto turbulento.

### 3.3.2.1. Distribuição dos agregados celulares

A cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*, sujeita a diferentes condições de fluxo turbulento, no sistema de jacto turbulento, durante 26 ciclos de exposição, foi analisada em termos de morfologia dos agregados celulares.

A distribuição log-normal foi usada para caracterizar a suspensão de células de *C. calcitrapa*, tal como descrito no capítulo 2, secção 2.3.1.3.1..

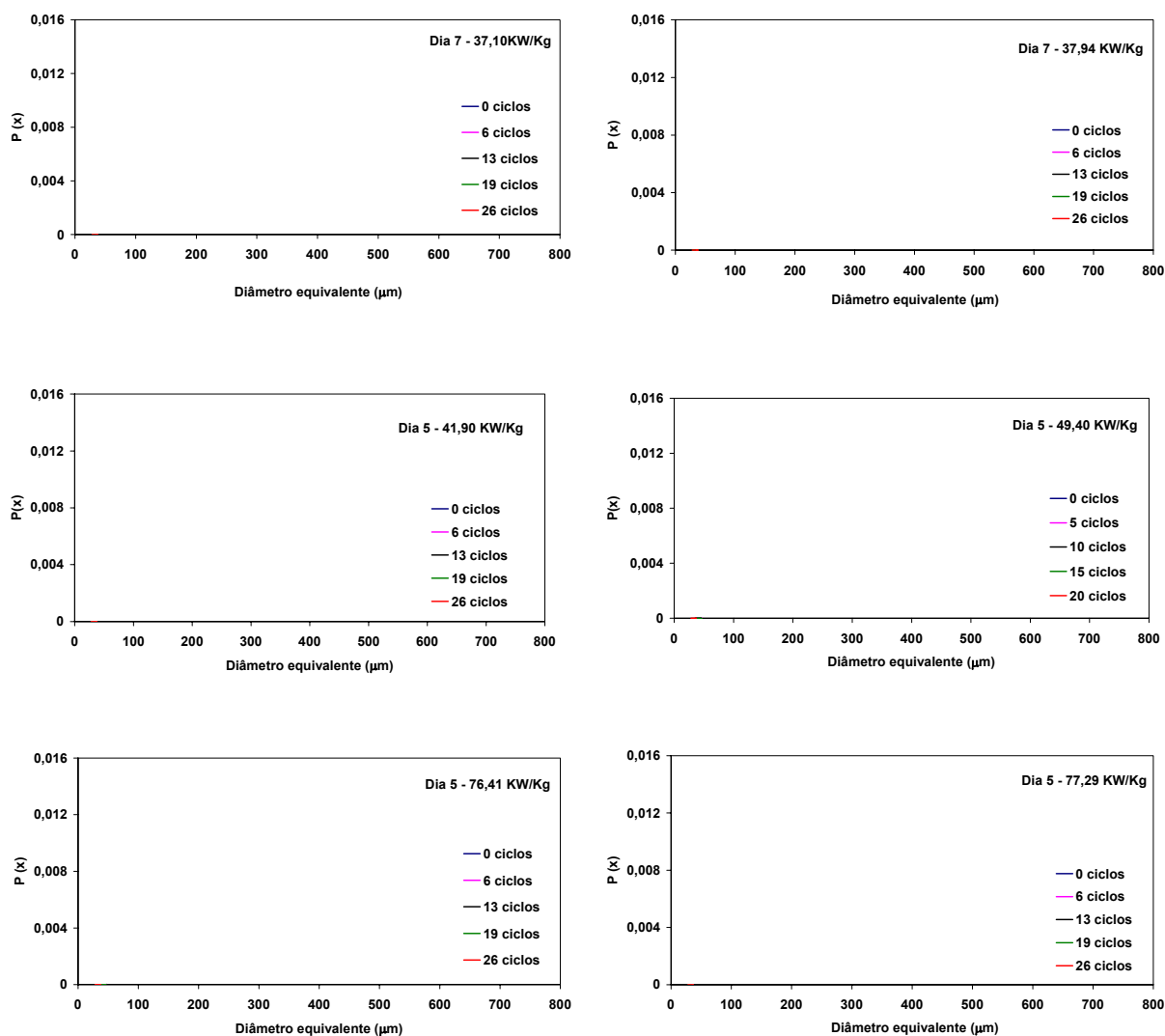
Por análise da figura 3.4., observou-se um pronunciado decréscimo no tamanho dos agregados, após terem sido sujeitos a condições de tensão. Comparativamente com os resultados obtidos antes de serem sujeitas à passagem pelo sistema de jacto turbulento, observou-se uma nítida deslocação da distribuição para a esquerda. Verificou-se uma redução do diâmetro equivalente, por eliminação dos agregados de elevada dimensão, à medida que aumentou o número de ciclos no sistema e a energia dissipada, aumentando o número de agregados de menores dimensões. Com o aumento das condições de tensão impostas, a diferença entre as distribuições antes e após tornaram-se mais pronunciadas. Em todos os casos, a média do diâmetro equivalente da distribuição após tensão foi menor do que a da distribuição antes de sofrer tensão.

Tendo em conta o tempo de ciclo da cultura de *C. calcitrapa*, não se observaram diferenças significativas entre as células com 5 e 7 dias de cultura. A variabilidade observada é inerente de ser um sistema vivo, como já foi referido no ponto anterior.

Os dados morfológicos (figura 3.4.) mostraram claramente que a distribuição log-normal é um bom modelo para representar a variação do diâmetro equivalente dos agregados celulares da suspensão de *C. calcitrapa*.

Estudos realizados com a suspensão de células de *Morinda citrifolia* (Kieran, 1993, Murtagh, 1994, Cleere, 1995, Ryan, 1997, Hiney, 1999) apresentaram uma redução, semelhante à obtida neste trabalho, na distribuição do tamanho da cadeia celular após serem sujeitas a condições de turbulência nos sistemas de capilaridade e no de fluxo turbulento.

Para as energias dissipadas médias de 41,90 e 49,40 KW/Kg, obteve-se um diâmetro equivalente médio de 122,05 e 112,72  $\mu\text{m}$  respectivamente, ao fim de 26 ciclos no sistema de jacto turbulento. Nas condições mais drásticas, em que o ensaio decorreu a 76,41 e 77,29 KW/Kg, observa-se uma redução do diâmetro equivalente médio para 108,66 e 109,77  $\mu\text{m}$  respectivamente, para o mesmo número de ciclos. Estes dados permitem sugerir que os agregados de maiores dimensões são mais susceptíveis às forças de tensão hidrodinâmicas.

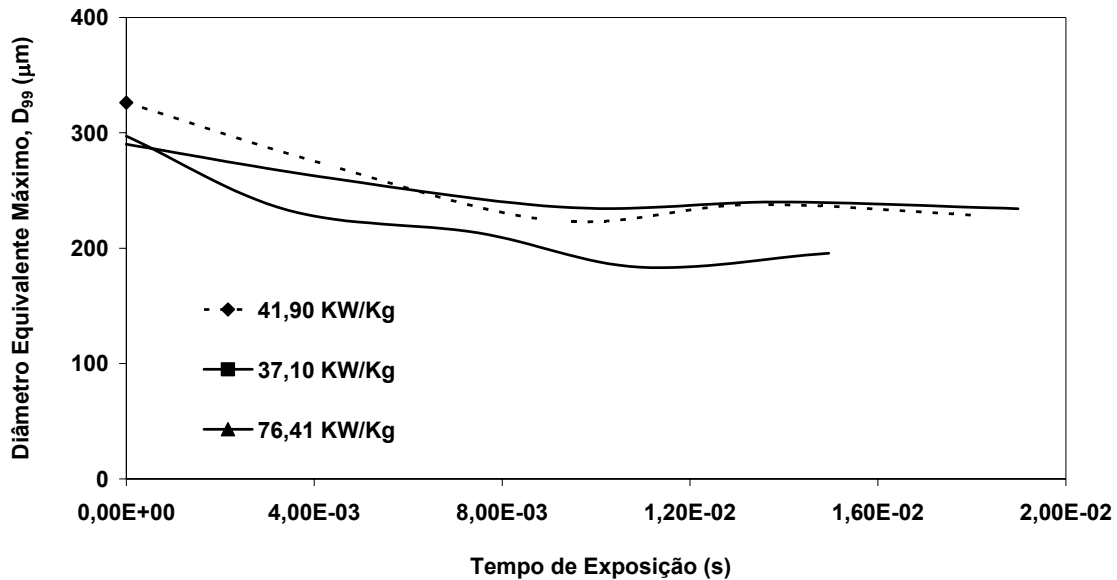


**Figura 3.4.** – Distribuição do diâmetro equivalente das células de *C. calcitrata* nas diferentes condições experimentais, antes e após passagem no sistema de jacto turbulento.

Assim sendo, da análise da imagem digital das células de *C. calcitrata*, pode-se constatar a destruição preferencial dos agregados celulares de maiores dimensões, quando sujeitas a condições de elevado stress. Com base neste pressuposto, o tamanho máximo do agregado celular poderá ser usado como um possível indicador dos danos celulares. Dada a preferencial destruição dos agregados de maiores dimensões, determinou-se o 99º percentil do diâmetro equivalente para cada distribuição e a percentagem relativa de variação deste parâmetro. Em todos os ensaios, o diâmetro equivalente máximo,  $D_{99}$ , foi calculado a partir da distribuição log-normal dos valores do diâmetro equivalente.

Na figura 3.5. é apresentada a variação do diâmetro equivalente máximo do agregado celular,  $D_{99}$ , com o aumento do tempo de exposição, às condições impostas de fluxo

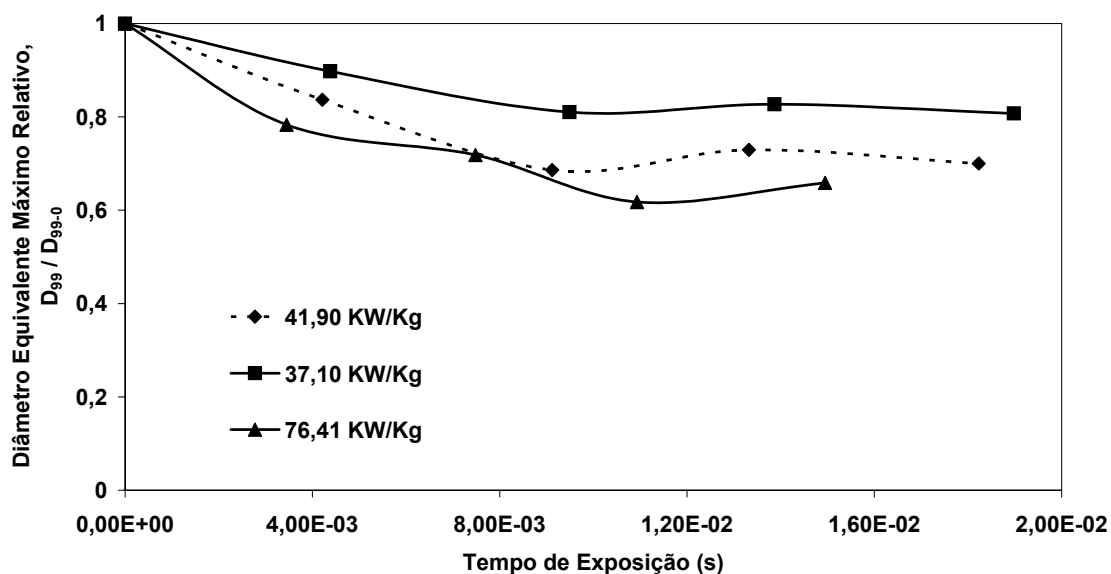
turbulento. É evidente que o diâmetro equivalente máximo diminui com o aumento do tempo de exposição, como resultado da quebra dos agregados às condições de tensão impostas no sistema de fluxo turbulento. Para a energia dissipada média de 76,41 KW/Kg, a redução do diâmetro equivalente máximo é mais acentuada, sendo esta mais pronunciada à medida que aumenta o tempo de exposição.



**Figura 3.5.** – Variação do diâmetro equivalente máximo,  $D_{99}$ , dos agregados celulares de *C. calcitrapa*, em função do tempo de exposição no sistema de fluxo turbulento.

Por análise da figura 3.6., em que são apresentados os resultados em termos relativos, podemos observar uma redução de praticamente 40 % do diâmetro equivalente máximo para o ensaio realizado à maior energia dissipada média. O diâmetro equivalente máximo relativo,  $D_{99}/D_{99-0}$ , é definido como sendo a variação do  $D_{99}$  ao longo do tempo de exposição, em relação ao  $D_{99}$  dos agregados antes de serem sujeitos a condições de tensão.

Nas condições mais drásticas do ensaio, observou-se a formação de espuma ao fim de 5 ciclos, vindo esta a aumentar com o tempo de exposição. Para os ensaios realizados a 37,10 e 41,90 KW/Kg, a formação de espuma só se verificou após decorridos 10 ciclos de exposição às condições de turbulência, vindo também a aumentar com o tempo de exposição. O aparecimento de espuma à superfície da cultura e nas paredes do vaso é sinal de degradação celular, quebra dos agregados e mesmo das células, com libertação de material intracelular para o meio de cultura.



**Figura 3.6.** – Variação do diâmetro equivalente máximo relativo dos agregados celulares de *C. calcitrapa*, em função do tempo de exposição no sistema de fluxo turbulento.

Em estudos com suspensões celulares vegetais, Kieran (1993), Murtagh (1994), Cleere (1995) e Dunlop & Namdev (1994) usaram o comprimento médio da cadeia como dimensão característica da suspensão celular. Ayazi-Shamlou *et al.* (1994) sugeriram igualmente que, o tamanho médio da uma hifa era o parâmetro dominante nos estudos de efeito hidrodinâmico em micélios filamentosos.

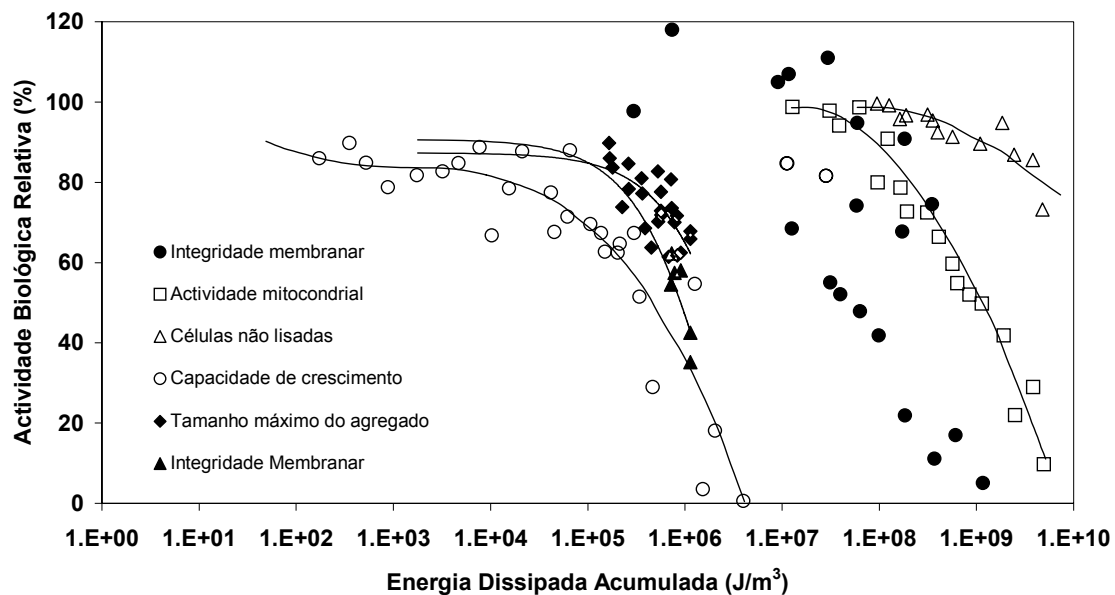
Ryan (1997) e Hiney (1999) utilizaram o conceito do comprimento máximo da cadeia, determinando o 99º percentil do comprimento da cadeia na suspensão celular de *M. citrifolia*. Esta suspensão apresenta a formação de cadeias lineares com 2 a 6 células (Kieran, 1993) e não a de agregados, como é vulgar em suspensões celulares vegetais. Como resposta às forças de tensão, o comprimento máximo da cadeia mostrou-se mais sensível que o comprimento médio da cadeia, visto serem as cadeias de maiores dimensões as preferencialmente quebradas.

### 3.3.3. Energia dissipada total

No presente trabalho, as alterações da integridade celular, através da quantificação da viabilidade celular, e do tamanho do agregado, pelo diâmetro equivalente máximo, foram usados como indicadores biológicos para determinar o efeito do fluxo turbulento nas culturas de células de *C. calcitrapa*. A figura 3.7. compara os resultados da integridade celular e da redução do diâmetro equivalente obtidos neste trabalho, com os valores obtidos por Dunlop

& Namdev (1994), em termos de actividade biológica relativa. A energia dissipada acumulada, que é o produto da energia dissipada média pelo tempo de exposição, tendo em conta a massa específica da suspensão, foi a variável hidrodinâmica que permitiu quantificar os danos provocados nas células em suspensão de *C. calcitrapa*.

Com base nos resultados obtidos, apresentados na figura 3.7., é clara a concordância da resposta entre os diferentes indicadores biológicos, vindo estes resultados a revelar a importância da energia dissipada acumulada como uma variável hidrodinâmica crítica na determinação dos danos que ocorrem nas células em suspensão.



**Figura 3.7.** – Comparação dos indicadores biológicos relativos, para culturas de células vegetais de *Daucus carota* (●, □, △, ○), em condições de fluxo laminar num viscosímetro tipo *Couette* (Dunlop *et al.*, 1994), e para culturas de *Centaurea calcitrapa* (◆, ▲) em condições de fluxo turbulento, em função da energia total dissipada.

Dunlop & Namdev (1994) utilizaram a energia dissipada acumulada, para comparar os efeitos que uma tensão de turbulência provoca nas culturas de células vegetais de *Daucus carota*. Alterações na capacidade de crescimento, efeito de lise celular e actividade mitocondrial foram os parâmetros medidos para avaliar os efeitos do fluxo turbulento nestas suspensões de células vegetais.

Estudos referidos por Kieran *et al.* (2000), para diferentes suspensões de células vegetais (*M. citrifolia*, *D. carota*), e os resultados obtidos deste trabalho, apresentam um bom nível de concordância entre os diferentes sistemas biológicos para níveis de energia dissipada

acumulada semelhantes, independentemente das diferenças morfológicas e da geometria do equipamento, modo e duração do ensaio a que estas células estão sujeitas.

Segundo Kieran *et al.* (2000), enquanto os resultados de viabilidade celular para o ensaio realizado no sistema de capilaridade, sugerem que as células de *M. citrifolia* são mais robustas, as diferenças aparentes são atribuídas à escolha do volume activo e ao cálculo da energia dissipada média, o que sobrestima o ambiente no sistema capilar. Os mesmos autores afirmam ainda que, mesmo com fluxos bem definidos é difícil comparar resultados recolhidos em diferentes condições, para linhas celulares distintas, tanto morfológicamente como fisiologicamente, usando indicadores de stresse.

Dunlop & Namdev (1994) identificaram o valor crítico da energia dissipada acumulada, que resulta numa perda específica da actividade biológica. Este parâmetro é definido como o valor da energia dissipada acumulada para o qual o sistema mantém 50 % da sua actividade biológica original. Para a actividade mitocondrial das células de *D. carota*, o valor da energia dissipada acumulada crítica é de  $1 \times 10^9$  J/m<sup>3</sup>. No caso da integridade membrana da suspensão de células de *M. citrifolia*, quando sujeita às condições do sistema de jacto turbulento, o valor da energia dissipada acumulada crítica é de  $5 \times 10^5$  J/m<sup>3</sup> (Kieran *et al.*, 2000). Para a suspensão de células de *C. calcitraba*, a energia dissipada acumulada crítica encontrada é de  $9 \times 10^5$  J/m<sup>3</sup>, para a integridade membrana. Os resultados obtidos são concordantes com os obtidos por outros autores (Dunlop and Namdev, 1994; Kieran *et al.*, 1995; MacLoughlin *et al.*, 1998; Kieran *et al.*, 2000), reforçando que a energia dissipada acumulada é um bom parâmetro para avaliar os danos nas suspensões celulares.

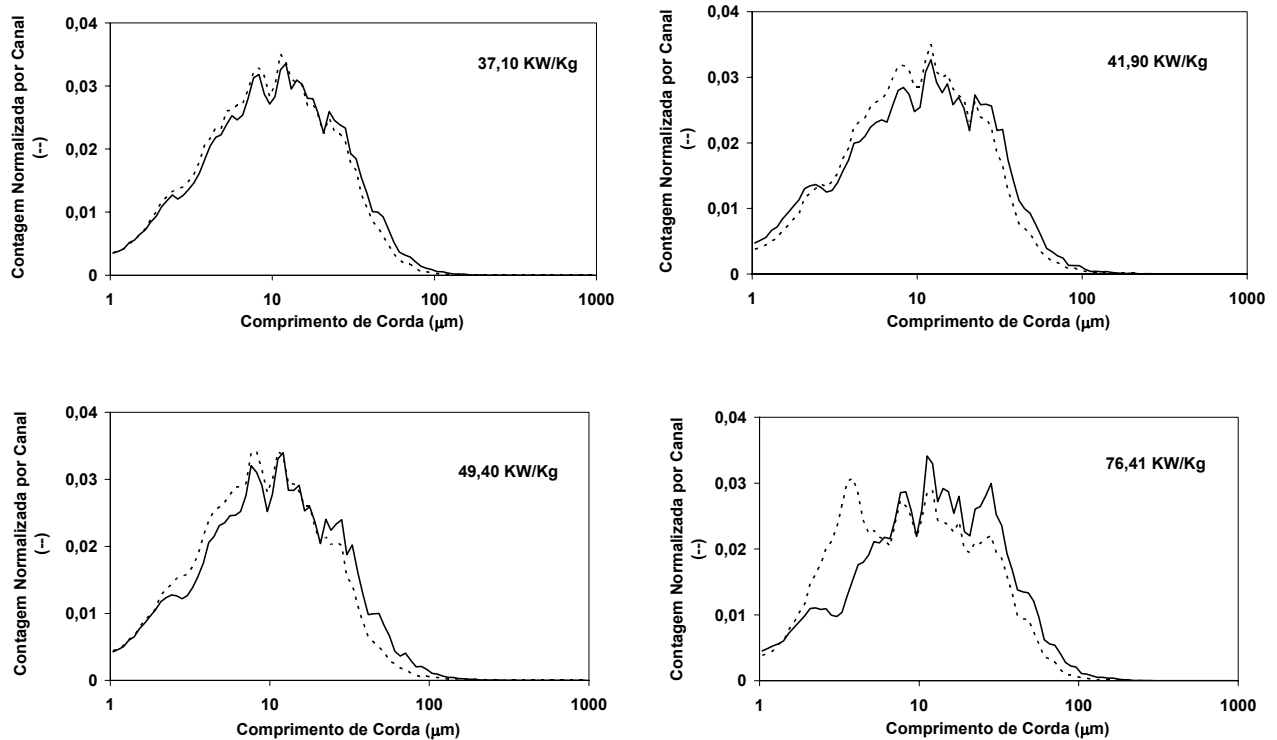
#### **3.3.4. Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM)**

Neste trabalho foi usada uma técnica óptica – *Focused Beam Reflectance Measurement* - para confirmar os resultados obtidos pela análise de imagem. A análise de imagem é uma técnica que embora dê resultados fiáveis, é extremamente morosa pela captação das imagens e pela análise destas. Em contrapartida, a *Focused Beam Reflectance Measurement* (FBRM), é uma técnica que permite a recolha de uma grande quantidade de dados num curto período de tempo (aproximadamente 5 min).

A técnica FBRM foi utilizada neste estudo para quantificar os danos nas suspensões celulares de *C. calcitraba* antes e após serem sujeitas às condições do jacto turbulento, permitindo complementar os resultados obtidos da análise digital de imagem.

Os gráficos apresentados na figura 3.8., permitem avaliar a contagem das partículas interceptadas pelo feixe laser da sonda de FBRM, neste caso agregados, em cada comprimento de corda. Analisando os resultados obtidos por aplicação desta técnica,

observa-se um nítido deslocamento para a esquerda da curva que representa a cultura que foi sujeita às condições de turbulência, em relação à curva que representa as células antes de serem sujeitas a condições de tensão. Verifica-se uma redução dos agregados de maiores dimensões, formando agregados menores. É nítido o aumento da contagem de pequenos agregados, com redução dos agregados de maiores dimensões.



**Figura 3.8.** – Contagem das partículas por canal em função do comprimento de corda para diferentes energias dissipadas médias. Linha contínua representa a cultura antes de ser sujeita ao fluxo turbulento; linha descontinua representa a cultura após ser sujeita ao fluxo turbulento.

Para a energia dissipada média de 76,41 KW/Kg observa-se uma quebra maior dos agregados de grandes dimensões, com o aumento do número de pequenos agregados. Para comprimentos de corda menores que 10  $\mu\text{m}$ , é visível a formação de um pico de células que foram sujeitas ao fluxo turbulento. No caso de energias dissipadas médias menores (37,10 KW/Kg), a quebra dos agregados de maiores dimensões não é observável, sendo as duas curvas quase coincidentes (figura 3.8.). A quebra dos agregados de grandes dimensões aumenta com a energia dissipada média, aumentando igualmente o número de agregados de menores dimensões.

A tabela 3.5. reúne alguns dos resultados da análise digital de imagem e do FBRM, de forma a avaliar o efeito do jacto turbulento nas células em suspensão de *C. calcitrpa*, através da percentagem de redução dos parâmetros analisados, antes e após estas serem

sujeitas a condições de tensão. Os dados referentes à análise digital de imagem são os diâmetros equivalentes médios, enquanto os obtidos do FBRM são as cadeias médias e as contagens totais.

**Tabela 3.5.** – Parâmetros determinados, para ensaios realizados a diferentes energias dissipadas, com base nas técnicas de análise digital de imagem (ADI) e *Focused Beam Reflectance Measurement* (FBRM), nas suspensões celulares de *C. calcitrpa*, antes ( $t_0$ ) e após ( $t_{26}$ ) passagem no sistema de jacto turbulento. Percentagem de redução dos parâmetros analisados, após a passagem pelo jacto turbulento ( $t_{26}$ ), comparativamente com a suspensão com 0 ciclos (antes de ser sujeita a forças de tensão).

ENERG. DISSP. (KW/Kg)	ADI	FBRM		VIABILIDADE CELULAR (%)	PERCENTAGEM DE REDUÇÃO				
	DIÂMETRO EQUIVAL. MÉDIO ( $\mu\text{m}$ )	COMP. CORDA MÉDIA ( $\mu\text{m}$ )	CONTAGEM TOTAL		DIÂMETRO EQUIVAL. MÉDIO	COMP. CORDA MÉDIA	CONTAGEM TOTAL	VIABILIDADE CELULAR	
37,10	$T_0$	136,65	14,86	1458,40	86,56	12	10	8	37
	$T_{26}$	119,66	13,37	1348,45	54,53				
41,90	$T_0$	150,03	15,37	1324,03	91,33	19	11	5	37
	$T_{26}$	122,05	13,72	1257,85	57,44				
49,40	$T_0$	146,53	15,55	1075,99	89,47	23	18	10	35
	$T_{26}$	112,72	12,81	973,76	58,06				
76,41	$T_0$	149,28	17,74	388,30	92,53	27	23	-22	62
	$T_{26}$	108,66	13,75	473,65	35,22				

Com o aumento da energia dissipada média, observa-se uma maior redução do diâmetro equivalente médio, do comprimento de corda média e substancialmente da viabilidade celular, após a suspensão ser sujeita a condições de tensão, por passagem no jacto turbulento. O ensaio que decorreu com a energia dissipada média de 37,10 KW/Kg é o que apresenta menor redução no diâmetro equivalente médio, após passagem pelo sistema de jacto turbulento, como se pode ver na tabela 3.5. e na figura 3.8., em que as curvas da contagem de partículas por canal estão praticamente sobrepostas. Com a contagem total, observa-se igualmente uma redução deste parâmetro, com excepção do ensaio realizado a 76,41 KW/Kg, em que a contagem total para as células que sofreram tensão é superior ao da suspensão inicial. Mais uma vez, este facto pode ser devido à quebra de alguns

agregados de maiores dimensões, originando outros de menores. Esta justificação é apoiada pela formação do pico para os comprimentos de corda de menores dimensões, na figura 3.8., como referido nos parágrafos anteriores. Em termos de viabilidade celular, apenas o ensaio realizado a 76,41 KW/Kg se destaca dos restantes, por apresentar uma percentagem de redução na viabilidade das células de 62 %. A percentagem de redução da viabilidade celular nos restantes ensaios, que decorreram a diferentes energias dissipadas médias, é idêntica (35-37 %), não se distinguindo diferenças entre os diferentes ensaios. Comparativamente com os restantes parâmetros analisados (tabela 3.5.), como sendo o diâmetro equivalente médio, a cadeia média e a contagem total, a viabilidade celular, não permite avaliar o efeito do aumento da energia dissipada média, para valores inferiores a 76,41 KW/Kg.

Na tabela 3.6. encontram-se os resultados da contagem total, que varia entre 0 e 1000  $\mu\text{m}$ , dividida em três classes, com as denominações de fina (0 – 10  $\mu\text{m}$ ), média (10 – 100  $\mu\text{m}$ ) e larga (100 – 1000  $\mu\text{m}$ ). Em todos os ensaios, observou-se uma diminuição da contagem para as classes média e larga. Os ensaios que decorreram a 41,90 e 49,40 KW/Kg apresentaram um ligeiro aumento dos agregados finos, após serem sujeitos a condições de turbulência, em relação à suspensão inicial. No entanto, o valor da contagem total continua a ser inferior ao obtido com a suspensão de células antes de serem impostas forças de tensão. O ensaio realizado em condições de maior turbulência, a uma energia dissipada média de 76,41 KW/Kg, a contagem total aumenta após as células serem sujeitas às forças de tensão. Este facto, é devido ao aumento de 64 % dos agregados finos, em relação ao valor existente na suspensão inicial. Estes resultados são indicativos que com o aumento das condições de turbulência, maior é a agressividade para as células, e por conseguinte, maior é a quebra dos agregados de maiores dimensões. Este resultado reforça os obtidos anteriormente, em que os agregados de maiores dimensões são os preferencialmente quebrados, quando a suspensão celular se encontra exposta a forças de tensão intensas.

Os resultados obtidos por aplicação desta técnica, vêm confirmar o estudo efectuado com base na análise digital de imagem, em que os agregados de maiores dimensões eram os preferencialmente quebrados quando expostos a elevadas condições de tensão, como é o caso do fluxo turbulento.

**Tabela 3.6.** – Contagem total, obtida por FBRM, dividida em classes: fina [0 – 10  $\mu\text{m}$ ], média [10 – 100  $\mu\text{m}$ ] e larga [100 – 1000  $\mu\text{m}$ ]

	ENERG. DISSP. KW/Kg	CONTAGEM TOTAL	FINAS	MÉDIAS	LARGAS
T <sub>0</sub>	37,10	1458,40	710,867	744,433	3,101
T <sub>26</sub>		1348,45	699,088	648,266	1,100
T <sub>0</sub>	41,90	1324,03	637,744	682,199	4,090
T <sub>26</sub>		1257,85	644,580	610,682	2,590
T <sub>0</sub>	49,40	1075,99	529,657	541,200	5,134
T <sub>26</sub>		973,76	538,135	433,078	2,544
T <sub>0</sub>	76,41	388,30	167,833	218,406	2,060
T <sub>26</sub>		473,65	260,400	212,411	0,844

### 3.3.5. Validação das Medições

Ao interpretar os dados obtidos na execução deste trabalho, por aplicação da análise digital de imagem, foi necessário inicialmente proceder à validação estatística das medições efectuadas. A aplicação da técnica da imagem digital fornece uma enorme quantidade de dados e seria imprudente analisá-los sem uma validação estatística crítica. Assim, é importante considerar o número de imagens/objectos a ser analisado. A figura 3.9. mostra a variação dos valores do diâmetro médio em função do número de entidades medidas. É possível observar que para a suspensão inicial só se atinge a estabilização dos valores do diâmetro médio acumulado ao fim de aproximadamente 200 entidades, enquanto para a suspensão que foi sujeita à passagem pelos crivos, obtemos um valor médio do diâmetro ao fim de aproximadamente 150 entidades. Assim, de forma a validar esta técnica de análise de imagem, determinou-se que o número mínimo de entidades a analisar seria de 250.

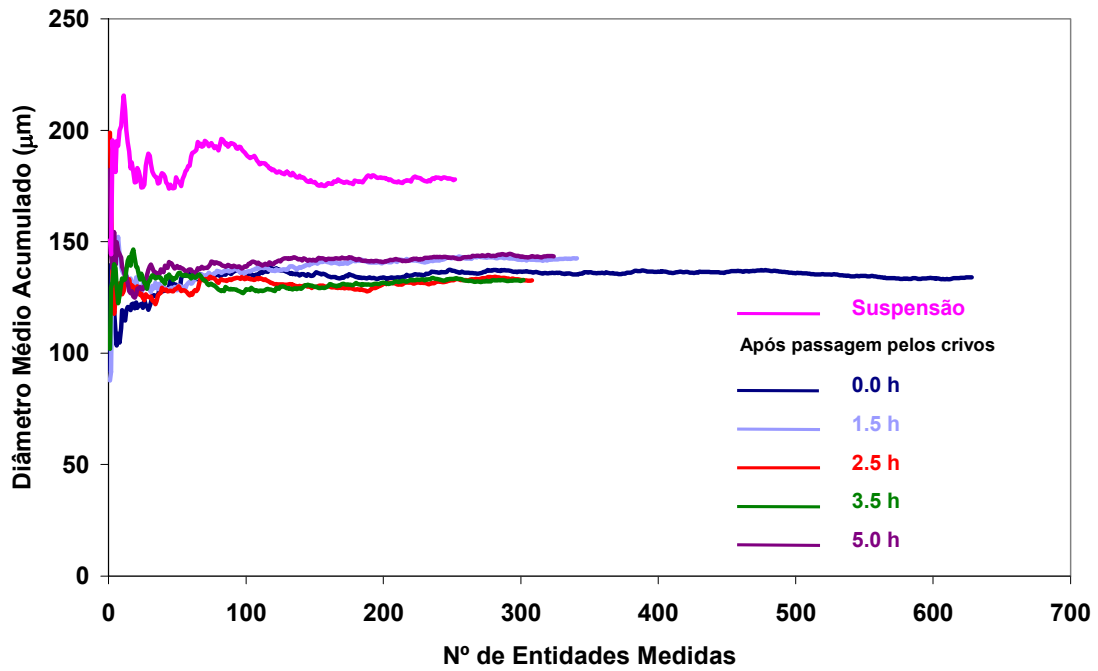


Figura 3.9. – Determinação do número mínimo de entidades a serem analisadas.

Fazendo o mesmo tipo de análise para uma suspensão sujeita ao sistema de jacto turbulento (figura 3.10.), observa-se igualmente que para haver validação estatística, o número de 250 entidades a analisar é suficiente.

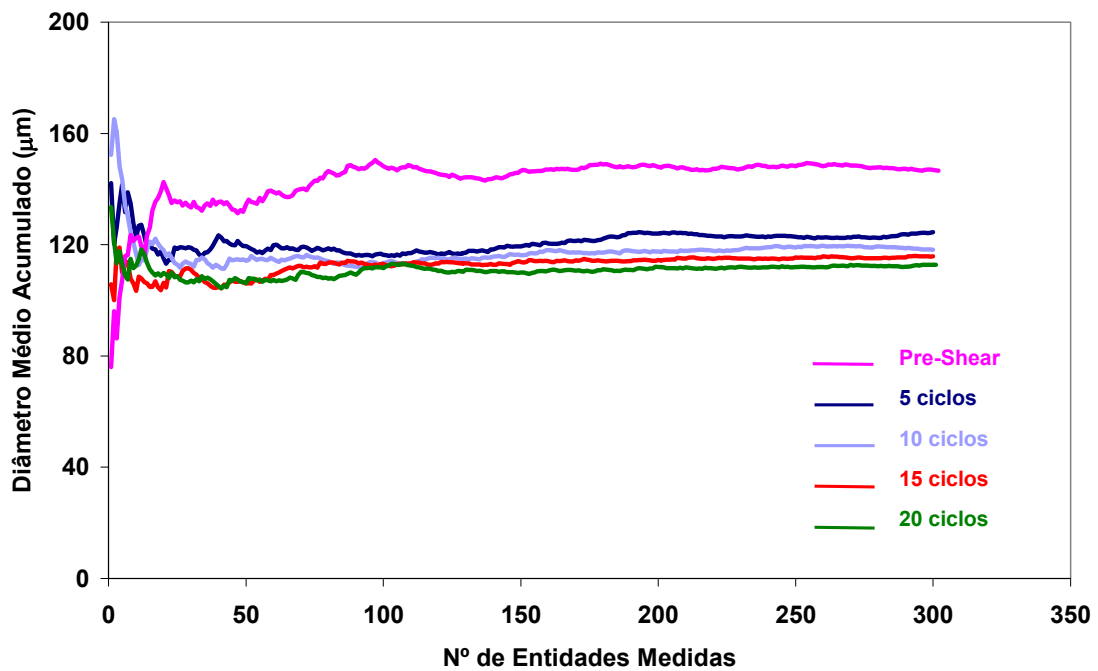


Figura 3.10. – Determinação do número de entidades a serem analisadas antes e após passagem no sistema de jacto turbulento.

### 3.4. CONCLUSÕES

Da execução deste trabalho podem-se tirar as seguintes conclusões:

1. As suspensões de células de *C. calcitrpa* quando sujeitas a condições intensas, bem definidas e de curta duração no sistema de fluxo turbulento, apresentam redução da viabilidade celular e degradação celular, acompanhada de uma redução da biomassa. A redução da viabilidade celular é descrita por um modelo de cinética de morte celular de 1ª ordem.
2. As distribuições do tamanho dos agregados são significativamente afectadas pela progressiva acção das forças de tensão. Os agregados de maiores dimensões são os preferencialmente quebrados com o aumento do tempo de exposição ao fluxo turbulento. A distribuição log-normal é um modelo adequado para descrever a variação do tamanho dos agregados de *C. calcitrpa*.
3. O diâmetro equivalente máximo,  $D_{99}$ , é usado para seguir as alterações das distribuições celulares obtidas, quando impostas condições de tensão, sendo um bom indicador dos danos celulares. O  $D_{99}$  diminui com o aumento das forças de tensão e com o tempo de exposição.
4. Os resultados obtidos pela análise digital de imagem e pelo FBRM são concordantes, sendo o FBRM uma técnica que num curto período de tempo permite a obtenção de uma elevada quantidade de dados, ao contrário da análise digital de imagem, pelo que é aconselhável utilizar o FBRM, sempre que disponível.

### 3.5. REFERÊNCIAS

- Ayazi-Shamlou, P., S. Stavrinides, N. Titchener-Hooker & M. Hoare (1994) Growth-independent breakage frequency of protein precipitates in turbulently agitated bioreactors. *Chem. Eng. Sci.*, **49**, 2647-2656.
- Bronnenmeier, R. & H. Markl (1982) Hydrodynamic stress capacity of microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 553-578.
- Cleere, M. (1995) The effect of process conditions on plant cell viability. *M. Eng. Sc. Thesis*. University College Dublin.
- Curtis, F. (1991) Shear stress effects on suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Ph.D. Thesis*. University College Dublin.
- Dowding, P.J., J.W. Goodwin & B. Vincent (2001) Factors governing emulsion droplet and solid particle size measurements performed using the focused beam reflectance technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **192**, 5-13.
- Dunlop, E.R. & P.K. Namdev (1994) Effect of fluid shear forces on plant cell suspensions. *Chem. Eng. Sci.*, **49**, 2263 - 2276.
- Gallagher, J.G. (1987) The effect of shear on suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *M. Eng. Sc. Thesis*. University College Dublin.
- Hiney, J.F. (1999) Plant cell breakage in a turbulent jet. *M. Eng. Sc. Thesis*. University College Dublin.
- Jeffers, P., P. Kieran, B. Glennon, S. Raposo & M. Lima-Costa (2001) Use of the Focused Beam Reflectance Method (FBRM) to characterize plant cell suspension cultures. – comunicação oral apresentada no *Biochemical Engineering Course*. Croácia, 8 -15 Setembro 2001.
- Jeffers, P., S. Raposo, M. Lima-Costa, P. Connolly, B. Glennon & P. Kieran (2003) FBRM monitoring of particle size and morphology in suspension cultures of *Morinda citrifolia* and *Centaurea calcitrapa*. *Biotechnol. Lett. In press*.
- Keßler, M. and S. Furusaki (1997) Unsuitability of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) as a viability assay for plant cells in suspension. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **30**, 718 - 723.
- Kieran, P. (1993) Investigation of the susceptibility of suspension cultures of *Morinda citrifolia* to hydrodynamic shear stress. *Ph. D. Thesis*. University College Dublin.
- Kieran, P., H. J. O'Donnell, D. Malone & P. F. MacLoughlin (1995) Fluid Shear effects on suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 415 - 425.
- Kieran, P., D. Malone & P. MacLoughlin (2000) Effects of Hydrodynamic and Interfacial Forces on Plant Cell Suspension Systems. *Ad. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **67**, 139-177.
- Leonard, T. (1995) Effects hydrodynamic shear stress on suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *M. Eng. Sc. Thesis*. University College Dublin.
- MacLoughlin, P.F., D. Malone, J. T. Murtagh & P. Kieran (1998) The effects of turbulent jet flows on plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **58**, 595 - 604.
- McDonald, K.A., A. P. Jackman & S. Hurst (2001) Characterization of plant suspension cultures using the focused beam reflectance technique. *Biotechnol. Lett.*, **23**, 317-324.
- Murtagh, J.T. (1994) The effects of hydrodynamic shear stress on suspension cultures of *Morinda citrifolia* using a submerged turbulent jet. *M. Eng. Sc. Thesis*. University College Dublin.

---

O'Donnell, H. (1992) Capillary shear effects on suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *M. Eng. Sc. Thesis*. University College Dublin.

Raposo, S. (1997) Proteinases aspárticas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*: produção, purificação e caracterização. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Richmond, W.R., Jones, R.L., Fawell, P.D. (1998) The relationship between particle aggregation and rheology in mixed silica-titania suspensions. *Chem. Eng. J.*, **71**, 67-75.

Ryan, M.J. (1997) The effect of hydrodynamic stress on plant cell cultures in turbulent flows. *M. Eng. Sc. Thesis*. University College Dublin.

## **CAPÍTULO 4**

# **CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS EM SISTEMA DE BAIXO STRESSE – BIORREACTOR DE MEMBRANA**

**RESUMO**

O desenvolvimento de novos tipos de reactores biológicos tem vindo a resolver o problema de sensibilidade ao stresse hidrodinâmico, que as culturas de células vegetais muitas vezes apresentam. Neste trabalho, estudou-se o comportamento das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em reactor biológico, em que a agitação e o arejamento são feitos por intermédio de uma membrana porosa. Verificou-se que culturas de células em suspensão crescidas neste biorreactor não apresentaram sinais de stresse hidrodinâmico. A viabilidade celular manteve-se elevada ao longo de todo o ciclo de crescimento e a produção de compostos fenólicos foi baixa.

Este tipo de biorreactor membranar apresentou-se promissor no cultivo de células vegetais sensíveis a condições de stresse, podendo ser considerado um sistema de baixo stresse hidrodinâmico.

**ABSTRACT**

The development of new types of biologic reactor has been able to solve the problems of susceptibility to hydrodynamic stress, which are very often observed in plant cell cultures. In this work, the behaviour of suspended *Centaurea calcitrapa* cells was studied in a biologic reactor where aeration and stirring are carried out through a porous membrane. It was observed that suspended cells grown in this reactor do not show signs of hydrodynamic stress. Cell viability was kept high in the whole course of the growth cycle, and the production of phenolic compounds was low.

This type of membrane reactor appears to be promising for the culture of stress-sensible plant cells, and can be considered a low hydrodynamic stress system.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

As culturas de células vegetais são muitas vezes sensíveis a condições de stresse quando cultivadas em biorreactores mecanicamente agitados. Meijer *et al.* (1993, 1994) apresentam alguns dos estudos efectuados sobre os efeitos que as forças de tensão hidrodinâmica têm no crescimento de células vegetais.

O desenvolvimento de novos tipos de biorreactores acompanhado do progresso da tecnologia membranar, veio dar origem aos biorreactores de membrana, possibilitando a obtenção de culturas de elevada densidade e elevadas produtividades (Chang & Furusaki, 1991). A introdução deste tipo de biorreactores veio resolver alguns dos problemas provocados pelo stresse hidrodinâmico assim como, a distribuição não homogénea da biomassa e a formação de espuma à superfície. A acumulação de biomassa na espuma, que se forma à superfície, e o crescimento celular nas paredes do biorreactor, poderão afectar todo o processo fermentativo, condicionando-o. De forma a resolver estes problemas, foi proposto um sistema em que a agitação se processa por meio de um sistema magnético envolvido por uma membrana, que promove a agitação e o arejamento por introdução de ar forçado. Este sistema foi desenvolvido para a cultura de células animais (Lehmann *et al.*, 1987), tendo sido bem sucedido para a cultura à escala laboratorial e piloto.

O sistema de arejamento consiste num agitador equipado com uma membrana de silicone com microporos, que promove a difusão de pequenas bolhas de ar para o meio celular. A agitação é magnética, por intermédio de um magneto na base do agitador. O arejamento por membrana e o sistema de agitação garantem a mistura homogénea da cultura. Sendo as células vegetais, de uma forma geral, sensíveis ao stresse hidrodinâmico gerado pela agitação e o arejamento existente no seio dos reactores, a utilização de baixa velocidade de agitação e o uso de um sistema de membranas para agitação e arejamento, mantêm mínimas as forças de tensão exercidas nas células.

Este tipo de biorreactor com agitação/arejamento membranar foi também usado para a cultura de células em suspensão de *Thalictrum rugosum* (Piehl *et al.*, 1988) e *Aesculus hippocastanum* (Böhme *et al.*, 1997).

Neste capítulo, trabalhou-se com este tipo de reactor de membrana em que a agitação é promovida por meio de arejamento forçado. Com este trabalho pretendeu-se estudar o crescimento da cultura de células vegetais de *Centaurea calcitrapa* num sistema de baixo stresse hidrodinâmico, em biorreactor com agitação/arejamento membranar e verificar se o sistema era adequado à produção de biomassa.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Manutenção das culturas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em Erlenmeyer

As células em cultura de *Centaurea calcitrapa* foram mantidas conforme descrito no capítulo 2, secção 2.2.1.

### 4.2.2. Condições de crescimento em biorreactor com agitação e arejamento por membrana

As culturas de *Centaurea calcitrapa* decorreram num biorreactor de 3 L (Biostat BF, B. Braun Biotech) equipado com o sistema de agitação/arejamento de membrana (figura 4.1.).

Utilizou-se uma membrana de silicone (B. Braun Biotech) com um comprimento de 440 cm e um diâmetro de 0,37 cm. Foi instalada no agitador, como se observa na figura 4.2., e fixada à tampa do vaso em ambas as extremidades. Esta membrana tem microporos com o diâmetro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Um magnete encontra-se integrado em baixo no agitador, promovendo a agitação por intermédio de uma placa de agitação magnética externa, situada por baixo do vaso, conforme se vê na figura 4.1.. A agitação da cultura é exercida por este sistema a baixas velocidades de agitação 30-60 rpm, garantindo uma boa mistura do meio celular a baixos níveis de stresse hidrodinâmico.

O ar introduzido no vaso para arejamento da cultura foi esterilizado pela passagem através de um filtro de membrana hidrofóbica, com porosidade 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore). O caudal de ar injectado no biorreactor, foi controlado por um fluxímetro. Os gases que saíram do biorreactor foram igualmente filtrados por uma membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore).

De forma a prevenir a adesão celular à membrana, esta foi enrolada ao eixo do agitador, deixando algum espaço entre as diferentes fiadas de membrana.

A concentração de oxigénio dissolvido foi medida por um eléctrodo  $\text{pO}_2$  (Ingold), ligado a uma unidade digital de controlo. O pH foi medido igualmente por uma unidade digital de controlo.

As culturas realizaram-se em sistema descontínuo. O biorreactor, contendo 1600 mL de meio de cultura SH (Shenk & Hildebrandt, 1972) foi inoculado com 400 mL de suspensão celular com 8 dias de subcultura.



**Figura 4.1.** - Biorreator de 3-L Biostat BF.



**Figura 4.2.** - Agitador com a membrana de silicone enrolada no eixo.

Após a estabilização das condições de temperatura, agitação e arejamento apropriadas ao crescimento celular, procedeu-se à recolha da amostra, correspondente ao tempo zero de

crescimento. As restantes amostras foram retiradas diariamente ou de 2 em 2 dias, de forma a permitir a obtenção do perfil de crescimento celular (peso fresco, peso seco, taxa específica de crescimento, produtividade de biomassa e rendimentos) e a caracterização do comportamento da produção dos produtos (protease e fenóis) em função do consumo dos nutrientes (fonte de carbono e fosfatos). Diariamente procedeu-se à determinação da taxa respiratória das células em cultura.

Os parâmetros de crescimento foram obtidos pelo cálculo da média aritmética dos resultados experimentais de cada amostra recolhida e análise do erro padrão.

Os resultados foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) e para valores de F significativos, realizou-se o teste de comparação múltipla de médias de Duncan, usando o software SPSS (Windows, Release 11.5.0).

#### 4.2.3. Determinação do $K_La$ pelo método do sulfito modificado

O coeficiente de transferência de massa de oxigénio -  $K_La$  - foi determinado segundo o método do sulfito modificado, descrito por Vilaça *et al.* (2000).

Este método baseia-se na reacção do  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , presente numa quantidade conhecida, com o oxigénio dissolvido no vaso do biorreactor, como no método clássico do sulfito (Cooper *et al.*, 1944). A reacção estequiométrica entre o sulfito de sódio e o oxigénio é:



No entanto, apresenta algumas vantagens em relação ao clássico, visto em termos dos procedimentos analíticos, não se realizar a titulação com iodo. É sabido que, embora o método do sulfito apresente valores mais elevados, em relação aos obtidos com o método dinâmico ou os balanços à corrente gasosa, este método é largamente usado na determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio em biorreactores (Linek *et al.*, 1990).

Procedimento:

Ao biorreactor de 3 L, contendo 2 L de meio de cultura SH, adicionou-se 0,0224 M de sulfato de cobre. Deixou-se este dissolver, ligando-se posteriormente o arejamento. A concentração de oxigénio dissolvido foi medida com um eléctrodo  $\text{pO}_2$  (Ingold). Registou-se o valor inicial de oxigénio dissolvido adicionando-se posteriormente os cristais de sulfito de sódio, na concentração de 0,056 M.

A quantidade de sulfito de sódio adicionado deve ser suficiente para manter a concentração de oxigénio dissolvido próximo de zero durante um largo período de tempo ( $\Delta t$ ). A taxa de

transferência de oxigénio (OTR) é calculada a partir de um balanço ao oxigénio molar (equação 4.2.). O coeficiente de absorção do oxigénio ( $k_v$ ) e o coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $k_La$ ) são determinados, respectivamente pelas equações 4.3. e 4.4..

$$\text{OTR} = \frac{0,5ns}{V\Delta t} \quad (4.2.)$$

$$k_v = \frac{\text{OTR}}{P^* - P} \quad (4.3.)$$

$$k_La = Hk_v \quad (4.4.)$$

Este ensaio foi realizado a 25°C, temperatura a que decorrem as fermentações.

Optimizou-se a quantidade de sulfito de sódio a adicionar, tendo em conta o período de tempo em que o oxigénio permanecia próximo de zero ( $\Delta t$ ). Variou-se a quantidade entre 0,056 M e 0,00099 M sulfito de sódio. Observou-se uma relação linear entre a quantidade de sulfito de sódio adicionado e o tempo ( $\Delta t$ ), como se pode ver na equação 4.5..

$$[\text{Na}_2\text{SO}_3] = 2.10^{-7} \cdot \Delta t + 0,0007 \quad (R^2 = 0,977) \quad (4.5.)$$

Foram determinados valores de  $K_La$  iniciais, para as condições de agitação de 30, 45, 60 e 100 rpm e arejamento 0,05, 0,10 e 0,25 vvm, utilizando meio de cultura SH.

#### **4.2.4. Determinação dos parâmetros de crescimento da cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa***

Os parâmetros de crescimento definidos para descrever o crescimento das células em cultura de *C. calcitrapa*, crescida em reactor biológico com agitação e arejamento por membrana, encontram-se descritos no capítulo 2, ponto 2.2.5..

#### **4.2.5. Determinação da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada pelo método da exclusão com corante, método descrito por Keßler *et al.* (1997), com o corante Evans Blue, conforme descrito no capítulo 2, ponto 2.2.7.1..

Com base nos valores de viabilidade celular relativa, determinou-se a taxa específica de morte celular, segundo o modelo de morte de primeira ordem, descrito no capítulo 3, ponto 3.3.1..

Os resultados de cada amostra, resultaram de 6 leituras, que foram sujeitos à análise de variância (ANOVA) e para valores de F significativos, realizou-se o teste de comparação múltipla de médias de Duncan, usando o software SPSS (Windows, Release 11.5.0).

#### **4.2.6. Caracterização reológica das células em cultura de *C. calcitrapa***

A caracterização reológica da suspensão de células de *C. calcitrapa*, crescida em reactor biológico com agitação e arejamento por membrana, foi efectuada conforme descrita no capítulo 2, ponto 2.2.10.. A caracterização reológica da cultura foi feita com base nas amostras recolhidas de 2 em 2 dias.

#### **4.2.7. Métodos analíticos**

Nas amostras recolhidas, ao longo do ciclo de crescimento, procedeu-se à separação do meio nutriente das células por filtração. Com o extracto celular determinou-se a actividade proteolítica e a proteína total, encontrando-se os métodos descritos no capítulo 2, ponto 2.2.8.. A actividade proteolítica específica é a actividade proteolítica a dividir pela proteína total da amostra.

Com o meio de cultura determinou-se o consumo da fonte de carbono (glucose) e fosfatos, assim como a formação de produtos secundários (fenóis). Os métodos, para cada análise, encontram-se descritos no capítulo 2, ponto 2.2.8..

#### **4.2.8. Determinação dos tempos de mistura**

Os tempos de mistura foram determinados segundo o método descrito por Menisher *et al.* (2000). Este método consiste na adição de 1,67 mL de uma solução indicador de fenolftaleína a 0,5% (p/v) em solução alcoólica e de 2,50 mL de hidróxido de sódio 1 M, ao vaso do biorreactor, contendo 2 L de água destilada. Sob condições básicas, a água toma uma coloração rosa. Convém deixar a agitar alguns minutos para que a coloração se torne homogénea por todo o vaso. Posteriormente, adiciona-se 2,91 mL de ácido clorídrico 1 M. A adição do ácido é extremamente importante porque deve ser um processo rápido e dar-se sempre no mesmo local. O tempo de mistura é o tempo que demora a desaparecer a cor de rosa da fenolftaleína, diluída no hidróxido de sódio, pela adição de uma quantidade fixa de excesso de ácido clorídrico.

Determinaram-se os tempos de mistura para os valores de agitação de 30, 60 e 100 rpm e de arejamento 0,05, 0,10 e 0,25 vvm.

Estes ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) e para valores de F significativos, realizou-se o teste de comparação múltipla de médias de Duncan, usando o software SPSS (Windows, Release 11.5.0).

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1. Transferência de massa e homogeneização da cultura

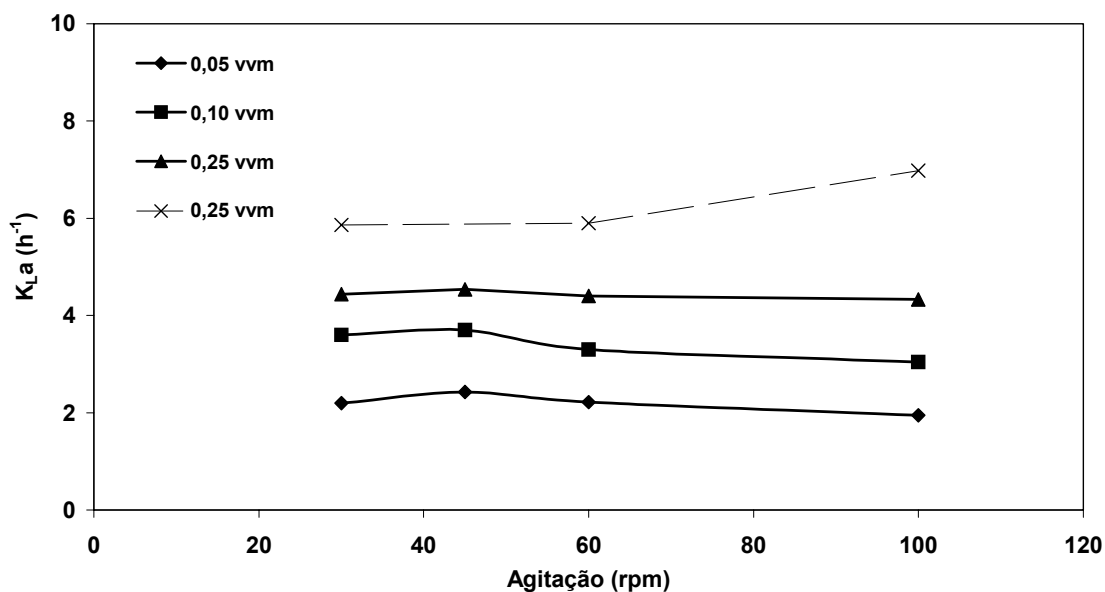
Os valores do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio-  $K_{La}$  - foram determinados pelo método do sulfito modificado (Vilaça *et al.*, 2000). A determinação dos valores de  $K_{La}$  processou-se, com o meio de cultura SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), na ausência de células, e para as diferentes condições operacionais de agitação e arejamento, definidas para o processo de crescimento das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em biorreactor de agitação e arejamento por membrana.

Na figura 4.3. são apresentados os valores de  $K_{La}$  determinados em biorreactor membranar para diferentes agitações e arejamento. Observa-se que os valores de  $K_{La}$  aumentam com o aumento do arejamento, ou seja, a capacidade de transferência de oxigénio aumenta com o aumento de oxigénio disponível no interior do vaso. Neste tipo de reactores biológicos, o arejamento tem uma forte influência na transferência de massa. Podemos também constatar que, a velocidade de agitação praticamente não influencia a transferência de massa de oxigénio para o meio, contrariamente ao que acontece nos reactores mecanicamente agitados.

Para o arejamento de 0,25 vvm (figura 4.3.), constata-se uma redução de aproximadamente 30%, entre o biorreactor utilizado neste trabalho e o mecanicamente agitado. De um modo geral, constata-se que os valores de  $K_{La}$  são inferiores aos obtidos para o biorreactor mecanicamente agitado (capítulo.2, ponto 2.3.2.1.), para agitação e arejamento similares. Verifica-se igualmente, uma certa tendência para os valores de  $K_{La}$ , nas agitações testadas, se manterem aproximadamente constantes, sugerindo que a capacidade de transferência de massa é inferior neste tipo de reactor biológico.

Böhme *et al.* (1997) determinaram também o  $K_{La}$  inicial, para este tipo de biorreactor, sendo os valores idênticos aos determinados neste trabalho.

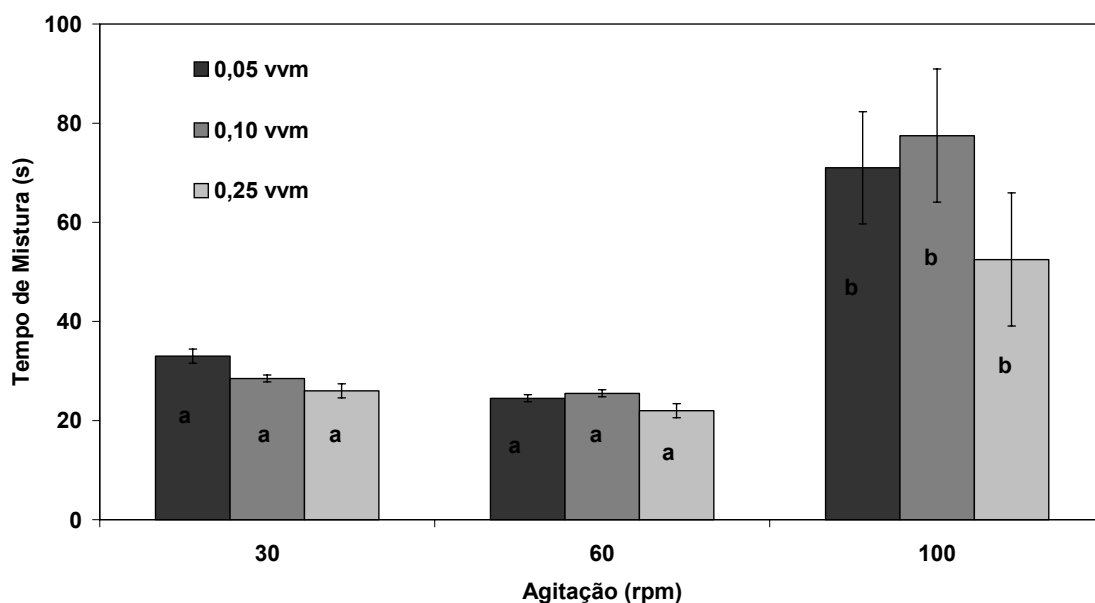
Outro aspecto a salientar é que, contrariamente ao que se passa com os sistemas mecanicamente agitados, os valores de  $K_{La}$  obtidos para 60 rpm são ligeiramente superiores aos obtidos para 100 rpm, para todos os caudais de arejamento testados. Esta questão deve-se ao facto de a agitação ser magnética, sendo esta mais eficiente a baixas rotações do que a elevadas, como é o caso dos 100 rpm, que é o limite máximo de velocidade de agitação neste equipamento. Por observação visual, verificou-se que o eixo de agitação a 60 rpm era mais abrangente no vaso, proporcionando uma melhor mistura e dispersão das microbolhas de ar, do que a 100 rpm. Embora a velocidade de agitação seja superior, o ângulo que o eixo de agitação faz com a parede do vaso é menor, comparativamente a 60 rpm.



**Figura 4.3.** – Valores de  $K_{La}$  determinados pelo método do sulfito modificado, para diferentes condições de agitação e arejamento, em reator biológico de agitação e arejamento por membrana (3 L), na ausência de células. A linha a tracejado representa os valores de  $K_{La}$  determinados para o reator biológico mecanicamente agitado de 2 L, com um arejamento de 0,25 vvm.

Estes resultados podem ser comprovados pela determinação dos tempos de mistura nas mesmas condições (figura 4.4.), usadas para determinação do  $K_{La}$ . Enquanto o coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio é um parâmetro que mede a capacidade de transferência de oxigénio no meio líquido, o tempo de mistura mede o grau de homogeneização do meio. Estes dois parâmetros podem ser relacionados porque quanto melhor for a dispersão das bolhas de ar no seio do líquido, maior é o grau de homogeneidade na cultura e conseqüentemente, melhor é a transferência de oxigénio no seio da cultura.

Da análise da figura 4.4., verifica-se que 30 e 60 rpm são as velocidades de agitação que apresentam menores tempos de mistura. Para os três caudais de arejamento testados, 100 rpm é a velocidade que apresenta valores mais elevados para os tempos de mistura. Este facto vem a corroborar o resultado anterior, em que devido a uma deficiente agitação, a homogeneidade da cultura é igualmente deficiente e conseqüentemente, a dispersão das bolhas de ar não é eficiente, sendo a transferência de massa de oxigénio baixa. Assim, os valores de  $K_{La}$  obtidos nestas condições são baixos.



**Figura 4.4.** – Tempos de mistura determinados no biorreactor com agitação e arejamento por membrana. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , letras diferentes para cada caudal de arejamento representam médias significativamente diferentes).

Pela observação dos resultados obtidos para este tipo de reactor de membrana, tanto dos valores de  $K_L a$  como dos tempos de mistura pode-se concluir que a agitação mais eficiente, de forma a se obter uma mistura homogénea, é entre 30 e 60 rpm. Assim, o estudo do crescimento celular da suspensão de *C. calcitrpa* neste tipo de reactor membranar, foi limitado a estes valores de agitação.

#### 4.3.2. Crescimento das células em suspensão de *C. calcitrpa* em reactor biológico com agitação e arejamento por membrana

##### 4.3.2.1. Parâmetros cinéticos do crescimento e produção de metabolitos

O objectivo deste estudo foi analisar a influência deste tipo de biorreactor no crescimento das células em cultura de *C. calcitrpa*. Os ensaios de crescimento das células em suspensão neste biorreactor membranar, decorreram a diferentes valores de  $K_L a$ .

Os principais parâmetros de crescimento das células de *C. calcitrpa*, referentes às diferentes condições de agitação/arejamento, em função do coeficiente volumétrico de transferência de massa são apresentados na tabela 4.1..

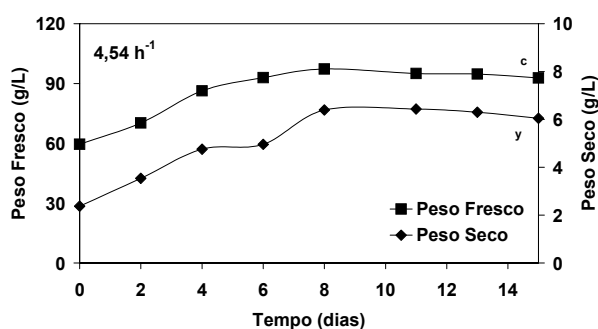
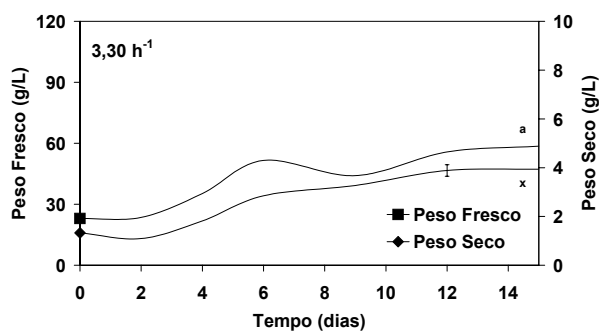
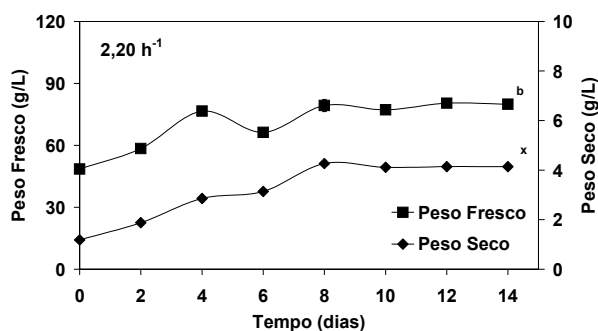
**Tabela 4.1.** Parâmetros de crescimento da cultura de células em suspensão de *C. calcitrapa* em biorreactor com sistema de agitação/arejamento de membrana, a diferentes valores de  $K_{La}$  inicial.

$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	AGIT./AREJ. (rpm/vvm)	$\mu_g$ ( $dia^{-1}$ )	PRODUTIV. BIOMASSA (g PS/L.dia)	$Y_{x/s}$ (g PS/g gluc)	$TR_{m\acute{a}x}$ ( $\mu mole O_2/L.min$ )	VISCOSIDADE APARENTE ( $Ns/m^2$ )	$PS_{M\acute{A}X}$ (g/L)
2,20	30/0,05	0,156	0,374	0,350	3,32	23,47E-3	4,27
3,30	60/0,10	0,120	0,263	0,290	3,70	20,91E-3	4,06
4,54	45/0,25	0,172	0,469	0,153	7,09	29,01E-3	6,43

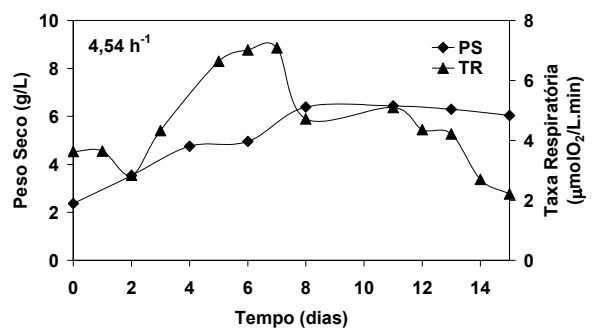
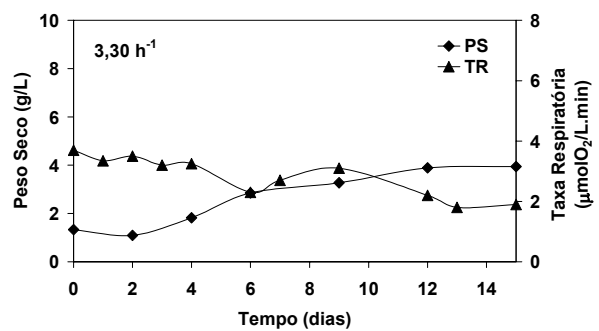
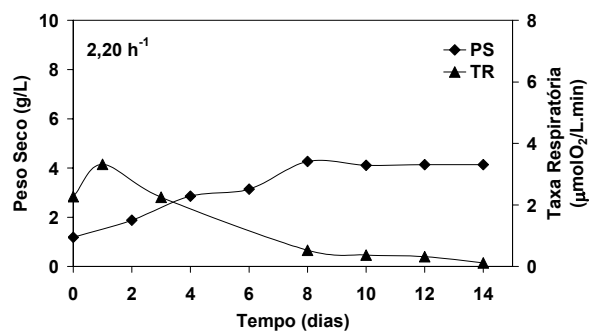
Com base nos resultados apresentados na tabela 4.1., a cultura que decorreu a um  $K_{La}$  de  $4,54 h^{-1}$  foi a que proporcionou melhores condições para a produção de biomassa de *C. calcitrapa*. É a cultura que apresenta o valor de taxa específica de crescimento e produtividade de biomassa mais elevados, comparativamente com as restantes culturas. No entanto, o rendimento de biomassa em função do substrato consumido é baixo, ou seja, a biomassa produzida por unidade de substrato consumido é diminuta. Este baixo valor do rendimento poderá ser devido a uma deficiente transferência de massa, limitando o acesso da glucose às células.

Na figura 4.5. são apresentados os perfis de crescimento para os diferentes valores de  $K_{La}$  testados. Os perfis de crescimento a diferentes  $K_{La}$  são significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ). A fermentação que decorreu a um  $K_{La}$  inicial de  $4,54 h^{-1}$  apresentou uma fase exponencial nítida, com a duração de 6 dias, não se observando nenhuma fase de latência, no início da fermentação. Observaram-se valores baixos de biomassa formada para as culturas que decorreram a  $2,20 h^{-1}$  e  $3,30 h^{-1}$  (tabela 4.1.). Este facto poderá ser devido aos baixos valores das taxas respiratórias registados (figura 4.6.), que por sua vez, podem ser atribuídos a uma deficiente transferência de oxigénio. Como se pode ver na tabela 4.1., os valores das taxas respiratórias máximas são baixos, comparativamente com a cultura que decorreu a  $4,54 h^{-1}$ . Analisando graficamente (figura 4.6.) a evolução deste parâmetro, ao longo do ciclo de crescimento, verificamos que apenas na cultura que decorreu a um  $K_{La}$  de  $4,54 h^{-1}$  houve aumento da taxa respiratória ao longo da fase exponencial. Tanto a cultura com um  $K_{La}$  inicial de  $2,20 h^{-1}$  como a  $3,30 h^{-1}$ , sofreram diminuição da taxa respiratória ao longo do ciclo de crescimento (figura 4.6.). O que pode ser atribuído a uma deficiente transferência de massa, provocando limitações de  $O_2$  dissolvido e de outro substrato, no seio da cultura. As culturas que decorreram a  $K_{La}$  mais baixos, as células entraram em limitação de oxigénio, atingindo valores menores que 10% de  $O_2$  dissolvido, por volta do 2º dia de cultura, praticamente no início da fase exponencial do crescimento. As células de

*C. calcitrapa* não tiveram oxigénio disponível durante a fase activa do seu crescimento. Apenas a cultura que decorreu a  $4,54 \text{ h}^{-1}$ , não sofreu limitações no  $\text{O}_2$  dissolvido durante o ciclo de crescimento.



**Figura 4.5.** - Crescimento em reactor biológico com agitação/arejamento por membrana, da suspensão de *Centaurea calcitrapa* para os diferentes valores de  $K_L a$  testados. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , perfis de Peso Fresco (a, b, c) e Peso Seco (x, y, z) com letras diferentes representam curvas médias significativamente diferentes).



**Figura 4.6.** – Taxas respiratórias das células de *C. calcitrapa*, crescidas em reactor biológico membranar, a diferentes  $K_L a$ .

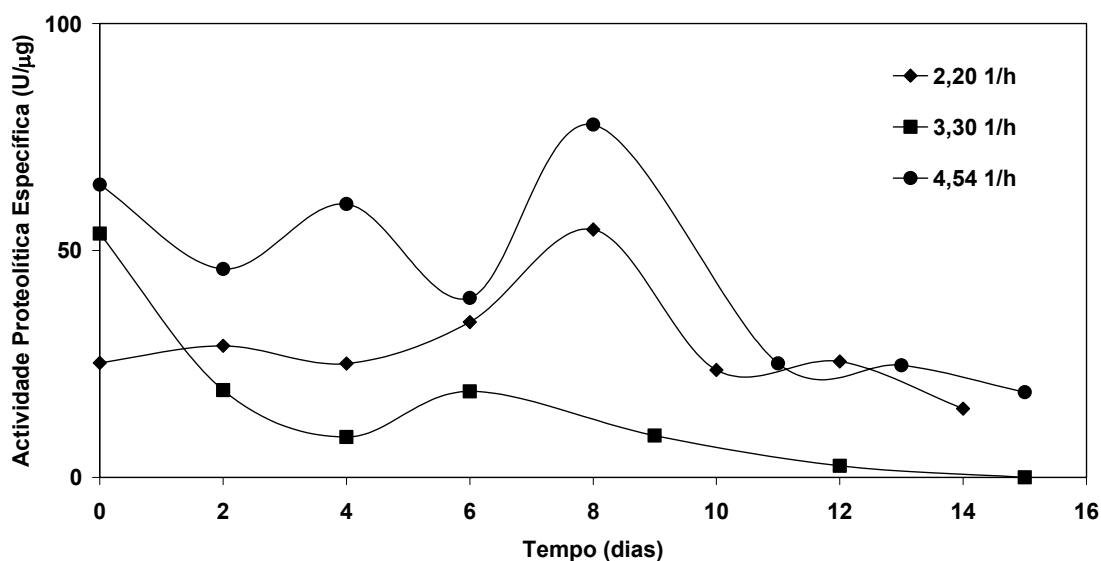
É de realçar contudo que a forma de enrolamento do sistema membranar pode influenciar a capacidade de transferência de massa. Ao enrolar a membrana no eixo, foi deixado um espaçamento entre as diferentes fiadas, de forma a evitar a colmatção destas. Quando a membrana era enrolada no eixo e não se deixava espaço entre as diferentes fiadas, as células aderiam à membrana, colmatando-a. Este fenómeno dificultou a transferência de massa de oxigénio para o seio da cultura, provocando limitações no bom desenvolvimento destas. A biomassa formada era extremamente baixa. Assim, de molde a contornar esta limitação, deixou-se um espaçamento entre as diferentes fiadas, como se pode observar na figura 4.2.

Böhme *et al.* (1997) utilizaram este tipo de biorreactor para crescer células em suspensão de *Aesculus hippocastanum*. Estes autores verificaram que o sistema de enrolamento da membrana original, como utilizada neste trabalho, colmatava. Assim, desenvolveram um sistema para culturas de células vegetais, em que a membrana é enrolada em 2 anéis. Verificaram que este novo tipo de enrolamento aumentava o coeficiente volumétrico de massa de oxigénio em 42 % relativamente ao sistema original.

Um dos grandes interesses na produção das células em cultura de *C. calcitrapa*, é a produção de enzimas com actividade proteolítica, que coagulam o leite. Esta actividade enzimática foi avaliada como indicador metabólico do estágio em que a cultura se encontra, neste tipo de biorreactor (figura 4.7.). Assim, após extracção intracelular, procedeu-se à quantificação das proteases, para as diferentes culturas. As culturas que decorreram a  $K_La$  2,20 h<sup>-1</sup> e a  $K_La$  4,54 h<sup>-1</sup> apresentaram um pico de actividade específica ao 8º dia de cultura, durante a fase estacionária do crescimento. No entanto, os valores de actividade proteolítica específica da cultura 4,54 h<sup>-1</sup> são superiores.

No capítulo 2, desta dissertação, estudos com a cultura de *C. calcitrapa*, quer em biorreactor quer em erlenmeyer, também mostraram que o máximo de actividade proteolítica era atingido no final da fase exponencial, início da estacionária. O que está de acordo com as células em suspensão de *Cynara cardunculus*, outro cardo usado na produção de queijo, que também apresentam um máximo de actividade proteolítica no fim da fase exponencial de crescimento (Lima-Costa, 1994).

A cultura a  $K_La$  inicial de 3,30 h<sup>-1</sup> não apresentou boas condições para a produção de enzimas com actividade proteolítica, possivelmente devido à deficiente transferência de massa, como já foi referido anteriormente. A cultura que apresentou melhores condições para a produção de enzimas coagulantes foi a que decorreu a um  $K_La$  inicial de 4,54 h<sup>-1</sup> (figura 4.7.).

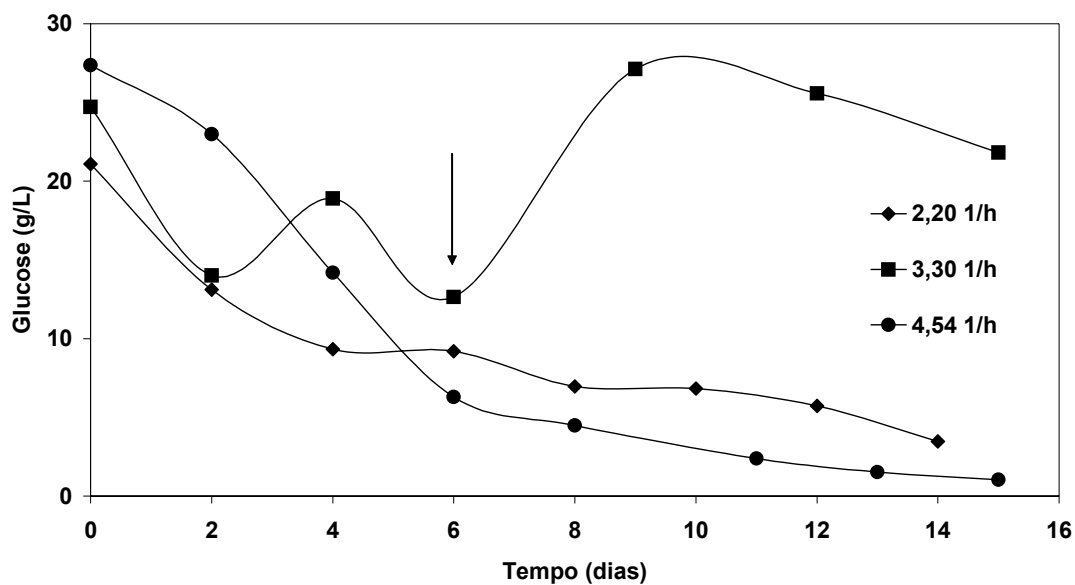


**Figura 4.7.** – Actividade proteolítica específica, ao longo do ciclo de crescimento, das células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em biorreactor de membrana, a diferentes  $K_L a$ .

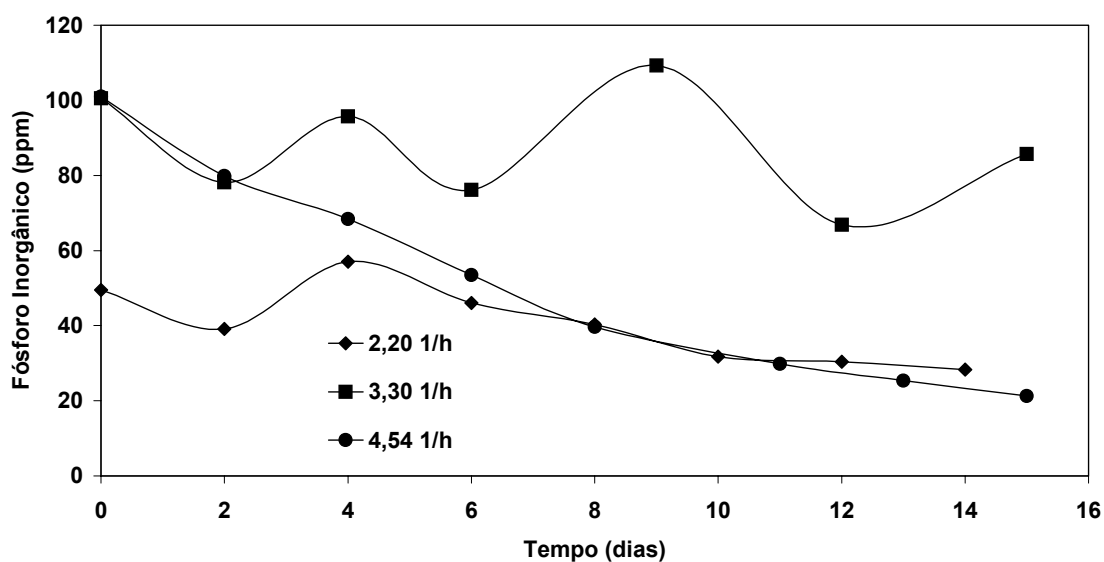
Um outro indicador metabólico para estimar o estágio da cultura é o consumo de nutrientes essenciais no meio de cultura, como sendo a fonte de carbono (figura 4.8.) e os fosfatos (figura 4.9.), observa-se que não houve limitação destes, apenas na cultura que decorreu a um  $K_L a$  de  $4,54 \text{ h}^{-1}$  há esgotamento da glucose, a partir do 13º dia de cultura. Os resultados levam a supor que, as culturas que decorreram a  $2,20$  e  $3,30 \text{ h}^{-1}$  estiveram sujeitas a uma deficiente transferência de massa, limitando o desenvolvimento da cultura, através de menor acessibilidade dos nutrientes às células. Em termos de homogeneidade da cultura, a que decorreu com um  $K_L a$  de  $2,20$  e  $3,30 \text{ h}^{-1}$ , apresentaram tempos de mistura similares,  $P \geq 0,05$  (figura 4.4.). Os valores de viscosidade aparente máxima são concordantes com os da biomassa máxima, para as diferentes culturas. A cultura com o  $K_L a$  inicial de  $4,54 \text{ h}^{-1}$  apresentou valor mais elevado da viscosidade aparente máxima (tabela 4.1.).

A cultura que decorreu com um coeficiente volumétrico de transferência de massa de  $3,3 \text{ h}^{-1}$ , manteve ao longo de todo o processo uma concentração de glucose elevada, visto ao 6º dia de cultura ter sido adicionada meio nutriente com glucose ( $20 \text{ g/L}$ ). O objectivo desta adição de glucose foi o de prolongar a fase exponencial, de forma a aumentar a biomassa produzida. No entanto, a fase activa de crescimento celular terminou por volta do 8º dia de cultura. Como já foi referido anteriormente, julga-se que a fraca transferência de massa no meio tenha sido preponderante no desenvolvimento da cultura, dificultando o acesso dos nutrientes às células. O mesmo se verificando com o consumo do fósforo inorgânico, em

que concentração deste nutriente manteve-se elevada, ao longo de todo o ciclo de crescimento, não havendo esgotamento (figura 4.9.).



**Figura 4.8.** - Consumo da fonte de carbono (glucose), ao longo do perfil de crescimento, nas culturas de *C. calcitraba*, cultivadas em biorreactor de membrana, a diferentes  $K_La$ . A seta, ao 6º dia de cultivo, na cultura com  $K_La$  3,30  $h^{-1}$ , indica adição de glucose (20 g/L). Valores médios ( $n=3$ ).



**Figura 4.9.** - Consumo do fósforo inorgânico, longo do ciclo de crescimento, das células em suspensão de *C. calcitraba*, cultivadas em reactor biológico de membrana, para diferentes  $K_La$ . Valores médios ( $n=3$ ).

Böhme *et al.* (1997) com células em suspensão de *Aesculus hippocastanum*, cultivadas neste tipo de reactor, constataram não haver limitação nutricional, apenas a transferência de oxigénio era o passo limitativo da fermentação.

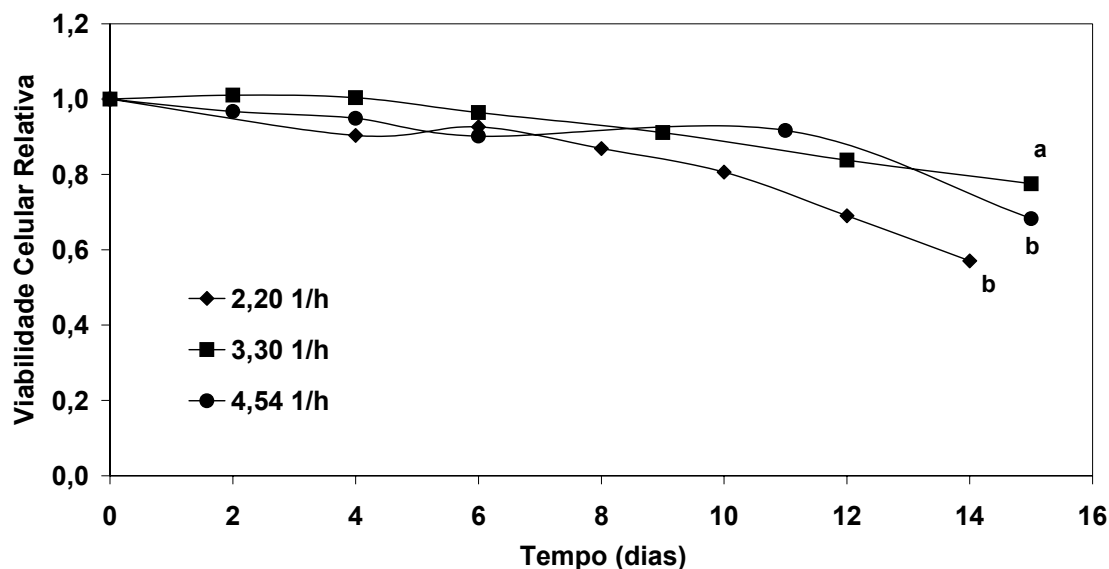
Com base nos resultados apresentados neste trabalho, a cultura que reuniu as melhores condições para produção de biomassa no biorreactor com arejamento através de um sistema membranar, foi a que decorreu a um  $K_L a$  inicial de  $4,54 \text{ h}^{-1}$ . Embora ainda sejam necessários fazer mais estudos de optimização das condições de crescimento celular, este tipo de biorreactor foi usado na perspectiva de minimizar o stresse hidrodinâmico nas culturas de células vegetais em reactores biológicos compatibilizando-o com elevadas produtividades.

#### 4.3.2.2. Stresse hidrodinâmico em biorreactores de membrana

Tal como foi referido no capítulo 2 (2.3.2.3.3.), a resposta de um sistema biológico a um stresse imposto depende das características fisiológicas do sistema, assim como da natureza, intensidade e duração das condições de stresse, reflectindo-se essa resposta de diversas formas. De entre as possíveis respostas, destaca-se a libertação de compostos intracelulares, como sendo os fenóis (Wongsamuth & Doran, 1997) e a diminuição da viabilidade celular (Takeda *et al.*, 1994, Kieran *et al.*, 1997).

É sabido que os reactores mecanicamente agitados promovem o stresse hidrodinâmico nas culturas de células vegetais (Meijer *et al.*, 1993). Neste trabalho, foi usado um tipo de reactor biológico cuja principal característica é provocar baixo stresse hidrodinâmico nas culturas de células vegetais. A agitação e o arejamento são promovidos por uma membrana de silicone, que se encontra enrolada a um eixo. Neste caso, a agressividade da agitação mecânica é minimizada por este sistema membranar. A confirmar que as células de *C. calcitrapa* não se encontram expostas a condições adversas, são apresentados os valores das viabilidades celulares, para as diferentes culturas (figura 4.10.) e os valores das taxas específicas de morte, determinadas com base nos valores da viabilidade celular relativa (tabela 4.2.).

Analisando a figura 4.10., constatamos que a viabilidade celular das células em cultura de *C. calcitrapa*, crescidas em reactor biológico membranar, se mantém elevada, praticamente ao longo de todo o ciclo de crescimento. Apenas a cultura que decorreu a um  $K_L a$  de  $2,20 \text{ h}^{-1}$  apresentou uma diminuição na viabilidade celular, atingindo o valor de 60 % no final do ciclo de crescimento. Nesta cultura, ao 8º dia do ciclo de crescimento, fim da fase exponencial, a redução na viabilidade começa a ser mais pronunciada. Nas restantes culturas a viabilidade celular mantém-se relativamente elevada no final do ciclo de crescimento.



**Figura 4.10.** - Viabilidade celular relativa, ao longo do perfil de crescimento, das células em suspensão de *C. calcitraba*, cultivadas em biorreactor de membrana a diferentes  $K_La$ . Valores médios, erro padrão inferior a 5% ( $n=6$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , letras diferentes representam médias significativamente diferentes).

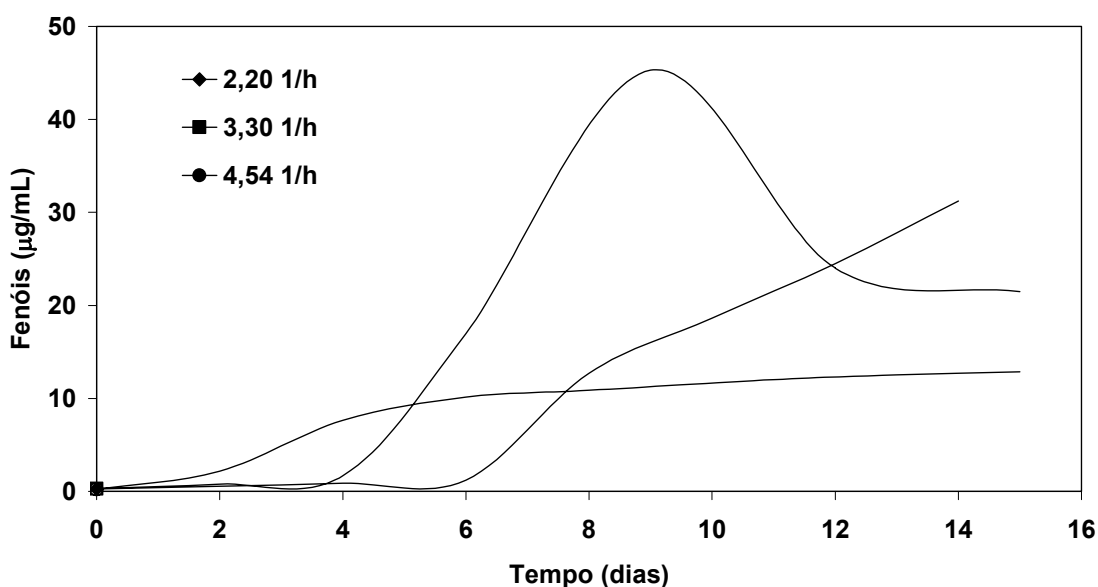
**Tabela 4.2.** – Valores da viabilidade celular, taxas específicas de morte celular e acumulação de fenóis máxima das células em suspensão de *C. calcitraba*, cultivadas em reactor biológico de membrana a diferentes  $K_La$ .

$K_LA$ ( $h^{-1}$ )	VARIAÇÃO DA VIABILIDADE RELATIVA	$K_D$ ( $dia^{-1}$ )	FENÓIS <sub>MÁX</sub> ( $\mu g/mL$ )
2,20	1,00 – 0,57	0,040	31,22
3,30	1,00 – 0,78	0,017	45,30
4,54	1,00 – 0,68	0,026	12,86

Comparativamente com os crescimentos efectuados em reactor biológico mecanicamente agitado, para o mesmo tempo de cultura, a viabilidade das células de *C. calcitraba*, crescidas neste sistema membranar, é superior. Contrariamente ao que se verifica no biorreactor mecanicamente agitado (capítulo 2, figura 2.38.), neste sistema apenas se observa diminuição da viabilidade celular já na fase estacionária do crescimento, podendo esta ser uma das importantes vantagens deste reactor biológico.

Comparando ainda, com os valores das taxas específicas de morte, determinados quando as células em suspensão de *C. calcitrpa* foram sujeitas ao sistema de jacto turbulento (tabela 3.3.), os valores deste parâmetro determinados neste sistema (tabela 4.2) são significativamente inferiores, o que pressupõe que o stresse hidrodinâmico imposto às culturas é reduzido.

A análise do perfil de acumulação dos fenóis para as diferentes culturas, é apresentado na figura 4.11.. A cultura que decorreu a um  $K_La$  de  $4,54 \text{ h}^{-1}$  apresentou, ao longo de toda a cultura, uma produção de compostos fenólicos inferior a  $20 \text{ }\mu\text{g/mL}$ . Concentração esta bastante inferior às obtidas nas culturas desenvolvidas em reactor mecanicamente agitado (capítulo 2, figura 2.37.). Em biorreactor mecanicamente agitado atingiram-se concentrações de  $120 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , nas condições de crescimento mais adversas. Nas condições em que o crescimento celular foi favorecido, a concentração de compostos fenólicos atingiu praticamente o valor de  $80 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , no final da fase exponencial e início da estacionária.



**Figura 4.11.** – Produção de fenóis ao longo do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrpa*, cultivadas em reactor biológico membranar, a diferentes  $K_La$ . Valores médios ( $n=3$ ), erro padrão inferior a 5%.

A cultura que decorreu a  $3,30 \text{ h}^{-1}$  apresenta a formação de um pico de compostos fenólicos ( $45 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ), ao nono dia de cultura, seguida de uma diminuição até valores próximos de  $20 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , ao 12º dia. Este aumento brusco na concentração de fenóis dá-se no final da fase exponencial e início da estacionária. Segundo Hooker *et al.* (1989), as culturas no final da fase exponencial e início da fase estacionária encontram-se mais susceptíveis aos danos

provocados pelas diferentes forças de tensão, do que as culturas na fase de adaptação e início da exponencial ou mesmo no final da fase estacionária. Este facto, é devido à expansão do volume celular e ao crescimento, que provoca a diminuição da elasticidade da parede celular e o aumento da permeabilização das células. Igualmente, segundo estes autores, a produção de fenóis tende a diminuir após o máximo da concentração ter sido atingida.

Um aumento na concentração de fenóis é um sinal de que as células se encontram em stresse no seu ambiente (Hooker *et al.*, 1989). A diminuição da viabilidade celular traduz igualmente, uma resposta de que a suspensão celular se encontra exposta a condições de stresse. Os resultados obtidos sugerem que este tipo de biorreactor, em que a agitação e o arejamento são realizados através de uma membrana ligada a um eixo, minimiza o stresse hidrodinâmico nas culturas de células em suspensão de *C. calcitrapa*.

#### **4.3.3. Caracterização reológica da cultura de *C. calcitrapa***

As células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em reactor biológico com agitação e arejamento por membrana, foram igualmente caracterizadas em termos reológicos. Construíram-se reogramas para diferentes concentrações de biomassa, das suspensões crescidas em biorreactor. Os valores da velocidade de corte e da tensão de corte, determinados pela leitura no viscosímetro, foram ajustados ao modelo Ostwald-de Waele (Lei da Potência). Pelo ajuste verificou-se que as células em suspensão de *C. calcitrapa*, desenvolvidas em reactor biológico de membrana, apresentaram também um comportamento pseudoplástico (figura 4.12.), como referido anteriormente. A tensão de corte aumentou com a velocidade de corte a que as células em suspensão foram sujeitas, não se registando qualquer tensão inicial, quando a velocidade de corte era nula. Também, para as diferentes concentrações de biomassa, a viscosidade aparente diminuiu com o aumento da velocidade de corte (figura 4.13.).

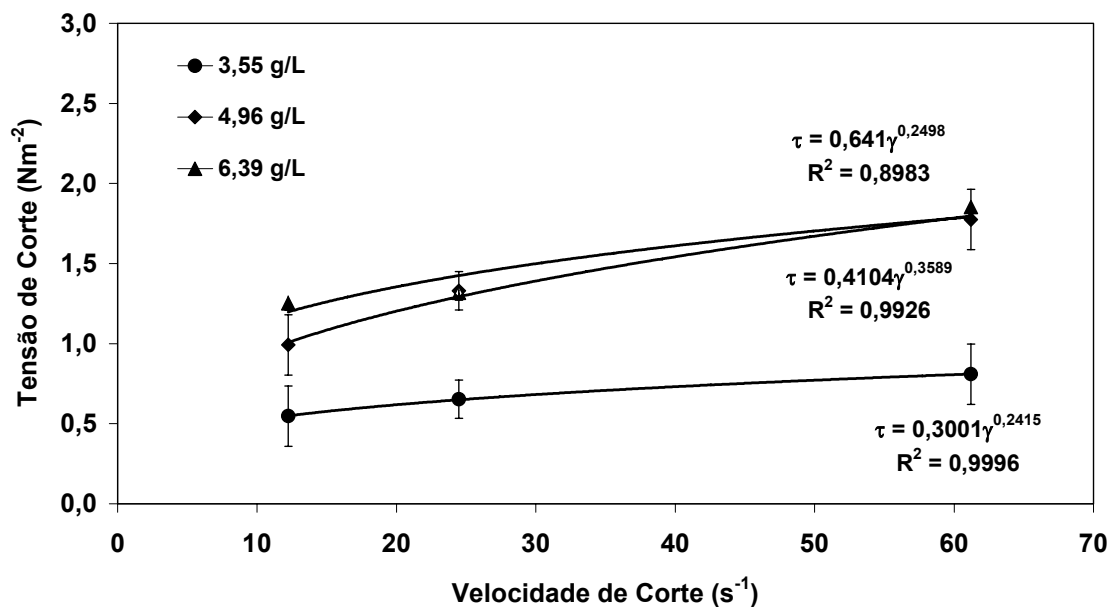


Figura 4.12. – Reograma das células em suspensão de *C. calcitrpa*, cultivadas em biorreactor de membrana, para diferentes concentrações de biomassa. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

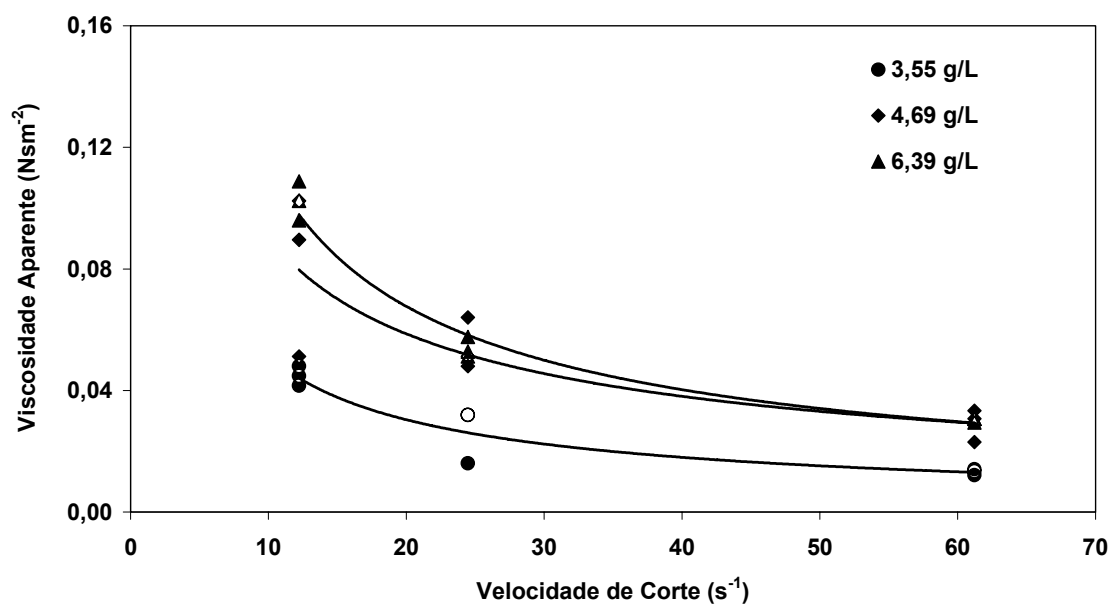


Figura 4.13. – Variação da viscosidade aparente em função da velocidade de corte, para diferentes concentrações de biomassa, das células de *C. calcitrpa* crescidas em biorreactor membranar ( $n=3$ ).

O índice de comportamento do fluido,  $n$ , variou entre 0,36 e 0,10, ao longo da cultura. Por outro lado, o índice de consistência,  $K$ , aumentou de 1,83 até 3,87  $\text{Ns}^n\text{m}^{-2}$ , com o aumento de biomassa. Nas culturas cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado, o  $n$

variou entre 0,65 e 0,43, enquanto que o  $K$  variou entre 0,07 e 1,81  $\text{Ns}^n\text{m}^{-2}$ . Através da análise dos valores de  $n$ , verifica-se que o carácter pseudoplástico foi mais acentuado nas células cultivadas no reactor biológico, em que a agitação e o arejamento é feita por um sistema membranar. Este facto, é habitualmente atribuído ao aumento da concentração de biomassa (Zhong *et al.*, 1992; Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999). Neste caso, essa não poderá ser a razão, visto a concentração de biomassa das células em suspensão, cultivadas em biorreactor membranar apresentarem valores de viscosidade aparente menores do que os obtidos em reactor biológico mecanicamente agitado. Em biorreactor mecanicamente agitado, os valores de viscosidade aparente variam entre 0,01 e 0,07  $\text{Nsm}^{-2}$ , neste sistema membranar variam entre 0,01 e 0,025  $\text{Nsm}^{-2}$ . Esta questão poderá estar relacionada com as características morfológicas da cultura, sendo esta uma hipótese apoiada por alguns autores (Kieran *et al.*, 1997; Trejo-Tapia *et al.*, 2001).

Tal como foi referido no capítulo 2 (2.3.2.3.4.), grande parte das suspensões celulares vegetais apresentam um comportamento não-Newtoniano, sendo igualmente grande parte delas pseudoplásticas (Jolicouer *et al.*, 1992; Curtis & Emery, 1993; Kieran, 1993; Sanchez *et al.*, 2002).

#### 4.4. CONCLUSÕES

A cultura de células de *Centaurea calcitrapa* foi estabelecida em reactor biológico, em que a agitação e o arejamento são feitos por intermédio de uma membrana porosa. Deste trabalho pode-se concluir que:

1. A transferência de oxigénio aumenta com o arejamento mas é praticamente independente da agitação magnética.
2. As taxas específicas de crescimento das culturas desenvolvidas neste sistema membranar são idênticas às obtidas em reactor biológico mecanicamente agitado, para idênticos  $K_L a$ .
3. A viabilidade das células, cultivadas neste sistema, manteve-se elevada ao longo do ciclo de crescimento, diminuindo apenas ligeiramente na fase estacionária e, a acumulação de compostos fenólicos foi baixa, pelo que se considera que este biorreactor é favorável ao crescimento de linhas celulares sensíveis às forças de tensão. Contudo, esta membrana apresentou algumas limitações na transferência de oxigénio.
4. As taxas específicas de morte são baixas comparativamente com as obtidas noutros sistemas sendo a cinética de morte celular de 1ª ordem.

A principal conclusão que poderá ser tirada deste estudo, é que este tipo de biorreactor pode ser considerado um sistema de baixo stresse hidrodinâmico, podendo ser uma boa alternativa para a cultura de células vegetais, sensíveis às condições de stresse hidrodinâmico. Contudo, é ainda necessário realizar mais ensaios com novos tipos de membranas com a finalidade de diminuir as limitações de oxigénio.

## 4.5. REFERÊNCIAS

- Böhme C, M.-B. Schröder & H. Jung-Heiliger (1997) Plant cell suspension culture in a bench-scale fermenter with a newly designed membrane stirrer for bubble-free aeration. *App. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 149–154.
- Chang, H. N. & S. Furusaki (1991) Membrane bioreactor: present and prospects. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **44**: 27 – 64.
- Cooper CM, G. A. Fernstrom & A. S. Miller (1944) Performance of agitated gas-liquid contactors. *Ind. Eng. Chem.* **36** (6): 504-509.
- Curtis, W. R. & A. H. Emery (1993) Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 520 – 525.
- Hooker, B. S., J. M. Lee & G. An (1989) Response of plant tissue culture to a high shear environment. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 484-490.
- Jolicoeur, M., C. Chavarie, P. J. Carreau & J. Archambault (1992) Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 511 - 521.
- Keßler, M., Ø. Bye & S. Furusaki (1997) Loss of viability correlates with altered acid phosphatase activity in suspended strawberry cell fractions after excessive agitation. *Biotechnol. Lett.* **19**: 545 - 548.
- Kieran, P. (1993) An investigation of the hydrodynamic shear susceptibility of the suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Ph. D. Thesis. Department of Chemical Engineering. Faculty of Engineering and Architecture. University College Dublin.
- Kieran, P., P. MacLoughlin & D. Malone (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J. Biotechnol.* **59**: 39 - 52.
- Lehman J, G. W. Piehl & R. Schulz (1987) Bubble free cell culture aeration with porous moving membrane. *Dev. Biol. Stand.* **66**: 227–240.
- Lima-Costa, M. E. (1994) Cinética do crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* em reactores biológicos. Ph. D. Thesis. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Linek, V., P. Beneš & J. Sinkule (1990) Critical assessment of the steady-state Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> feeding method for K<sub>L</sub>a measurement in fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 766-770.
- Meijer, J. J., H. J. ten Hoopen, K. C. Luyben & K. R. Libbenga (1993) Effects of hydrodynamics stress on cultured plant cells: a literature survey. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 234 – 238.
- Meijer, J. J., H. J. ten Hoopen, Y. M. van Gameren, K. C. Luyben & K. R. Libbenga (1994) Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 467 – 477.
- Menisher, T., M. Metghalchi & E. B. Gutoff (2000) Mixing studies in bioreactors. *Bioproc. Eng.* **22**: 115-120.
- Piehl, G. W. , J. Berlin, C. Mollenschott & J. Lehmann (1988) Growth and alkaloid production of *Thalictrum rugosum* in shake flasks and membrane-stirrer reactors with bubble free aeration. *App. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 456–461.
- Raposo, S. (1993) Proteases com actividade coagulante do leite obtidas a partir de culturas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*- Extracção, purificação e caracterização. *Tese de Licenciatura*. Universidade do Minho.

- Rodríguez-Monroy, M. & E. Galindo (1999) Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 687 – 693.
- Sanchez, M., A. Jimenez-Aparicio, G. Lopez, G. Tapia & M. Rodriguez-Monroy (2002) Broth rheology of *Beta vulgaris* cultures growing in an air lift bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **12**: 37 – 41.
- Schenk, R. & A. Hildebrandt (1972) Medium techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **22**: 55-64.
- Schneider, M., F. Reymond, I. W. Marison & U. Stockar (1995) Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 839 - 847.
- Takeda, T., M. Seki & S. Furusaki (1994) Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus tinctorius* in a stirred tank reactor. *J. Chem. Eng. Jpn.* **27**: 466 – 471.
- Trejo-Tapia, G., A. Jiménez-Aparicio, L. Villarreal & M. Rodríguez-Monroy (2001) Broth rheology and morphological analysis of *Solanum chrysotrichum* cultivated in a stirred tank. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1943-1946.
- Vilaça, P. R., A.C. Badino, M. C. Facciotti & W. Schmidell (2000) Determination of power consumption and volumetric oxygen transfer coefficient in bioreactors. *Bioproc. Eng.* **22**: 261-265.
- Wongsamuth, R. & P. Doran (1997) The filtration properties of *Atropa belladonna* plant cell suspension; Effects of hydrodynamic shear and elevated carbon dioxide levels on culture and filtration parameters. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**: 15 – 26.
- Zhong, J.-J., T. Seki, S.-I. Kinoshita & T. Yoshida (1992) Rheological characteristics of cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens*. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1256 – 1262.

## **CAPÍTULO 5**

**Aumento de escala de 2 L para 7 L na  
produção de células em suspensão de  
*Centaurea calcitrapa* em reactor  
biológico mecanicamente agitado**

**RESUMO**

As culturas de células vegetais apresentam-se como uma alternativa promissora para a produção em elevada escala de produtos de origem vegetal de elevado valor.

Neste estudo, procedeu-se ao aumento de escala de 2 para 7 L da cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*, em biorreactor mecanicamente agitado. Usou-se como critério para o aumento de escala o  $K_L a$  constante. Ensaio realizados com diferentes dispersores de ar, demonstraram que o dispersor poroso era mais eficiente na distribuição de ar na cultura. Estudou-se igualmente, os efeitos de diferentes tipos e número de agitadores, no crescimento da cultura de *C. calcitrapa*, mantendo constante o  $K_L a$ . Os agitadores testados foram uma turbina de Rushton e um agitador em hélice. As células em suspensão crescidas no biorreactor equipado com um agitador em hélice apresentaram melhor crescimento do que as células cultivadas no biorreactor com uma turbina de Rushton, para baixas velocidades de agitação (100 rpm). Para elevadas velocidades de agitação (250 rpm), o biorreactor com duas turbinas de Rushton promove melhores condições para o crescimento celular e produção de enzimas com actividade proteolítica. No biorreactor de 7 L com as duas turbinas de Rushton, embora a energia dissipada média e a potência volumétrica transmitida pelo agitador apresentem valores elevados, as células em suspensão não apresentam perda de viabilidade celular e a concentração de compostos fenólicos formados é baixa.

Neste estudo testou-se ainda outro critério para proceder ao aumento de escala da cultura de *C. calcitrapa*, que foi a manutenção da velocidade da ponta do agitador ( $v_i$ ). Os resultados obtidos com este critério são concordantes com os obtidos com o  $K_L a$  constante.

**ABSTRACT**

Plant cell suspension cultures are a promising alternative for the large scale production of high value products of plant origin.

In this study the culture of suspended *Centaurea calcitrapa* cells in mechanically stirred reactors was scaled-up from 2 to 7 L. Constant  $K_La$  was used as scale-up criterion. Experiments carried out with different air spargers showed that the most efficient air distribution in the culture was obtained with a porous sparger. The effects of the use of different types and numbers of stirrers on the growth of the *C. calcitrapa* culture, while keeping a constant  $K_La$ , were studied as well. A Rushton turbine and a marine impeller were the studied stirrers. At low stirring rates (100 rpm), the suspended cells cultured in a bioreactor equipped with a marine impeller had a better growth performance than those cultured using a Rushton turbine as stirrer. At high stirring rates (250 rpm), the bioreactor equipped with two Rushton turbines is better suited for cell growth and proteolytic enzyme production. In the 7-L bioreactor equipped with two Rushton turbines, even though the average energy dissipation and specific power input were both quite high, the suspended cells do not show loss of viability and the formation of phenolic compounds is low.

A different scale-up criterion for the growth of *C. calcitrapa* suspended cells was studied as well. This was the maintenance of a constant impeller tip speed ( $v_i$ ). The results obtained using this scale-up criterion agree with those obtained keeping a constant  $K_La$  value.

### 5.1. INTRODUÇÃO

A produção em larga escala de culturas de células vegetais tem sido considerada como uma fonte alternativa para a produção de enzimas de valor comercial (tabela 5.1.). O sucesso do aumento de escala depende das exigências de oxigénio e de substrato da cultura. Os critérios mais usados num processo de aumento de escala, têm como princípio a similaridade geométrica e, são baseados em equações empíricas e semi-empíricas, que correlacionam o oxigénio volumétrico, a transferência de massa de oxigénio ( $K_{La}$ ), a potência volumétrica do sistema arejado ( $P_g/V$ ), a velocidade da ponta do agitador e os tempos de mistura. Os diferentes critérios, originam processos diferentes em larga escala devido às diferenças nas condições operacionais. Contudo, o critério mais usado nos processos de aumento de escala é a manutenção do  $K_{La}$ , estando este parâmetro indirectamente relacionado com os outros critérios, como sendo a potência volumétrica do sistema arejado, o oxigénio volumétrico e a velocidade da ponta do agitador. Este critério é usado nas indústrias biológicas de antibióticos, vitaminas e enzimas (Mijnbeek, & Oosterhuis, 1992).

**Tabela 5.1.** – Enzimas de origem vegetal produzidas industrialmente.

FONTE (ESPÉCIE)	ENZIMA	APLICAÇÃO
Feijão ( <i>Canavalia ensiformis</i> )	Urease	Diagnóstico
Papaia ( <i>Carica papaya</i> )	Papaína	Fabrico do pão, lacticínios, curtimento do couro, amaciamento da carne, eliminação da turbidez da cerveja
Figo ( <i>Ficus carica</i> )	Ficina	Amaciamento da carne
Ananás ( <i>Ananas comosus</i> )	Bromelaína	Fabrico de pão
Rábano ( <i>Armoracia rusticana</i> )	Peroxidase	Diagnóstico
Amêndoa ( <i>Amygdalus communis</i> )	$\beta$ -glucosidase	Investigação
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	Esterase	Hidrólise e síntese de ésteres
Cevada ( <i>Hordeum vulgare</i> )	$\beta$ -amilase	Fabrico de pão
Soja ( <i>Glycine max</i> )	$\beta$ -amilase	Fabrico de pão

Adaptado de Lowe (2001).

As suspensões de células vegetais desenvolvem-se satisfatoriamente em Erlenmeyer, sendo a agitação eficiente de forma a manter as células em suspensão, manter adequada

oxigenação da cultura, e ainda promover a transferência de massa de nutrientes, sem que a estrutura celular seja danificada. Para aumentar a escala de uma reacção biológica deve ser escolhido um sistema que promova uma adequada homogeneização da suspensão, sem que esta sofra o efeito de forças de tensão, e que mantenha o nível de produtividade. As suspensões celulares homogéneas ou com pequenos agregados (< 25 células), têm um comportamento muito similar ao das culturas microbianas, o que possibilita a utilização de biorreactores convencionais, com todos os conhecimentos, tecnologias e equipamentos já disponíveis para microrganismos.

O biorreactor mecanicamente agitado é um dos sistemas mais versáteis usado industrialmente. Este tipo de sistema é eficiente na mistura das suspensões celulares, na quebra das bolhas de ar, de forma a aumentar a oxigenação da cultura e na prevenção da formação de agregados celulares de grandes dimensões (Hooker *et al.*, 1990). A sua aplicação no cultivo em grande escala tem sido largamente usada (Tanaka, 1981; Hooker *et al.*, 1990; Zhong, 2002; Konstas & Kintzios, 2003; Xie *et al.*, 2003; O'Kennedy *et al.*, 2003; Oniscu *et al.*, 2003). Um dos casos de maior sucesso na produção em grande escala, de metabolitos de origem vegetal, e que se encontra patenteado, é a produção de Taxol™, a partir de células em suspensão de *Taxus brevifolia* (Zhong, 2002). Este composto é usado no tratamento de diversos tipos de cancro, principalmente o dos ovários, desde 1992. Quando se procedeu ao aumento de escala da produção de Taxol™, assistiu-se a uma redução na produtividade, podendo esta ser atribuída a diversos factores, entre os quais à existência de forças de tensão, necessidades de oxigénio e a composição dos gases (Pan *et al.*, 2000). Na produção deste composto e seus derivados foram igualmente testados diferentes tipos de biorreactores (Pestchanker *et al.*, 1996; Wang & Zhong, 1997; Wang & Zhong, 2002; Zhong *et al.*, 2002).

A redução dos níveis de stresse nas células, sem comprometer a homogeneidade e a capacidade de transferência de massa nos reactores mecanicamente agitados, é um importante objectivo no projecto de reactores e no aumento de escala.

Taticek *et al.* (1991) fizeram uma revisão dos principais trabalhos realizados no aumento de escala de produção biológica com culturas de células vegetais. Este artigo ainda se mantém actual visto poucos trabalhos terem sido realizados na última década. Foram abordadas questões relacionadas com as características das células vegetais, como o seu elevado tamanho, a sensibilidade às forças de tensão, a tendência para formar agregados e a cinética, e o modo como estas características afectam as estratégias de aumento de escala. No aumento de escala de produção de uma linha celular vegetal foram ainda abordadas questões relativas à transferência de massa de oxigénio e seu consumo, à configuração do biorreactor e do agitador, às propriedades reológicas da suspensão, relacionando-as com a

homogeneidade e com a transferência de massa e ainda, possíveis variáveis de processo. A transferência de massa de oxigénio até à superfície das células tem um papel de extrema importância nas fermentações aeróbias, podendo elevadas densidades celulares limitar a disponibilidade de oxigénio no meio fermentativo. Um factor importante no projecto de biorreactores com uma produtividade melhorada, é a optimização da transferência de oxigénio, dentro de limites toleráveis para as células vegetais. Em muitos casos, a suspensão vegetal tem um comportamento não-Newtoniano, dificultando a obtenção de um bom grau de homogeneização da suspensão e subsequentemente, de transferência de massa. Assim, a monitorização da concentração de oxigénio dissolvido na suspensão tem um papel importante no desempenho da produção biológica em reactor. É o resultado do balanço entre o oxigénio transferido e o oxigénio consumido pela cultura. O coeficiente volumétrico de transferência de massa depende do caudal de arejamento, da velocidade de agitação, da área interfacial de contacto gás-líquido e das propriedades reológicas da cultura. A taxa de consumo de oxigénio depende do tipo e da taxa específica de crescimento, pH, temperatura, composição e tipos de nutrientes presentes no meio e concentração de biomassa.

Relativamente à configuração do biorreactor e do agitador, uma grande variedade de biorreactores tem sido usada no cultivo de células vegetais. A selecção do reactor e do tipo de agitador, para o cultivo de uma linha celular específica, tem de ter em conta a tolerância que as células apresentem às forças de tensão. Igualmente, as propriedades físicas do caldo fermentativo, como a viscosidade, densidade, morfologia celular e o regime do fluido são parâmetros importantes a serem considerados na homogeneização e transferência de massa. Considerando as variáveis de processo, o nível de arejamento e a concentração do oxigénio dissolvido no meio afectam o crescimento das células vegetais em biorreactor. Por vezes, elevados arejamentos são prejudiciais ao crescimento celular, provocando uma redução no rendimento de biomassa. Este facto, ocorre devido ao aumento das forças de tensão, exercidas pelo elevado arejamento, nas células, promovendo o aumento do stress hidrodinâmico na cultura. Também, pode ocorrer inibição da actividade metabólica das células devido à toxicidade do oxigénio, por se encontrar em elevada concentração no meio. A formação de espuma é igualmente uma variável de processo, comum a muitas fermentações e que se encontra relacionada com o caudal de arejamento, com a composição do meio e com a estrutura física do vaso do reactor. Muitas linhas celulares excretam para o meio polissacáridos e/ou proteínas que tornam a cultura viscosa. As bolhas de ar sobem à superfície do meio, que juntamente com os polissacáridos e/ou proteínas excretadas, vão formar a espuma. As células ficam retidas na espuma formando uma crosta, que torna a suspensão celular heterogénea e difícil a transferência de massa. Aliada a este

problema, as células apresentam tendência para se agregarem nas paredes do vaso e nas sondas internas, dificultando a recolha de amostras.

Outra questão abordada por Taticek *et al.* (1991) foi o tipo de sistema em que o biorreactor opera. As células vegetais podem crescer em sistema descontínuo, semi-contínuo e contínuo e podem ser mantidas viáveis por longos períodos de tempo através de sistemas de imobilização. O sistema mais apropriado para a produção em larga escala depende da natureza do produto e se este é ou não excretado para o meio. Em geral, a síntese de metabolitos secundários está dissociada do crescimento celular, de modo que o processo em descontínuo ou em contínuo com apenas uma só fase, não é adequado para a produção de produtos secundários. Na cultura em descontínuo está geralmente associado um compromisso entre a optimização do crescimento, num curto período de tempo e a maximização do rendimento do produto. Na cultura em contínuo, o rendimento de metabolitos secundários é geralmente baixo. Segundo Taticek *et al.* (1991), as culturas de células vegetais têm um elevado potencial industrial, no entanto, o sucesso à escala comercial depende dos custos do processo, comparativamente com a tecnologia existente e com a vantagem económica.

Segundo Nordkvist *et al.* (2003) o aumento de escala de processos biológicos apresenta uma série de problemas técnicos que não se encontram solucionados até ao momento. Os problemas mais comuns, identificados em processos de aumento de escala estão associados à homogeneização da suspensão, transferência de massa e transferência de calor. Segundo estes autores, uma deficiente homogeneidade da cultura, poderá levar a resultados catastróficos em termos económicos, originados por um baixo rendimento de biomassa e de produto e, a uma qualidade variável do produto. Um exemplo desta situação, é a produção de enzimas por *Aspergillus oryzae*, em sistema semi-contínuo, em que a concentração de glucose no reactor deve ser inferior a 20 g/L de forma que não haja repressão catabólica da expressão do enzima. Igualmente, a transferência de massa pode ser limitativa no desenvolvimento de uma cultura, fazendo com que a produtividade volumétrica do sistema seja limitada por este factor. Usando um reactor mecanicamente agitado, a produzir à escala industrial, apenas se consegue atingir com um coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio acima de  $700 \text{ h}^{-1}$  se for usada no sistema uma elevada potência volumétrica, tornando o processo dispendioso, e podendo mesmo inviabilizar o sistema produtivo. No caso específico, é dispendioso operar com uma potência volumétrica de  $5 \text{ kW/m}^3$  e com um caudal de arejamento de 1 vvm num reactor mecanicamente agitado equipado com uma turbina. O oxigénio como substrato, usado para enriquecer o ar ou usado puro, pode ser utilizado para aumentar a transferência de massa. No entanto, a produtividade do biorreactor pode ser limitada pela sua capacidade para

remover o calor metabólico gerado pelo sistema. O sistema de arrefecimento mais comum nos biorreactores convencionais mecanicamente agitados, à escala laboratorial, consiste numa serpentina colocada no interior do vaso. Em larga escala, este sistema de arrefecimento poderá não ser eficiente, não tendo capacidade para arrefecer o vaso, e comprometendo a produtividade do processo, devido à área necessária para proceder ao arrefecimento do vaso ser elevada. Esta questão, poderá inviabilizar o processo, pelos custos de arrefecimento serem elevados. Assim, de forma a aumentar a produtividade dos biorreactores em larga escala e ao mesmo tempo diminuir os custos de produção e os custos energéticos, facilitando todo o processo de manutenção e limpeza do reactor, Nordkvist *et al.* (2003) sugerem o desenvolvimento de uma nova geração de biorreactores, que satisfaçam as seguintes condições: um elevado fluxo de entrada de nutrientes rapidamente homogeneizado na suspensão existente no vaso; o processo industrial deve permitir uma elevada transferência de massa, com baixa potência introduzida; e, as trocas de calor, devem ser realizadas no exterior do vaso, principalmente quando o calor gerado no sistema é elevado. De outro modo, que a produtividade do sistema não seja limitada pela transferência de calor.

Os agitadores normalmente usados nas fermentações são classificados em axiais e radiais, dependendo do tipo de correntes de convecção que originam. No caso dos agitadores axiais, as correntes de fluido são paralelas ao eixo do agitador. Os agitadores radiais produzem correntes de convecção que se deslocam do agitador para as paredes laterais do biorreactor. As turbinas de Rushton são agitadores radiais, que atingem velocidades de rotação moderadamente elevadas e baixa potência consumida. São recomendadas para aplicações em que é importante a combinação da dispersão de gás com a agitação intensa (Mavituna & Atkinson, 1991). Os agitadores em hélice são pequenos agitadores de elevada velocidade, que promovem o movimento axial do fluido, mas não são apropriados para elevadas viscosidades. Habitualmente são usados em operações de pequena escala (Mavituna & Atkinson, 1991).

A existência de apenas um agitador nos biorreactores mecanicamente agitados tem sido abordada como opção em processos de produção em larga escala. Esta situação tem sido criticada por nem sempre ser eficiente na mistura da suspensão. Com apenas um agitador, a cultura poderá ser obrigada a ser agitada a uma velocidade maior, ficando submetida à acção das forças de tensão mais elevadas. A agitação pode ser insuficiente, havendo a formação de zonas estagnadas, o que por sua vez, pode provocar stresse celular e muitas vezes a morte das células. A introdução de sistemas de agitadores múltiplos poderá ser um critério favorável quando estamos perante linhas celulares sensíveis a forças de tensão. Estes sistemas ganham igualmente importância por permitirem uma distribuição do gás mais

eficiente, um maior tempo de residência da fase gasosa, um maior movimento do fluido, na zona superior do biorreactor e um menor consumo da potência por agitador, quando comparados com os sistemas de agitador simples (Gogate *et al.*, 2000).

Keßler *et al.* (1997) testaram, em culturas de células em suspensão de *Fragaria ananassa*, o efeito de dois tipos de agitadores, uma turbina do tipo Rushton e um agitador tipo âncora. Verificaram que, com a turbina do tipo Rushton o consumo de oxigénio era estimulado pelo aumento da turbulência, visto provocar a quebra dos agregados celulares, aumentando a área inter-específica de contacto das partículas com as bolhas gasosas. Embora este efeito possa ser prejudicial, as condições de stresse, muitas vezes, activam o metabolismo celular, aumentando a taxa de consumo de oxigénio. A produção de metabolitos secundários é favorecida pelas condições de stresse hidrodinâmico.

O objectivo deste capítulo foi estudar o aumento de escala da produção de biomassa da cultura de *Centaurea calcitrapa* de 2 para 7 L, utilizando-se diferentes critérios. Para tal, seleccionou-se para critério de aumento de escala a manutenção do  $K_La$ , por ser o critério mais usado e constituir um parâmetro condicionante do desenvolvimento das culturas vegetais. Testou-se igualmente, outro critério para proceder ao aumento de escala do reactor, a manutenção da velocidade da ponta do agitador ( $v_i$ ). No aumento de escala estudou-se ainda o tipo de dispersor de ar e dois tipos de agitadores, vulgarmente usados neste tipo de estudos, uma turbina de Rushton e um agitador em hélice. O número de agitadores no biorreactor foi igualmente estudado.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1. Manutenção das culturas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* em Erlenmeyer

As células em cultura de *Centaurea calcitrapa* foram mantidas conforme descrito no capítulo 2, secção 2.2.1.

### 5.2.2. Características do biorreactor mecanicamente agitado de 7 L

Neste capítulo utilizou-se um biorreactor de 7 L, da marca Applikon, em sistema descontínuo. O ar introduzido no fermentador para o arejamento foi esterilizado pela passagem através de um filtro de membrana millipore hidrofóbica, com a porosidade de 0,2 µm, sendo o caudal de ar injectado no fermentador controlado por um fluxímetro. Os gases que saíram do fermentador, passaram por um condensador, com a finalidade de diminuir as perdas de meio líquido, sendo filtrados por uma membrana Millipore 0,2 µm.

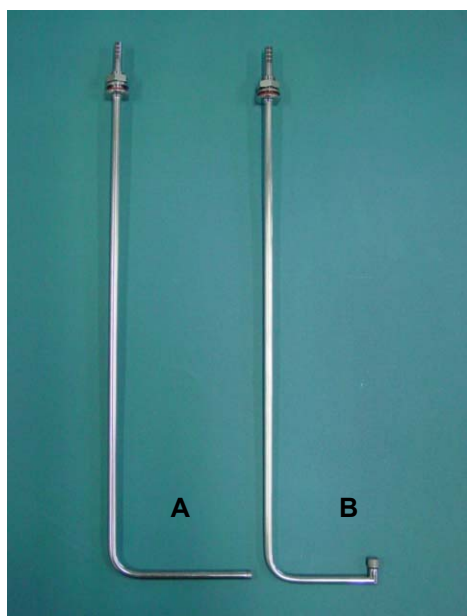
As características do biorreactor encontram-se na tabela 5.2.

Nestes ensaios foram utilizados dois tipos de dispersores de ar, um dispersor poroso e outro em forma de L (figura 5.1.). O dispersor em L é perfurado na base, encontrando-se os orifícios distanciados entre si 4 mm, com um total de 7 orifícios.

A distância, em altura, entre os dispersores de ar e o agitador foi de 3 cm.

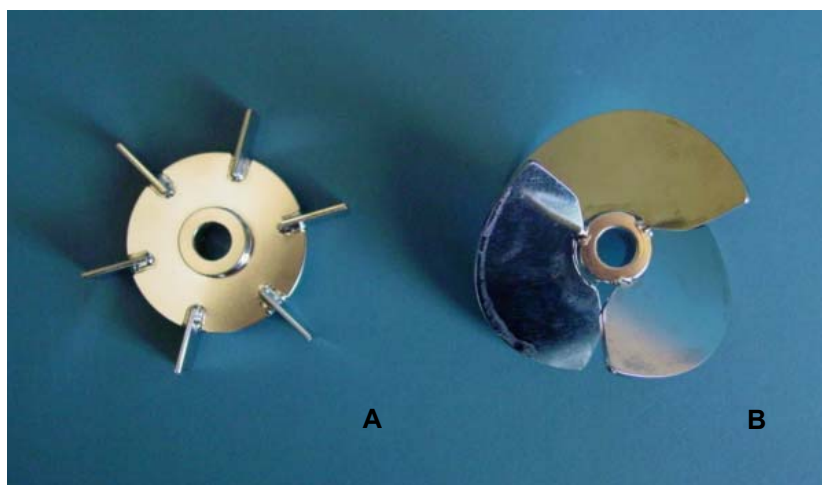
**Tabela 5.2.** - Características do vaso do biorreactor mecanicamente agitado de 7 L.

CARACTERÍSTICAS DO VASO	
VOLUME TOTAL	7,0 L
VOLUME ÚTIL	5,4 L
ALTURA	26,5 cm
ALTURA DO LÍQUIDO	18,8 cm
DIÂMETRO	16,2 cm



**Figura 5.1.** – Dispersores de ar em forma de L (A) e poroso (B).

Foram, igualmente, realizados ensaios com dois tipos de agitadores, uma turbina de Rushton e um agitador em hélice (figura 5.2.), cujas características estão descritas na tabela 5.3. A distância entre os dois agitadores foi de 10 cm, baseada na relação  $D_i < H_i < 2D_i$ , em que  $H_i$  é o espaçamento entre os dois agitadores ( Enfors & Häggström, 1998).



**Figura 5.2.** – Turbina de Rushton (A) e agitador em hélice (B).

**Tabela 5.3.** - Características da turbina de Rushton e do agitador em hélice (*marine propeller*).

TURBINA DE RUSHTON		AGITADOR EM HÉLICE	
Nº DE PÁS	6	Nº DE PÁS	3
INCLINAÇÃO DAS PÁS	90 °	INCLINAÇÃO DA PÁ	45 °
LARGURA DA PÁ	1,4 cm	LARGURA DA PÁ	2,0 cm
ALTURA DA PÁ	1,1 cm	ALTURA DA PÁ	6,0 cm
DIÂMETRO DA TURBINA	6,0 cm	DIÂMETRO DA TURBINA	6,0 cm

O fermentador, contendo 4000 mL meio de cultura SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) foi inoculado com 25 % (v/v) de suspensão celular com 8 dias de subcultura.

Após a estabilização das condições de temperatura, agitação e arejamento apropriadas ao crescimento celular, procedeu-se à recolha da amostra, correspondente ao tempo zero de crescimento. As restantes amostras foram retiradas diariamente ou de 2 em 2 dias, de forma a permitir a obtenção do perfil de crescimento celular (peso fresco, peso seco, taxa específica de crescimento, produtividade de biomassa e rendimentos) e a caracterização do comportamento da produção dos produtos (protease e fenóis) em função do consumo dos nutrientes (fonte de carbono, nitratos e fosfatos). Determinou-se ainda o pH da suspensão e a condutividade.

Os parâmetros de crescimento foram obtidos pelo cálculo da média aritmética dos resultados experimentais de cada amostra recolhida e análise do erro padrão.

Os resultados foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) e para valores de F significativos, realizou-se o teste de comparação múltipla de médias de Duncan, usando o software SPSS (Windows, Release 11.5.0).

### **5.2.3. Determinação dos parâmetros de crescimento da cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa***

Os parâmetros de crescimento definidos para descrever o crescimento das células em cultura de *C. calcitrapa*, crescida em reactor biológico de 7 L com agitação mecânica, encontram-se descritos no capítulo 2, ponto 2.2.5..

Determinou o peso fresco e o peso seco, pH e condutividade da cultura. Com base nestes valores e no perfil de crescimento, determinou-se a taxa específica de crescimento, o rendimento de biomassa e a produtividade de biomassa.

### **5.2.4. Transferência de massa de oxigénio**

A transferência de massa de oxigénio foi determinada pelo método dinâmico, adaptado para a cultura de células vegetais por Leckie *et al.* (1991b), conforme se encontra descrito no ponto 2.2.6.1. do capítulo 2. O coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio foi determinado nas condições iniciais de cultura, antes de se proceder à inoculação.

### 5.2.5. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo Método da exclusão com corante, método descrito por Keßler *et al.* (1997), com o corante Evans Blue, conforme se encontra descrito na secção 2.2.7.1. do capítulo 2.

A viabilidade foi expressa em percentagem, como sendo a razão entre o número de células viáveis e o número total de células presentes.

Com base nos valores de viabilidade celular relativa, determinou-se a taxa específica de morte celular, segundo o modelo de morte de primeira ordem, descrito no capítulo 3, ponto 3.3.1..

### 5.2.6. Caracterização reológica das células em cultura de *C. calcitrapa*

A caracterização reológica da suspensão de células de *C. calcitrapa*, crescida em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L, foi efectuada conforme descrito no capítulo 2, ponto 2.2.10.. A caracterização reológica da cultura foi feita com base nas amostras recolhidas de 2 em 2 dias.

### 5.2.7. Métodos analíticos

Nas amostras recolhidas, ao longo do ciclo de crescimento, procedeu-se à separação do meio nutriente das células por filtração. Com o extracto celular determinou-se a actividade proteolítica e a proteína total. Determinou-se o consumo da fonte de carbono (glucose), fosfatos e nitratos, assim como a formação de produtos secundários (fenóis) existentes no meio extracelular. Os métodos, para cada análise, encontram-se descritos no capítulo 2, ponto 2.2.8..

### 5.2.8. Determinação dos tempos de mistura

Os tempos de mistura foram determinados segundo o método descrito por Menisher *et al.* (2000). Este método consiste na adição de 1,11 mL de uma solução indicador de fenolftaleína a 0,5 % (p/v) em solução alcoólica e de 1,67 mL de hidróxido de sódio 1 M, ao vaso do biorreactor, contendo 5 L de água destilada. Sob condições básicas, a água toma uma coloração rosa. Convém deixar a agitar alguns minutos para que a coloração se torne homogénea por todo o vaso. Posteriormente, adiciona-se 1,94 mL de ácido clorídrico 1 M. A adição do ácido é extremamente importante porque deve ser um processo rápido e dar-se sempre no mesmo local. O tempo de mistura é o tempo que demora a desaparecer

totalmente a cor de rosa da fenolftaleína, diluída no hidróxido de sódio, pela adição de uma quantidade fixa de excesso de ácido clorídrico.

Determinaram-se os tempos de mistura para os valores de agitação de 60, 100 e 250 rpm e de arejamento 0,02; 0,04; 0,08 e 0,12 vvm, para o dispersor poroso e em L, assim como, para uma e duas turbinas de Rushton e um e dois agitadores em hélice. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Os resultados foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) e para valores de F significativos, realizou-se o teste de comparação múltipla de médias de Duncan, usando o software SPSS (Windows, Release 11.5.0).

#### **5.2.9. Parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico**

Os parâmetros utilizados para quantificar o stresse hidrodinâmico gerado pelo agitador nas culturas de *C. calcitrpa*, crescidas em reactor biológico de 7 L mecanicamente agitado, foram a velocidade da ponta do agitador ( $v_i$ ), a potência volumétrica transmitida pelo agitador ( $P/V$ ), a velocidade de corte média e máxima e a energia dissipada média ( $\bar{\varepsilon}$ ), de acordo com as expressões matemáticas referidas no capítulo 2, ponto 2.2.11..

### 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1. A transferência de oxigénio e a homogeneização da cultura em biorreactor de 7 L mecanicamente agitado

Antes de se proceder ao estudo do aumento de escala de 2 para 7 L, da cultura de *Centaurea calcitrapa*, em biorreactor mecanicamente agitado, caracterizou-se a transferência de oxigénio e a homogeneização da cultura em reactor biológico de 7 L.

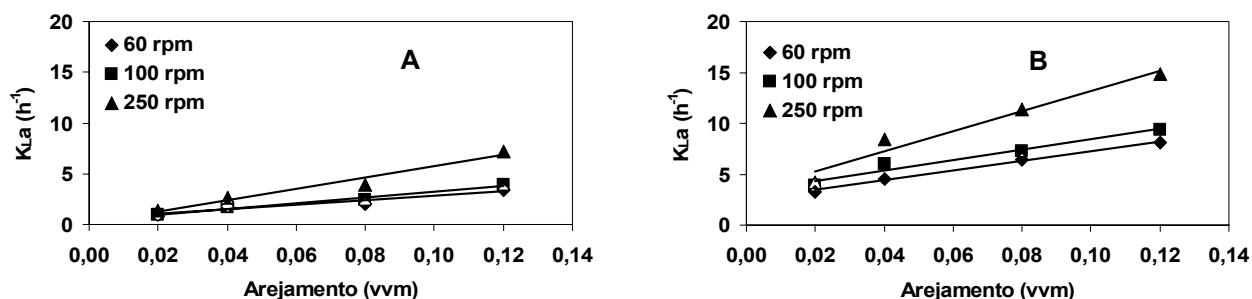
##### 5.3.1.1. Caracterização da transferência de oxigénio na cultura

Tal como referido anteriormente, o coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_{L,a}$ ) foi determinado para as diferentes condições de agitação e arejamento, usando o método dinâmico, adaptado a células vegetais por Leckie *et al.* (1991b). Os valores de  $K_{L,a}$  foram determinados para o meio SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), na ausência de células. Para as mesmas condições operacionais de agitação e arejamento, o  $K_{L,a}$  foi determinado usando um dispersor de ar em forma de L e um dispersor de ar poroso. Este parâmetro foi igualmente, determinado usando um e dois agitadores em hélice e um e duas turbinas de Rushton.

Na tabela 5.4. observamos os valores de  $K_{L,a}$ , determinados em biorreactor mecanicamente agitado com um agitador em hélice, para os dois tipos de dispersores de ar testados, em forma de L e poroso. Para idênticas condições operacionais de arejamento e agitação, com o dispersor de ar poroso, os valores de  $K_{L,a}$  obtidos são substancialmente superiores aos obtidos com o dispersor em forma de L. A 250 rpm e com um caudal de arejamento de 0,12 vvm, o  $K_{L,a}$  obtido para o dispersor em L foi de  $7,21 \text{ h}^{-1}$ , enquanto para o dispersor poroso foi de  $14,85 \text{ h}^{-1}$ , o dobro do valor obtido anteriormente. Representando graficamente, verificamos que o  $K_{L,a}$  varia linearmente em função do aumento da agitação e do caudal de arejamento (figura 5.3.), como já verificado para reactor biológico de 2 L.

**Tabela 5.4.** – Valores do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_{L,a}$ ), determinados em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com um agitador em hélice, usando um dispersor de ar em forma de L e um dispersor poroso, para diferentes caudais de arejamento e agitação.

AGIT. / AREJ. (rpm / vvm)	$K_{L,a}$ ( $h^{-1}$ )	
	DISPERSOR EM L	DISPERSOR POROSO
60 / 0,02	0,91	3,28
60 / 0,04	1,77	4,52
60 / 0,08	2,06	6,44
60 / 0,12	3,41	8,13
100 / 0,02	0,93	3,89
100 / 0,04	1,67	5,98
100 / 0,08	2,41	7,31
100 / 0,12	3,94	9,41
250 / 0,02	1,42	4,22
250 / 0,04	2,60	8,42
250 / 0,08	3,94	11,34
250 / 0,12	7,21	14,85



**Figura 5.3.** – Representação gráfica dos valores do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_{L,a}$ ), da tabela 5.4., determinados em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com um agitador em hélice, usando um dispersor de ar em forma de L (A) e um dispersor poroso (B), para diferentes caudais de arejamento e agitação.

Na tabela 5.5. são apresentados os valores do  $K_{L,a}$  determinados nas mesmas condições operacionais, com um dispersor em L e poroso, mas utilizando dois agitadores em hélice. Analisando os valores, constatamos igualmente que, com o dispersor poroso se obtêm valores de  $K_{L,a}$  superiores aos obtidos com o dispersor em L.

**Tabela 5.5.** – Valores do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_{L,a}$ ), determinados em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com dois agitadores em hélice, usando um dispersor de ar em L e um dispersor poroso, para diferentes caudais de arejamento e agitação.

AGIT. / AREJ. (rpm / vvm)	$K_{L,a}$ ( $h^{-1}$ )	
	DISPERSOR EM L	DISPERSOR POROSO
60 / 0,02	0,85	2,03
60 / 0,04	1,76	3,62
60 / 0,08	2,71	7,89
60 / 0,12	3,99	10,49
100 / 0,02	1,00	2,63
100 / 0,04	1,97	4,38
100 / 0,08	2,66	8,69
100 / 0,12	4,27	12,73
250 / 0,02	1,96	3,73
250 / 0,04	4,07	6,40
250 / 0,08	5,80	10,16
250 / 0,12	7,85	15,08

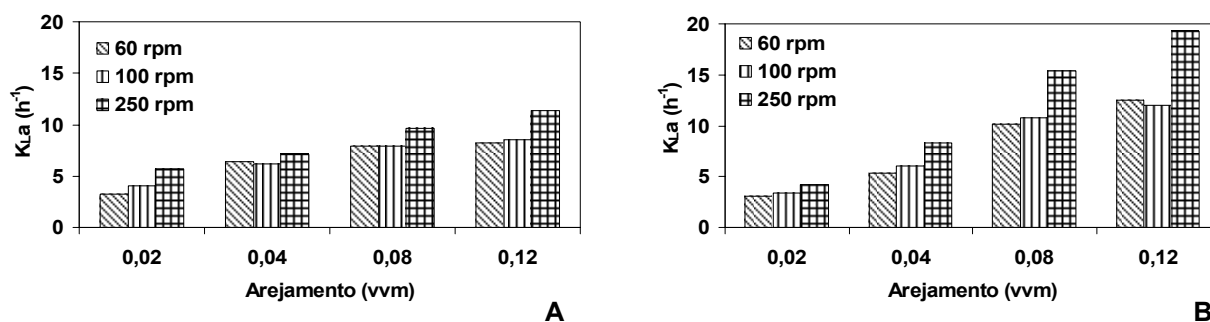
Comparando os valores dos coeficientes volumétricos de transferência de massa de oxigénio, com um e dois agitadores em hélice (tabela 5.4. e 5.5.), verificamos que estes são bastante semelhantes, tanto para o caso em que foi usado o dispersor de ar em L como o dispersor poroso, sugerindo que será desnecessária a presença dos dois agitadores no reactor biológico de 7 L. Pode-se mesmo dizer, que os valores de  $K_{L,a}$  determinados com dois agitadores são ligeiramente inferiores aos determinados com apenas um, excepto para o caudal de maior arejamento (0,12 vvm) é que o  $K_{L,a}$  é superior. Este facto pode ser atribuído às correntes de convecção que se formam no fluido, sendo um agitador suficiente para homogeneizar toda a suspensão, proporcionando uma transferência de oxigénio adequada. Os agitadores em hélice são agitadores que produzem o movimento axial do fluido sendo particularmente importantes quando se pretendem correntes verticais do fluido, ou seja, o movimento do fluido é paralelo ao eixo do agitador (Doran, 1998). Este tipo de agitadores promove a homogeneização e turbulência de toda a suspensão, evitando a existência de zonas estagnadas no reactor.

Os valores de  $K_{L,a}$  foram igualmente determinados usando os dispersores de ar em L e poroso para uma e duas turbinas de Rushton (tabela 5.6. e 5.7.), nas mesmas condições do ensaio anterior. Por análise das tabelas 5.6. e 5.7., verificamos também, tal como nos casos anteriores, que os valores de  $K_{L,a}$  obtidos com o dispersor de ar poroso são superiores aos

obtidos com o dispersor em L, tanto para os ensaios realizados com uma ou duas turbinas de Rushton. No caso do dispersor de ar em L, não se verificou diferença nos valores de  $K_{L,a}$  com uma ou com duas turbinas de Rushton. Os  $K_{L,a}$  são idênticos, não se podendo afirmar o mesmo relativamente ao dispersor de ar poroso. Com duas turbinas de Rushton (tabela 5.7.) obtêm-se valores mais elevados de  $K_{L,a}$ , comparativamente ao ensaio realizado com apenas uma turbina (tabela 5.6.), para valores de arejamento de 0,08 e 0,12 vvm. Para baixos caudais de arejamento (0,02 e 0,04 vvm) o  $K_{L,a}$  determinado com uma turbina de Rushton é superior ao determinado para duas turbinas (figura 5.4.).

**Tabela 5.6.** – Valores do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_{L,a}$ ), determinados em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com uma turbina de Rushton, usando um dispersor de ar em forma de L e um dispersor poroso, para diferentes caudais de arejamento e agitação.

AGIT. / AREJ. (rpm / vvm)	$K_{L,a}$ ( $h^{-1}$ )	
	DISPERSOR EM L	DISPERSOR POROSO
60 / 0,02	0,49	3,22
60 / 0,04	1,18	6,36
60 / 0,08	1,77	7,88
60 / 0,12	2,69	8,22
100 / 0,02	0,58	4,03
100 / 0,04	1,46	6,23
100 / 0,08	1,87	7,87
100 / 0,12	2,79	8,54
250 / 0,02	1,29	5,68
250 / 0,04	2,99	7,11
250 / 0,08	4,18	9,62
250 / 0,12	5,73	11,40



**Figura 5.4.** - Valores do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_{L,a}$ ), determinados em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com uma (A) e duas (B) turbinas de Rushton, para diferentes caudais de arejamento e agitação, usando um dispersor de ar poroso.

**Tabela 5.7.** – Valores do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio ( $K_La$ ), determinados em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com duas turbinas de Rushton, usando um dispersor de ar em L e um dispersor poroso, para diferentes caudais de arejamento e agitação.

AGIT. / AREJ. (rpm / vvm)	$K_La$ ( $h^{-1}$ )	
	DISPERSOR EM L	DISPERSOR POROSO
60 / 0,02	0,67	3,09
60 / 0,04	1,61	5,34
60 / 0,08	2,38	10,15
60 / 0,12	3,31	12,50
100 / 0,02	0,76	3,38
100 / 0,04	1,64	6,03
100 / 0,08	2,45	10,82
100 / 0,12	3,24	12,05
250 / 0,02	1,90	4,22
250 / 0,04	3,97	8,31
250 / 0,08	5,34	15,34
250 / 0,12	7,06	19,32

Analisando os valores dos coeficientes volumétricos de transferência de massa de oxigénio, determinados com um agitador em hélice (tabela 5.4.) e com uma turbina de Rushton (tabela 5.6.), constatamos que se obtiveram valores superiores deste parâmetro com um agitador em hélice. Este facto pode dever-se, como já foi dito anteriormente, ao agitador em hélice promover um movimento axial do fluido, proporcionando uma maior turbulência deste. A turbina de Rushton é um agitador que produz um movimento radial do fluido, não sendo este tão eficiente na transferência de oxigénio e na homogeneização de todo o fluido existente no vaso. O líquido movimenta-se radialmente a partir do agitador contra as paredes do vaso, dividindo-se em duas correntes, uma segue em direcção ao topo do vaso, enquanto a outra corrente segue em direcção à base do reactor (Doran, 1998). Pensa-se, neste caso, que a existência de apenas uma turbina de Rushton poderá não ser suficiente para promover a turbulência de todo o fluido no vaso. Assim, a introdução de uma segunda turbina de Rushton irá originar uma maior turbulência do fluido, facilitando a homogeneização e transferência de oxigénio, como se pode constatar pelos resultados obtidos em que o  $K_La$  determinado com duas turbinas é superior ao obtido com apenas uma, como já foi referido atrás. Quando são introduzidas duas turbinas de Rushton, estas apresentam um  $K_La$  superior ao determinado com dois agitadores em hélice.

Em relação aos tipos de dispersores de ar, em todas as determinações de  $K_L a$  realizadas, constatou-se que o dispersor poroso apresentava valores de  $K_L a$  superiores ao dispersor em L, ou seja, o dispersor poroso é mais eficiente na transferência de oxigénio. A grande diferença entre estes dois tipos de dispersores, prende-se com o tamanho das bolhas de ar libertadas. O tamanho das bolhas de ar tem um papel extremamente importante na determinação do  $K_L a$ . O dispersor poroso, através da libertação de pequenas bolhas de ar, promove uma maior dispersão destas pelo seio da cultura, facilitando a transferência de oxigénio (Parthasarathy *et al.*, 1992). A área interfacial de contacto –  $a$  – das bolhas com o meio é superior neste caso, comparativamente com a das bolhas libertadas pelo dispersor em L. Logo, se área interfacial de contacto ( $a$ ) aumenta, o valor de  $K_L a$  aumenta também. Contrariamente, o dispersor em L liberta bolhas de grandes dimensões, que facilmente contactam com a superfície do líquido. Não há uma dispersão eficiente das bolhas gasosas pelo seio da cultura, sendo a área interfacial de contacto reduzida. Neste caso, as elevadas velocidades de agitação, produzidas pelo agitador, são responsáveis pela quebra das bolhas de ar, promovendo o aumento da superfície de contacto das bolhas de ar com o meio e, conseqüentemente o aumento do  $K_L a$ .

Verificou-se, no caso do dispersor poroso, que o aumento do  $K_L a$  é constante com o aumento da velocidade de agitação, devido ao tamanho das bolhas de ar não se alterarem com o aumento da velocidade de agitação. Neste caso, a superfície disponível para a transferência de oxigénio é aproximadamente a mesma para baixas e elevadas velocidades de agitação.

Idênticos resultados foram obtidos por Leckie *et al.* (1991b) em que determinaram os valores de  $K_L a$  iniciais num biorreactor mecanicamente agitado usando dois tipos de dispersores de ar. Um dispersor com dois braços, em forma de V, em que estes são perfurados, e outro dispersor em disco, com microporos. Para idênticos caudais de arejamento e velocidades de agitação, obtiveram valores de  $K_L a$  superiores para o dispersor em forma de disco com microporos. Também, Parthasarathy *et al.* (1992) realizaram estudos com dois tipos de dispersores, um dispersor poroso e outro dispersor em anel. Verificaram que o tamanho médio das bolhas de ar, provenientes de um dispersor poroso, mantém-se constante, independentemente da velocidade de agitação. Por outro lado, as bolhas de grandes dimensões, geradas pelo dispersor em anel podem ser quebradas, tendo o seu tamanho médio tendência para diminuir com o aumento da velocidade de agitação. A elevadas velocidades de agitação, o tamanho destas bolhas aproxima-se do das bolhas libertadas pelo dispersor poroso.

Relacionando ainda o tipo de dispersor de ar com o tipo de agitador, constatamos que a combinação do dispersor poroso com um agitador em hélice é mais eficiente do que com

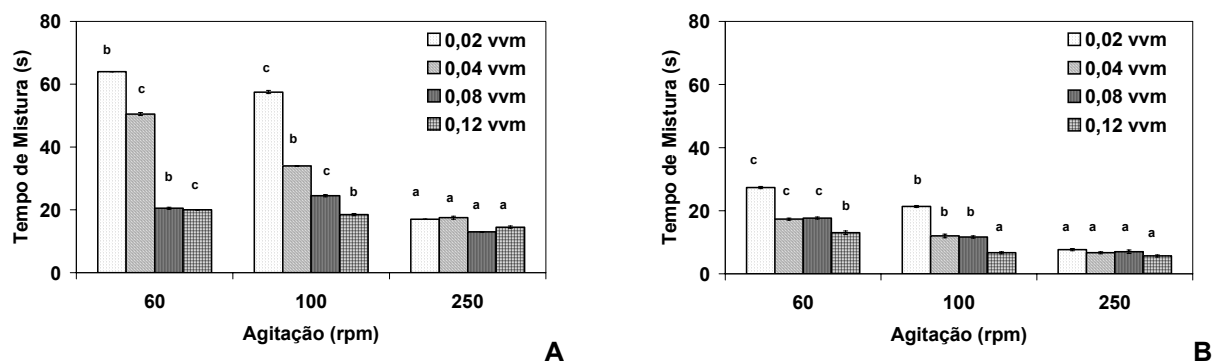
uma turbina de Rushton. Este facto, prende-se com o que foi referido anteriormente, o agitador em hélice produz um movimento axial do fluido, promovendo uma melhor dispersão das bolhas de ar, enquanto que a turbina de Rushton, produz um movimento radial do fluido, não sendo eficiente na dispersão das bolhas de ar por todo o caldo fermentativo. Neste caso, o movimento produzido pelo agitador não abrange toda a suspensão que se encontra no reactor.

Segundo, Doran (1998) no caso de um fluido que contenha sólidos, como sendo uma cultura de células vegetais, um agitador que produza um movimento axial do fluido possibilita uma melhor mistura da suspensão, confirmando os resultados obtidos neste trabalho com a cultura de células de *C. calcitrapa*.

### 5.3.1.2. Caracterização da homogeneização da cultura

De forma a complementar os resultados obtidos na determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa ( $K_L a$ ), foram determinados os tempos de mistura em reactor biológico mecanicamente agitado, em que se procedeu à combinação dos dois tipos de dispersores de ar com um e dois agitadores em hélice e com uma e duas turbinas de Rushton. Os tempos de mistura foram determinados para o meio SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), na ausência de células. O tempo de mistura é um parâmetro que quantifica o grau de dificuldade de homogeneização da suspensão.

Na figura 5.5. podem ser observados os valores dos tempos de mistura, determinados para os dispersores em L e poroso, associados a um agitador em hélice. Os valores dos tempos de mistura para o dispersor de ar em L são bastante superiores aos obtidos para o dispersor poroso. Para ambos os dispersores verifica-se que o tempo de mistura diminui com o aumento do caudal de arejamento. O aumento do arejamento, provoca o aumento da turbulência da suspensão e, conseqüentemente uma melhor mistura, devido à acção das bolhas de ar (Nienow, 1998). Estes resultados são concordantes com os valores obtidos para o  $K_L a$ . Para o dispersor em L, verifica-se que os resultados obtidos para as agitações de 60 e 100 rpm são similares (teste de Duncan,  $\alpha = 0,05$ , anexo G). Para 250 rpm os valores dos tempos de mistura são significativamente inferiores ( $P \leq 0,05$ ). O dispersor de ar poroso, dada a dimensão das bolhas de ar que liberta, permite uma melhor mistura da suspensão, obtendo-se assim, valores dos tempos de mistura baixos, comparativamente com o dispersor em L. Os valores dos tempos de mistura obtidos para as diferentes agitações são significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ).

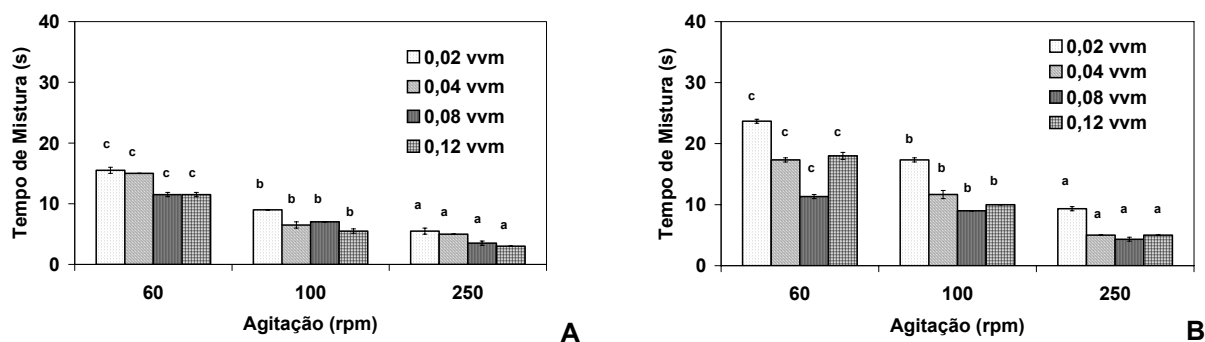


**Figura 5.5.** – Determinação dos tempos de mistura em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com um agitador em hélice, usando um dispersor de ar em L (**A**) e um dispersor poroso (**B**), para diferentes caudais de arejamento e agitação. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , letras diferentes para cada caudal de arejamento representam médias significativamente diferentes).

Assim, os tempos de mistura mais favoráveis foram obtidos para o dispersor poroso e para a agitação de 250 rpm.

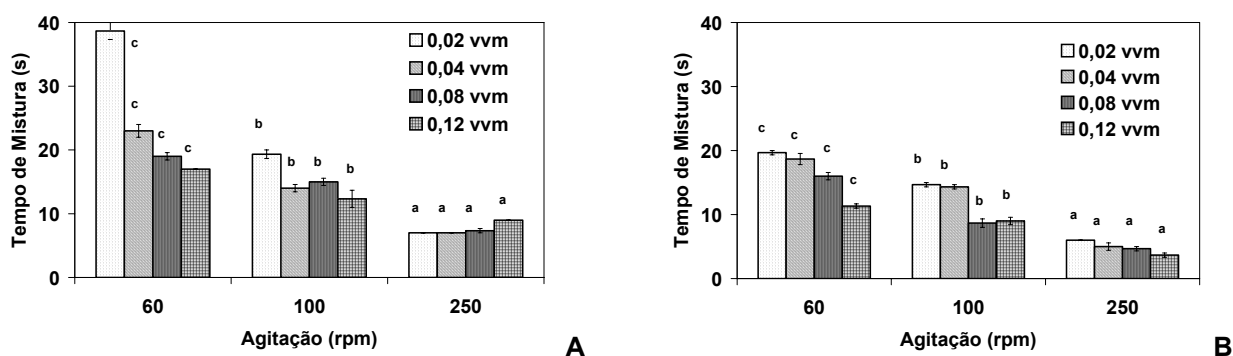
A figura 5.6. apresenta igualmente tempos de mistura, determinados nas condições referidas anteriormente, mas com dois agitadores em hélice. Contrariamente aos resultados obtidos anteriormente, os tempos de mistura determinados com dois agitadores em hélice e com o dispersor de ar poroso, são superiores aos obtidos com o dispersor em L, nas mesmas condições. Este resultado poderá ser devido às correntes que este tipo de agitador origina, promovendo o movimento axial da suspensão. Com a presença dos dois agitadores, as correntes cruzam-se podendo provocar uma maior turbulência da suspensão e conseqüentemente, uma maior quebra das bolhas de ar, libertadas pelo dispersor de ar em L, promovendo um aumento da área de contacto das bolhas e uma maior dispersão destas.

Este facto poderá ser devido a uma insuficiente transferência de massa no meio, originando um baixo grau de mistura da suspensão. Os tempos de mistura, apresentados na figura 5.6., para as diferentes velocidades de agitação, são significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ).

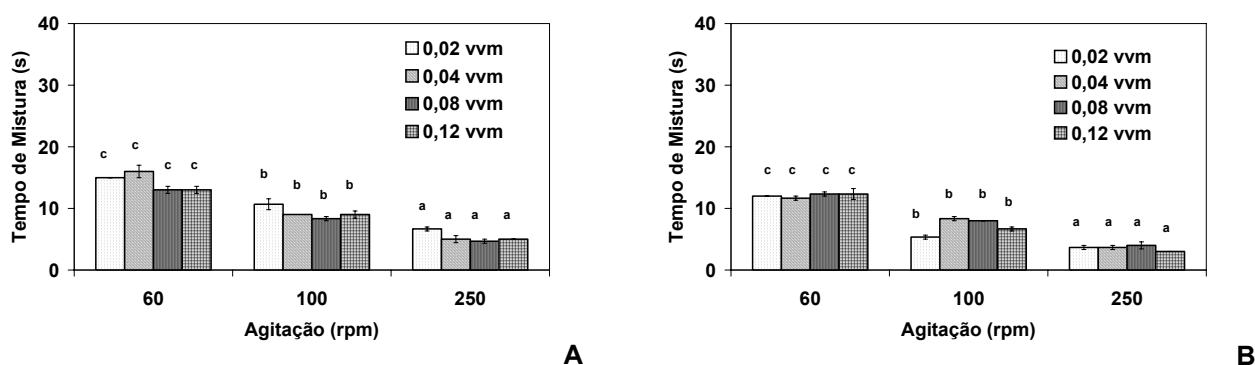


**Figura 5.6.** – Determinação dos tempos de mistura em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com dois agitadores em hélice, usando um dispersor de ar em L (A) e um dispersor poroso (B), para diferentes caudais de arejamento e agitação. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , letras diferentes para cada caudal de arejamento representam médias significativamente diferentes).

Os tempos de mistura, determinados com os dois dispersores de ar referidos e com uma e duas turbinas de Rushton são apresentados nas figuras 5.7. e 5.8, respectivamente. Verificamos, mais uma vez, que os valores deste parâmetro são superiores para o dispersor em L, comparativamente com os determinados com o dispersor poroso, tanto para uma turbina (figura 5.7.) como para duas turbinas de Rushton (figura 5.8.). No entanto, para duas turbinas, as diferenças dos tempos de mistura determinados, para os diferentes caudais de arejamento, não são significativas, de acordo com a análise estatística (Teste de Duncan,  $\alpha = 0,05$ , anexo G).



**Figura 5.7.** – Determinação dos tempos de mistura em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com uma turbina de Rushton, usando um dispersor de ar em L (A) e um dispersor poroso (B), para diferentes caudais de arejamento e agitação. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , letras diferentes para cada caudal de arejamento representam médias significativamente diferentes).



**Figura 5.8.** – Determinação dos tempos de mistura em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com duas turbinas de Rushton, usando um dispersor de ar em L (**A**) e um dispersor poroso (**B**), para diferentes caudais de arejamento e agitação. Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , letras diferentes para cada caudal de arejamento representam médias significativamente diferentes).

Gogate *et al.* (2000) num artigo de revisão sobre sistemas múltiplos de agitação em biorreactores, cita o trabalho de outros autores (Abardi *et al.*, 1988, Nocentini *et al.*, 1988), em que num sistema com apenas um agitador, os tempos de mistura são inferiores aos obtidos com dois agitadores. Segundo os autores, a transferência de massa entre as diversas correntes produzidas pelos agitadores poderá ser significativamente menor do que a corrente produzida pelo agitador individual (Gogate *et al.*, 2000). Também Vasconcelos *et al.* (2000) verificaram que os tempos de mistura para sistemas com dois agitadores são superiores, quando comparados com os sistemas com apenas um agitador.

Os valores dos tempos de mistura, determinados para o biorreactor de 2 L mecanicamente agitado com um dispersor em L, são significativamente inferiores aos obtidos para o biorreactor de 7 L, igualmente com o dispersor em L (figura 2.27.). Este facto, poderá dever-se aos caudais de arejamento usados serem superiores no biorreactor de 2 L, proporcionando uma melhor mistura. Outra possível explicação, são as diferentes relações das dimensões do tanque/agitador para os dois biorreactores, de 2 e 7 L, como se podem analisar na tabela 5.8.

**Tabela 5.8.** – Relações das dimensões dos biorreactores/agitadores de 2 e 7 L mecanicamente agitados e equipados com um dispersor de ar em L.

BIORREACTOR	$D_T / D_i$	$H_L / D_i$
2 L	2,00	2,17
7 L	2,94	3,42

As razões entre  $D_T/D_i$  e  $H_L/D_i$  são diferentes para os reactores de 2 e 7 L. Para o reactor biológico de 7 L, as razões entre  $D_T/D_i$  e  $H_L/D_i$  são superiores às obtidas para o biorreactor de 2 L, cerca de 32% e 37%, respectivamente. O aumento da razão entre o diâmetro do tanque e o diâmetro do agitador e a altura do líquido poderão originar uma deficiente homogeneização da suspensão, com a formação de zonas estagnadas.

### 5.3.2. Aumento de escala de 2 L para 7 L usando como critério o coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio ( $K_La$ )

Para proceder ao aumento de escala de 2 L para 7 L usou-se o critério  $K_La$  mantendo-o constante. Com este fim, foram realizados ensaios com o  $K_La$  3,9 h<sup>-1</sup>, valor utilizado no reactor biológico de 2 L, variando o arejamento e utilizando diferentes dispersores de ar.

#### 5.3.2.1. Efeito de diferentes dispersores de ar mantendo $K_La$ constante

Neste ensaio foi estudada a influência do tipo de dispersor de ar no crescimento das células em cultura de *Centaurea calcitrapa*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L, com um agitador em hélice. Utilizaram-se dois dispersores de ar, um em forma de L perfurado na base e outro poroso.

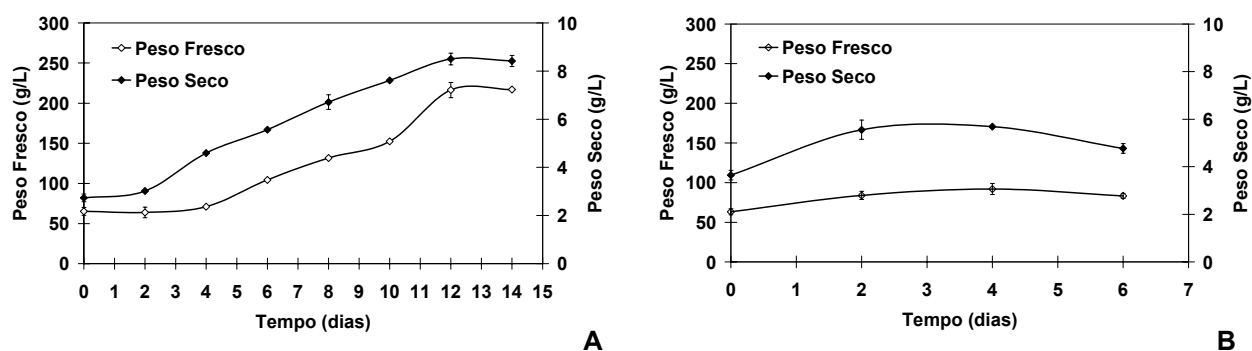
Para se proceder ao aumento de escala de 2 para 7 L, estabeleceu-se um ensaio com o reactor biológico de 7 L e  $K_La$  inicial de 3,9 h<sup>-1</sup>, comparando com os resultados obtidos da cultura de *C. calcitrapa*, que decorreu em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado, a um  $K_La$  inicial de 3,9 h<sup>-1</sup>. Esta fermentação encontra-se pormenorizadamente descrita no capítulo 2 desta dissertação.

Comparando as culturas de 2 e 7 L (tabela 5.9.), que decorreram em biorreactores com dispersores idênticos, em forma de L, verificou-se que o aumento de escala na cultura de *C. calcitrapa* proporcionou um ligeiro aumento na taxa específica de crescimento e na produtividade volumétrica de biomassa. No entanto, em termos de rendimento de biomassa, este é inferior relativamente à cultura que cresceu numa escala de 2 L. Igualmente, a

biomassa formada no reactor de 7 L é extremamente baixa, comparativamente com a obtida no biorreactor de 2 L. Analisando os perfis de crescimento (figura 5.9.), de ambas as culturas, verifica-se que a cultura que decorreu no biorreactor de 2 L teve uma fase exponencial com a duração de 10 dias e apresentou uma taxa específica de crescimento de  $0,090 \text{ dia}^{-1}$ . A cultura que decorreu no reactor biológico de 7 L apresentou uma taxa específica de crescimento de  $0,110 \text{ dia}^{-1}$ , com uma fase exponencial de apenas 2 dias. O seu ciclo de vida foi igualmente bastante curto, de apenas 6 dias, comparativamente com a duração normal do ciclo da *C. calcitraba*, que é de aproximadamente 14 dias em reactor biológico de 2 L (Raposo, 1997).

**Tabela 5.9.** – Parâmetros de crescimento das células em suspensão de *C. calcitraba*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado de 2 e 7 L, equipado com um agitador em hélice e com um  $K_{La}$  inicial de  $3,9 \text{ h}^{-1}$ .

VOLUME (L)	AGIT. (rpm)	AREJ. (vvm)	DISPERSOR	$\mu_g$ ( $\text{dia}^{-1}$ )	YX/s (g PS/g gluc)	PRODUT. (gPS/L.dia)	PS <sub>máx</sub> -PS <sub>i</sub> (g/L)	VISCOS. MÁX (Ns/m <sup>2</sup> )	K <sub>D</sub> ( $\text{dia}^{-1}$ )
2	100	0,083	em L	0,090	0,283	0,361	5,35	3,8E-2	0,030
7	100	0,120	em L	0,110	0,118	0,510	2,04	2,2E-2	0,082
7	100	0,020	poroso	0,153	0,268	0,820	6,38	1,2E-1	0,007



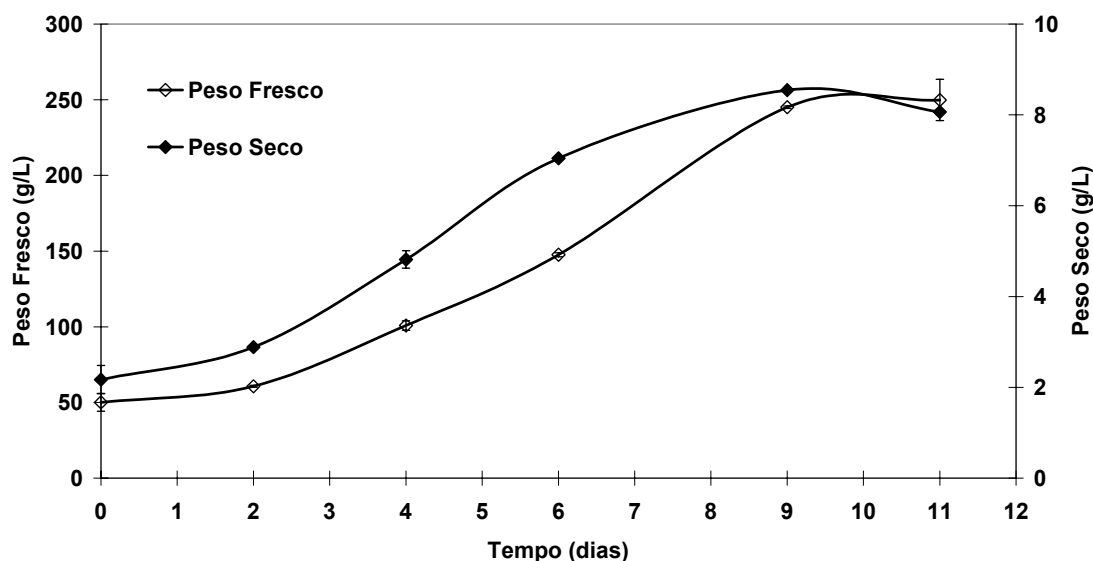
**Figura 5.9.** – Perfil de crescimento das células em suspensão de *C. calcitraba*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado, com idênticos dispersores de ar, em forma de L, e  $K_{La}$  igual a  $3,9 \text{ h}^{-1}$ : (A) Biorreactor de 2 L; (B) Biorreactor de 7 L. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

Com base nos parâmetros cinéticos, apresentados na tabela 5.9., no perfil de crescimento (figura 5.9.) e nas taxas respiratórias (figura 5.11.A) verificou-se uma nítida limitação ao crescimento na fase exponencial. Uma deficiente transferência de oxigénio, através de um

insuficiente fluxo do oxigénio no seio da cultura, indicou que o dispersor usado poderia ser inadequado no processo de aumento de escala das células de *C. calcitraba*. Assim, introduziu-se um dispersor de ar do tipo poroso. Os parâmetros de crescimento da cultura crescida com este tipo de dispersor encontram-se também na tabela 5.9.

As suspensões celulares cultivadas em reactor biológico de 7 L com o dispersor poroso (figura 5.10.) apresentaram um comportamento bastante distinto da cultura crescida com o dispersor em L. A taxa específica de crescimento foi de  $0,153 \text{ dia}^{-1}$ , tendo a fase exponencial a duração de 7 dias (figura 5.10.).

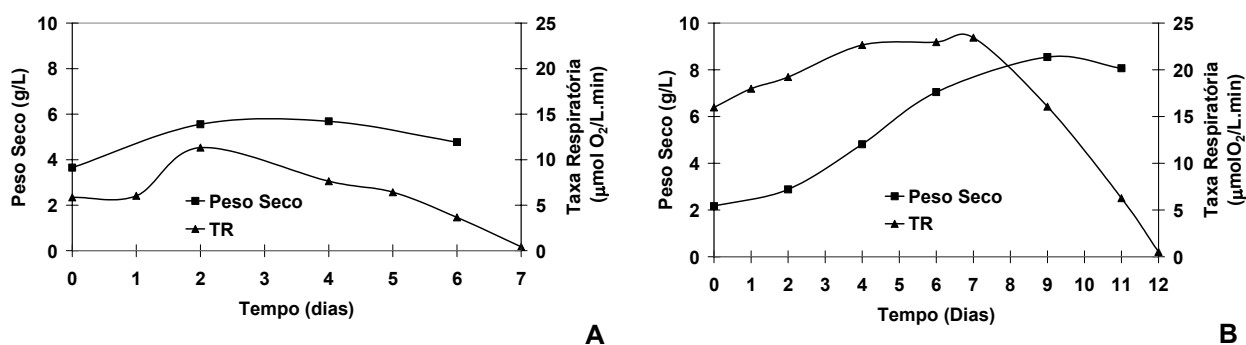
Relativamente aos parâmetros de crescimento (tabela 5.9.), a cultura crescida no vaso com um dispersor de ar poroso apresentou também um rendimento de biomassa e uma produtividade superiores à cultura com o dispersor em L. Em termos de biomassa máxima formada, foi significativa a diferença entre as duas culturas que decorreram com diferentes dispersores. A viscosidade aparente máxima, da cultura com o dispersor poroso, foi igualmente superior à da cultura com o dispersor em L. Pensa-se que, este aumento da viscosidade aparente esteja relacionado com o aumento da biomassa formada (tabela 5.9.).



**Figura 5.10.** – Perfil de crescimento das células em suspensão de *C. calcitraba*, cultivadas em reactor biológico de 7 L com um dispersor de ar poroso e um agitador em hélice. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

Analisando ainda a cultura que decorreu com o dispersor em L (figura 5.9.B), esta apresentou um ciclo de vida bastante curto, de apenas 6 dias, enquanto que a cultura que

decorreu com o dispersor poroso, teve um ciclo de 12 dias, como se pode observar na figura 5.10.. As células de *C. calcitraba* cultivadas no biorreactor de 7 L com o dispersor em L, apresentaram uma diminuição da taxa respiratória a partir do 2º dia de cultura (figura 5.11.A), enquanto que a taxa respiratória da cultura desenvolvida no biorreactor com o dispersor poroso, aumentou até ao 7º dia de cultura, seguindo-se então a diminuição desta até ao fim do ciclo de crescimento (figura 5.11.B).



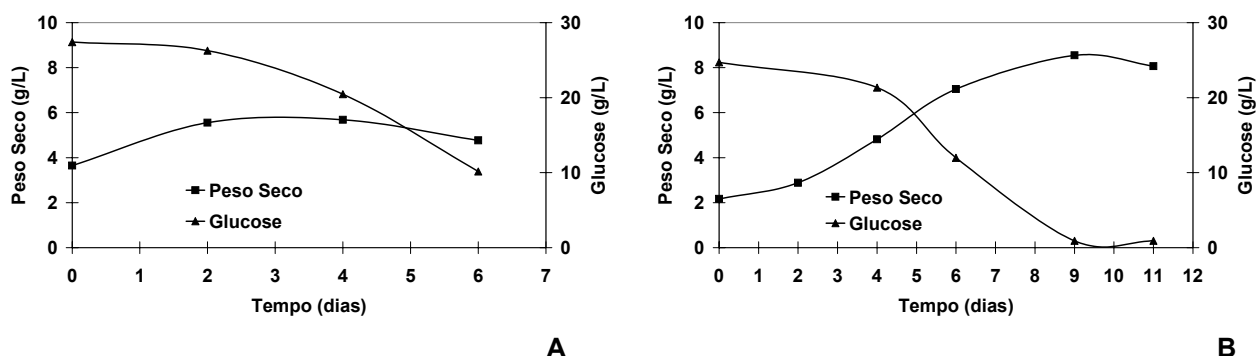
**Figura 5.11. –** Variação das taxas respiratórias das células em suspensão de *C. calcitraba*, cultivadas em reactor biológico de 7 L com um agitador em hélice: dispersor em L (A); dispersor poroso (B).

Os valores das taxas respiratórias da cultura que cresceu no biorreactor com o dispersor em L foram bastante inferiores aos obtidos das células crescidas com o dispersor de ar poroso. Esta discrepância de valores pode ser atribuída ao tamanho das bolhas de ar, libertadas pelos dois dispersores testados. Como já foi referido, o dispersor em L liberta bolhas de grandes dimensões, não se dando uma eficiente transferência de oxigénio no seio da cultura. A cultura cultivada no reactor biológico com o dispersor poroso apresentou boa capacidade respiratória, atingindo o valor de 23,44 μmol O<sub>2</sub>/L.min a meio da fase exponencial.

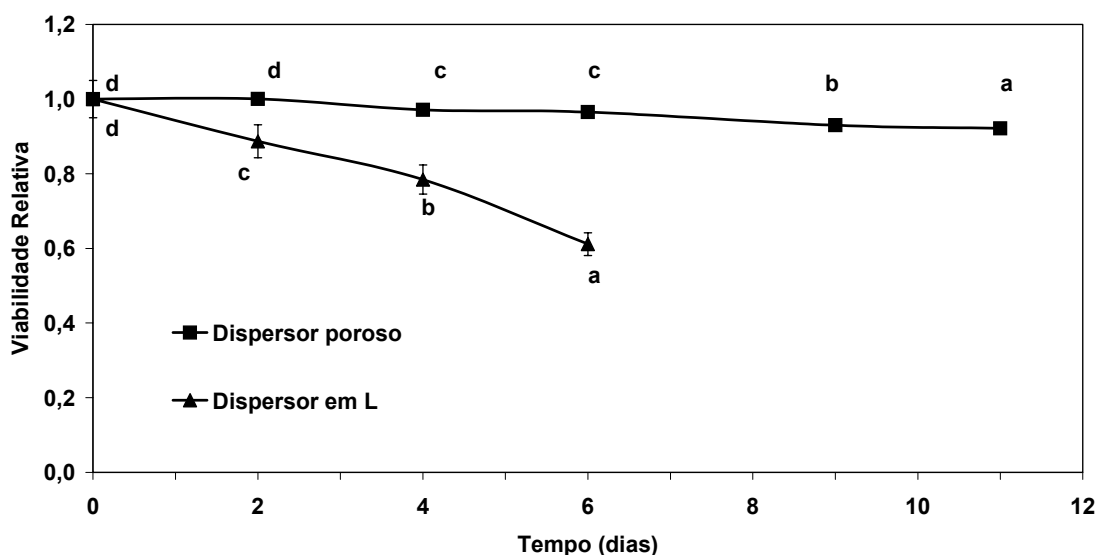
A figura 5.12. apresenta o consumo da fonte de carbono nas culturas cultivadas no biorreactor com um dispersor em L e um dispersor poroso. Analisando o consumo da fonte de carbono em ambas as culturas, constata-se que a cultura que decorreu com o dispersor em L não esgotou a fonte de carbono no final do ciclo de crescimento. O mesmo não aconteceu com a cultura que decorreu no vaso com o dispersor poroso, em que a glucose se esgotou no final da fase exponencial.

Os resultados obtidos das culturas cultivadas em biorreactores, utilizando diferentes dispersores de ar, sugerem que o dispersor poroso proporciona melhores condições para o crescimento das células em cultura de *C. calcitraba*. Estes resultados são claramente apoiados pela variação da viabilidade celular, de ambas as culturas, ao longo do ciclo de crescimento (figura 5.13.) e pelos valores das taxas específicas de morte celular,

apresentadas na tabela 5.9.. A viabilidade celular da cultura que cresceu no biorreactor com o dispersor em L, diminui ao longo do ciclo de crescimento, atingindo valores inferiores a 60 % no final da fase estacionária, com uma taxa específica de morte celular de  $0,082 \text{ dia}^{-1}$ . A cultura desenvolvida no reactor biológico com o dispersor poroso manteve a viabilidade elevada ao longo de todo o ciclo de crescimento, apresentando um valor de taxa específica de morte celular de  $0,007 \text{ dia}^{-1}$ .



**Figura 5.12.** – Consumo da fonte de carbono (glucose) ao longo do ciclo de crescimento das células de *C. calcitrapa*, cultivadas em reactor biológico de 7 L com um agitador em hélice: dispersor em L (A); dispersor poroso (B).



**Figura 5.13.** – Viabilidade celular relativa das células em cultura de *C. calcitrapa*, cultivadas em reactor biológico de 7 L, equipado com um agitador em hélice e com diferentes dispersores de ar,  $K_L a$  inicial de  $3,9 \text{ h}^{-1}$ . Valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n=3$ , Teste de Duncan,  $\alpha=0,05$ , letras diferentes representam médias significativamente diferentes).

De notar ainda que, para se obter um valor de  $K_L a$  equivalente, utilizou-se na cultura com o dispersor poroso um caudal de arejamento significativamente inferior (0,020 vvm) ao utilizado na cultura com dispersor em L (0,120 vvm), para igual agitação (100 rpm). Este facto deve-se, como já foi referido anteriormente, à geometria dos dispersores de ar e ao tamanho das bolhas de ar libertadas por cada tipo de dispersor (Parthasarathy *et al.*, 1992). Sabendo que os tempos de mistura são idênticos, nas condições de agitação / arejamento consideradas, e sendo este o parâmetro que mede a maior ou menor homogeneidade da cultura, é fundamental considerar o tamanho da bolha como a principal razão que condiciona a eficiência dos diferentes tipos de dispersores testados. Assim sendo, os futuros ensaios serão realizados apenas com o dispersor poroso, visto ter sido o dispersor de ar que reuniu as melhores condições para o desenvolvimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*.

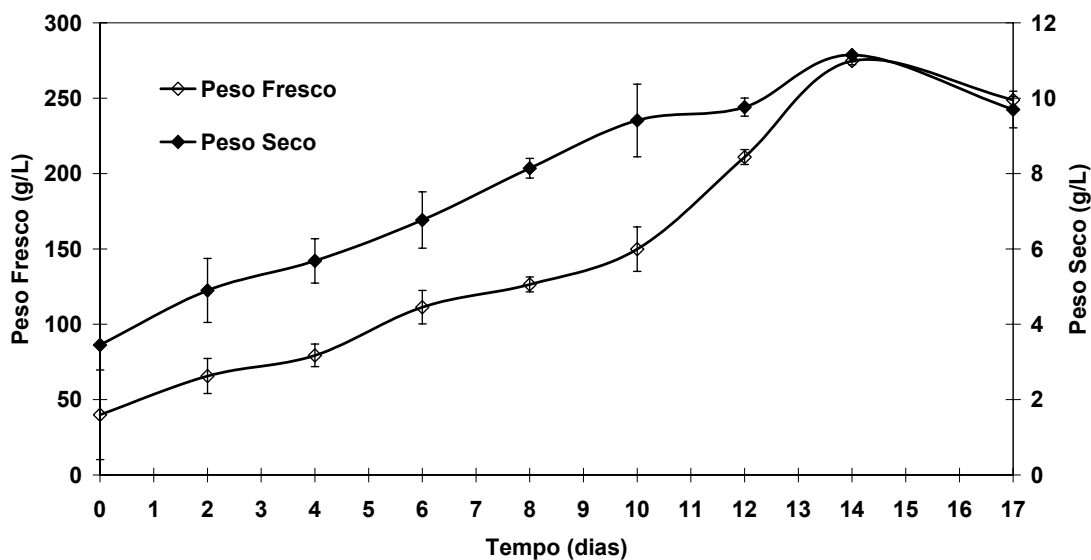
### 5.3.2.2. Efeito de diferentes tipos e número de agitadores mantendo constante o $K_L a$

Neste ensaio procedeu-se ao crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa* em reactor biológico de 7 L mecanicamente agitado com diferentes tipos de agitadores, uma turbina de Rushton e um agitador em hélice. Estudou-se também a influência do número de agitadores no crescimento celular. Nos diferentes crescimentos, o tipo de dispersor de ar usado foi o poroso.

Na figura 5.14. é apresentado o perfil de crescimento das células em cultura de *C. calcitrapa*, crescidas em reactor biológico de 7 L mecanicamente agitado, com uma turbina de Rushton. Este perfil é comparado com o perfil de crescimento da cultura cultivada no biorreactor de 7 L, com o agitador em hélice (figura 5.10.).

A suspensão de células de *C. calcitrapa* cultivada em biorreactor de 7 L com uma turbina de Rushton, apresenta uma longa fase exponencial de 10 dias enquanto que, a cultura crescida com o agitador em hélice tem uma fase exponencial de apenas 7 dias. Na tabela 5.10. são apresentados alguns dos parâmetros de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*. Comparando os crescimentos com diferentes agitadores, constatamos que a cultura com o agitador em hélice apresentou uma taxa específica de crescimento de  $0,153 \text{ dia}^{-1}$  enquanto a cultura desenvolvida no biorreactor com uma turbina de Rushton acoplada apresenta uma taxa específica de  $0,096 \text{ dia}^{-1}$ . Em termos de produtividade e rendimento de biomassa, a cultura com o agitador em hélice tem valores superiores à cultura com a turbina de Rushton. A actividade proteolítica específica máxima também é superior na cultura com o agitador em hélice, comparativamente com a cultura cultivada no

biorreactor com a turbina de Rushton. Os valores de biomassa formada, nas culturas com a turbina de Rushton e com o agitador em hélice, não diferem muito.



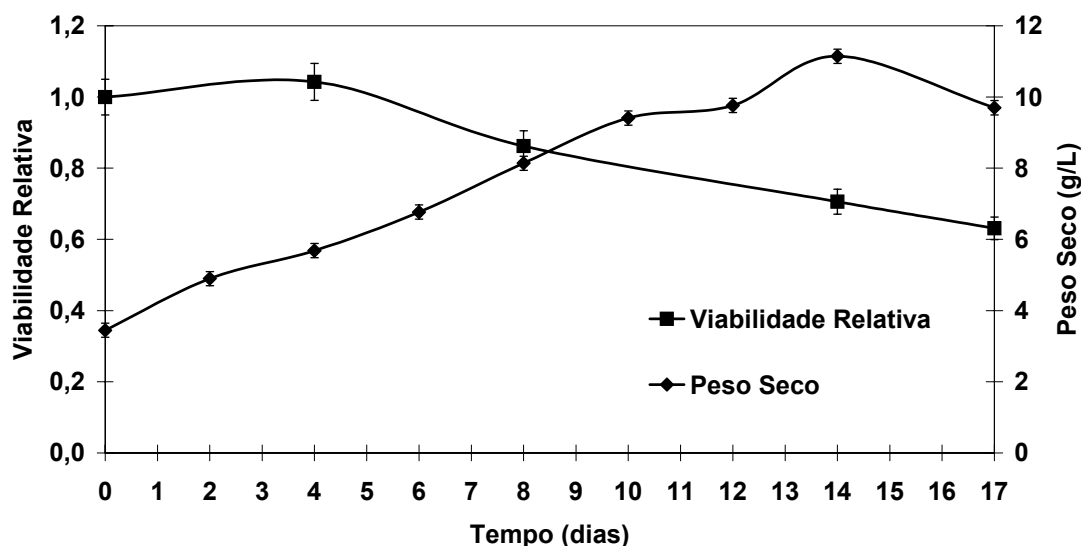
**Figura 5.14.** - Perfil de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas em reactor biológico de 7 L, a um  $K_L a$  de  $3,9 \text{ h}^{-1}$ , com uma turbina de Rushton e um dispersor poroso. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

**Tabela 5.10.** – Parâmetros de crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L com dispersor de ar poroso e diferentes tipos e número de agitadores.  $K_L a$  inicial de  $3,9 \text{ h}^{-1}$ .

AGIT. (rpm)	AREJ. (vvm)	AGITADOR	Nº AGIT	$\mu_g$ ( $\text{dia}^{-1}$ )	Yx/s (g PS/g gluc)	PRODUT. (gPS/L.dia)	PS <sub>máx</sub> -PS <sub>i</sub> (g/L)	ACTIVIDADE PROTEOL ESPEC MÁX (U/mg PS)	K <sub>D</sub> ( $\text{dia}^{-1}$ )
100	0,020	Rushton	1	0,096	0,207	0,539	7,70	169,62	0,027
250	0,020	Rushton	2	0,149	0,363	1,259	9,03	234,62	0,023
100	0,020	Hélice	1	0,153	0,268	0,820	6,38	214,33	0,007
250	0,020	Hélice	2	0,120	0,317	0,479	4,97	230,86	0,045

Comparando estes resultados, verificou-se que a cultura crescida no biorreactor equipado com a turbina de Rushton apresentou uma perda da viabilidade celular relativamente ao longo do ciclo de crescimento (figura 5.15.), observando-se uma perda de cerca 40% relativamente à

viabilidade inicial. O mesmo não se passa com a cultura desenvolvida no biorreactor com o agitador em hélice, como se pode constatar pela figura 5.13.. Igualmente, o valor da taxa específica de morte celular para a cultura com a turbina de Rushton foi bastante superior ( $0,027 \text{ dia}^{-1}$ ) ao obtido para a cultura com o agitador em hélice ( $0,007 \text{ dia}^{-1}$ ).



**Figura 5.15.** – Valores da viabilidade relativa das células em cultura de *C. calcitraba*, cultivadas em biorreactor mecanicamente agitado de 7 L, equipado com um dispersor de ar poroso e uma turbina de Rushton. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

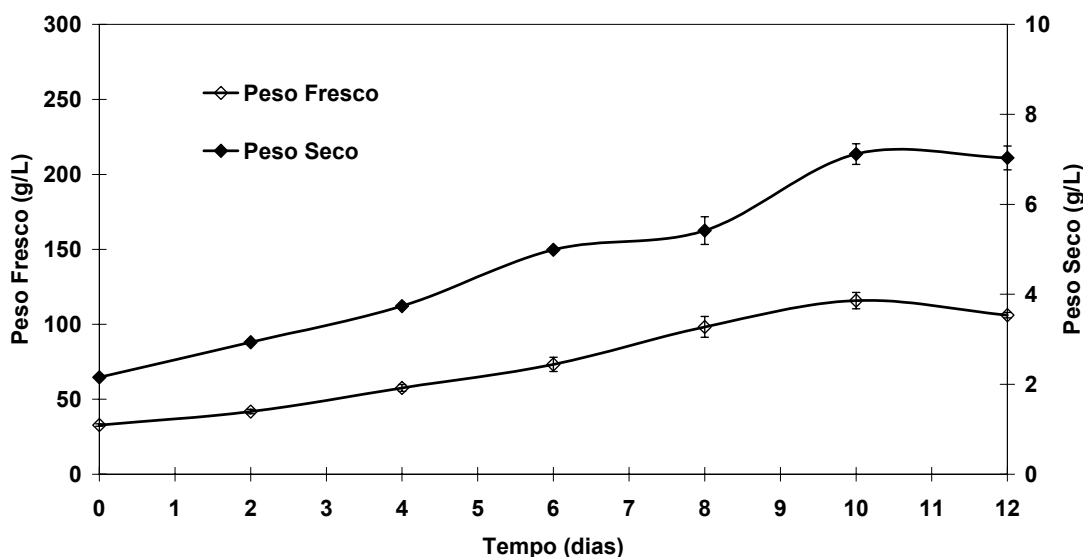
Tudo indica que o crescimento da suspensão celular de *C. calcitraba* em reactor biológico equipado com um agitador em hélice apresenta melhores condições para a produção de biomassa, do que o biorreactor com uma turbina de Rushton. As células em suspensão de *C. calcitraba*, cultivadas num biorreactor equipado com uma turbina de Rushton, poderão estar mais expostas a condições de stresse hidrodinâmico, do que as culturas que cresceram num reactor biológico com um agitador em hélice. Um dos grandes problemas das turbinas de Rushton é promoverem um fraco fluxo axial, resultando numa pobre mistura topo-base do biorreactor (Charles & Wilson, 1994). Também, a agitação diminui com a distância ao agitador, sendo esta diminuição mais pronunciada para suspensões viscosas, com comportamento pseudoplástico, como é o caso da suspensão de células de *C. calcitraba*, podendo inclusivé, aparecerem zonas estagnadas na suspensão. Os agitadores em hélice promovem fluxo axial, resultando numa boa mistura topo-base do reactor, facilitando a homogeneidade da suspensão (Charles & Wilson, 1994). Igualmente, verificou-se que os valores de  $K_L a$  determinados com um agitador em hélice (tabela 5.4.)

eram superiores aos obtidos com uma turbina de Rushton (tabela 5.6.), o que resulta numa mais eficaz transferência de massa no meio.

Leckie *et al.* (1991a) testaram o crescimento das células em suspensão de *Catharanthus roseus*, a elevadas velocidades de rotação, com dois tipos de turbinas, uma de pás direitas e outra de pás inclinadas. Verificaram que a cultura mantida no biorreactor com a turbina de pás inclinadas sofriam menor stresse, apresentando uma elevada taxa específica de crescimento e biomassa formada, comparativamente com a cultura cultivada com a turbina de pás direitas. Foi referido que o stresse hidrodinâmico a que a cultura foi sujeita era menor por a turbina de pás inclinadas não provocar uma quebra tão significativa dos agregados celulares como a de pás direitas.

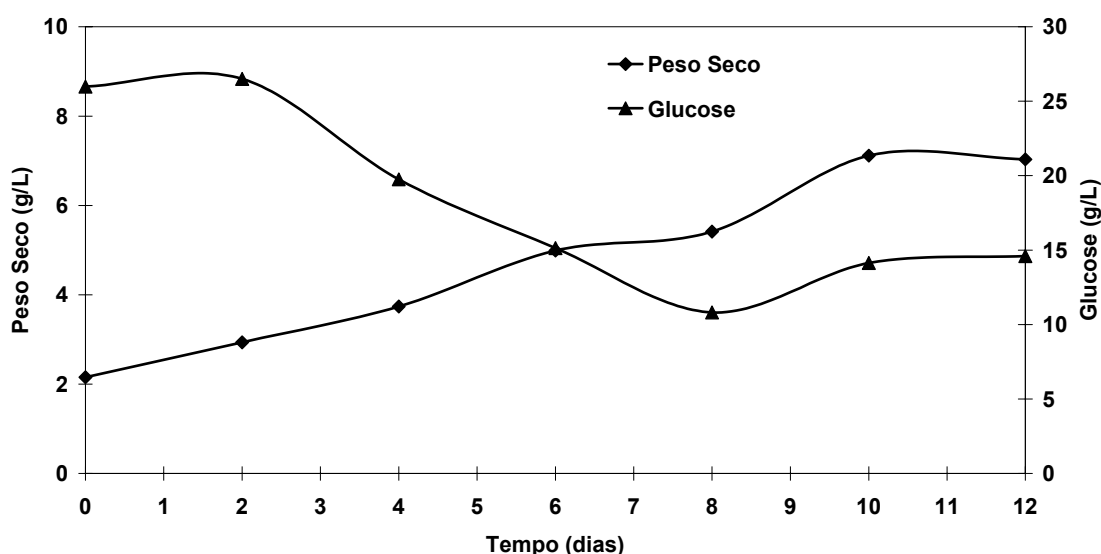
Igualmente, Chen & Huang (2000) testaram dois tipos de agitadores, no cultivo de células em suspensão de *Stizolobium hassjoo*, em biorreactor de 7 L. Os agitadores testados foram uma turbina de Rushton e um agitador de pás direitas. A turbina de Rushton retardou significativamente o crescimento celular, mas não a formação de produto (L-DOPA), para agitações entre os 200-300 rpm. Enquanto o agitador de pás direitas não afectou a produção de biomassa nem a de produto para agitações de 300 rpm. Este tipo de agitador provocou menor stresse às células.

Foram igualmente realizados ensaios com dois agitadores em hélice (figura 5.16.) e duas turbinas de Rushton (figura 5.19.), mantendo constante o  $K_La$  inicial a  $3,9 \text{ h}^{-1}$  (tabela 5.10.).



**Figura 5.16.** – Perfil de crescimento de uma cultura de *C. calcitrapa*, cultivada em reactor biológico de 7 L com dois agitadores em hélice e um dispersor poroso.  $K_La$  inicial de  $3,9 \text{ h}^{-1}$ . Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

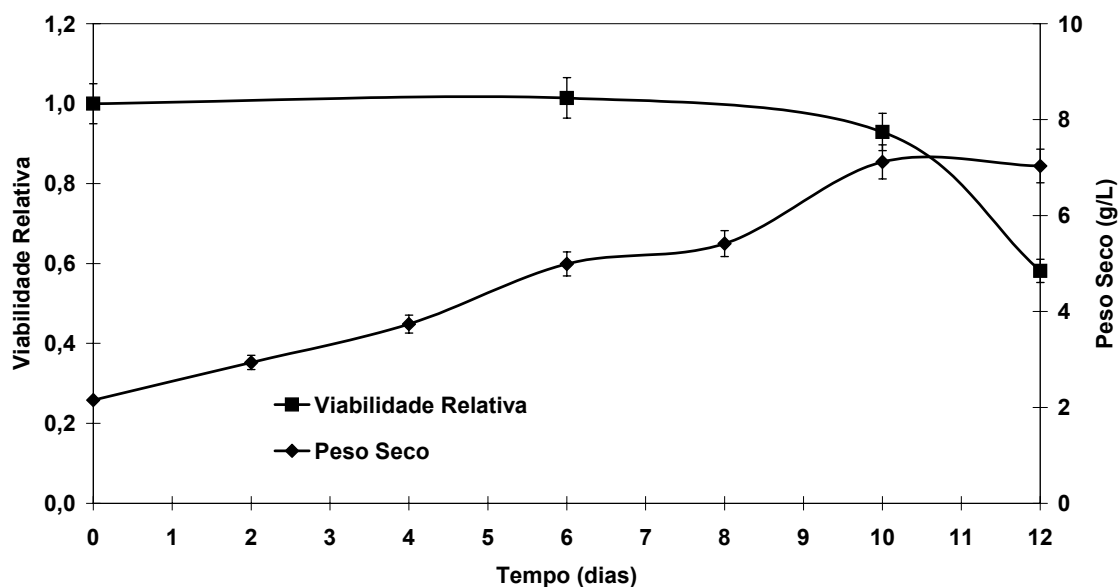
O perfil de crescimento da cultura crescida no biorreactor equipado com dois agitadores em hélice (figura 5.16.) apresentou uma fase exponencial de maior duração (10 dias) do que a cultura desenvolvida com apenas um agitador em hélice (7 dias) (figura 5.10.). Esta cultura não apresentou fase de adaptação, contudo, a taxa específica de crescimento, a produtividade de biomassa e a formação de biomassa foram inferiores às obtidas com apenas um agitador em hélice (tabela 5.10. e figura 5.10.). Analisando o consumo da fonte de carbono, verificou-se que não houve esgotamento desta durante todo o ciclo de crescimento (figura 5.17.). Estes dados podem ser indicativos de que as células poderiam estar expostas a maiores condições de stresse hidrodinâmico, devido à agitação. A viabilidade celular das células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas no biorreactor equipado com dois agitadores em hélice (figura 5.18.), apresentou-se elevada até ao fim da fase exponencial, diminuindo para valores da ordem dos 60 % de viabilidade, durante a fase estacionária de crescimento, o que indicia o elevado stresse hidrodinâmico no final da fase exponencial. Em termos de homogeneidade da cultura, os tempos de mistura determinados com dois agitadores em hélice (figura 5.5) são ligeiramente inferiores aos determinados com apenas uma hélice (figura 5.6).



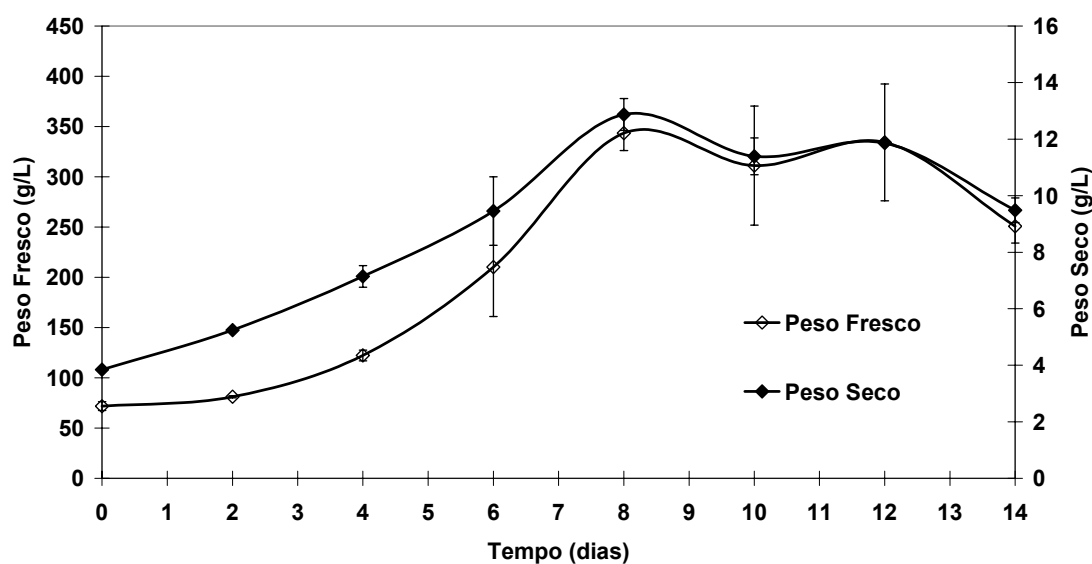
**Figura 5.17.** – Consumo da fonte de carbono (glucose) ao longo do ciclo de crescimento das células de *C. calcitrapa*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L, com dois agitadores em hélice e um dispersor poroso.  $K_La$  inicial de  $3,9 \text{ h}^{-1}$ .

O crescimento das células em suspensão num biorreactor com duas turbinas de Rushton (figura 5.19.) é o que apresenta melhores resultados, comparativamente com os restantes ensaios (tabela 5.10.). Apenas a taxa específica de crescimento é ligeiramente inferior à

obtida na cultura com um agitador em hélice. Os restantes parâmetros de crescimento, apresentados na tabela 5.10. são superiores.



**Figura 5.18.** – Viabilidade relativa das células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado de 7 L, com dois agitadores em hélice e um dispersor poroso.  $K_{La}$  inicial de  $3,9 \text{ h}^{-1}$ . Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.



**Figura 5.19.** – Variação do peso fresco e do peso seco da cultura de *C. calcitrapa*, cultivada em reactor biológico de 7 L equipado com duas turbinas de Rushton e um dispersor poroso.  $K_{La}$  inicial de  $3,9 \text{ h}^{-1}$ . Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

Em termos da viabilidade celular, a cultura cultivada no biorreactor com duas turbinas de Rushton, apresentou valores elevados ao longo de todo o ciclo de crescimento, variando estes entre 96 e 85 %.

A actividade proteolítica específica máxima (tabela 5.10.) foi determinada em todos os casos no final da fase exponencial, quando a sua produção é máxima (Raposo, 1997). Observou-se que a cultura que decorreu no biorreactor equipado com duas turbinas de Rushton foi a que apresentou maior actividade específica (234,62 U/mg PS). A cultura que decorreu no reactor biológico com uma só turbina de Rushton foi a que teve a actividade proteolítica mais baixa. As restantes culturas de células em suspensão de *C. calcitrapa* apresentaram valores semelhantes de actividade específica.

Comparativamente com os resultados obtidos do cultivo da suspensão de células de *C. calcitrapa* no reactor biológico de 2 L, com o aumento de escala para 7 L, tendo como critério a constância do  $K_L a$  ( $3,9 \text{ h}^{-1}$ ), houve uma melhoria nas condições de produção. Obteve-se um valor de taxa específica de crescimento significativamente superior, assim como de rendimento e produtividade de biomassa.

Com base nos ensaios realizados com diferentes agitadores e com mais do que um agitador, os resultados obtidos indicam que o biorreactor equipado com duas turbinas de Rushton e um dispersor de ar poroso é o sistema que reúne as melhores condições para a produção de biomassa e produção de enzimas com actividade proteolítica.

Sabe-se que, nos sistemas com mais do que um agitador, podem-se estabelecer parcialmente zonas isoladas de mistura. A extensão destas zonas isoladas depende da distância entre os agitadores, das dimensões do reactor e dos agitadores. Depende ainda, das características da suspensão, do caudal de arejamento e da velocidade do agitador, podendo estas características serem alteradas ao longo do processo fermentativo. Ainda, como consequência desta heterogeneidade na mistura da suspensão, poderemos assistir à formação de gradientes em termos de nutrientes e ambientais (pH) e ao decréscimo da produtividade e dos rendimentos de biomassa (Charles & Wilson, 1994). Uma forma de promover a mistura da suspensão e manter uma boa transferência de oxigénio, é usar uma turbina de Rushton na posição mais perto da base do reactor e um agitador axial, por exemplo um agitador em hélice, no topo do vaso (Charles & Wilson, 1994).

Igualmente, os problemas de mistura podem ser minimizados mantendo a razão altura do líquido/diâmetro do tanque ( $H_L/D_T$ ) igual a 2 e espaçando os agitadores apropriadamente. Se os agitadores estão muito próximos, estes interferem um com o outro ao nível das correntes que formam, havendo uma diminuição da potência transmitida, da transferência de oxigénio e da qualidade de mistura. Se os agitadores se encontram muito espaçados, igualmente a

homogeneidade da cultura é posta em causa. Na maior parte dos casos, o espaçamento entre 1 e 1,5 do diâmetro do agitador dá bons resultados na mistura das suspensões, não sendo afectada a transferência de oxigénio com este espaçamento (Charles & Wilson, 1994).

Neste estudo apenas foram ensaiadas condições para 10 cm de distância entre os agitadores, utilizando-se dois agitadores iguais. Assim, seria importante a realização de estudos combinando diferentes agitadores, numa mesma cultura e ensaios com diferentes distâncias entre estes.

Rocha-Valadez *et al.* (2000) avaliaram o efeito do stresse hidrodinâmico no crescimento do fungo *Trichoderma harzianum* usando três configurações de agitadores-difusores de ar, tendo como fonte de carbono óleo de rícino. Os difusores de ar usados foram em anel, poroso e com 5 orifícios em combinação com duas turbinas de Rushton e uma turbina de Rushton no topo do vaso e um agitador em hélice na base deste. O difusor de ar com 5 orifícios em combinação com as duas turbinas de Rushton originaram no crescimento deste fungo uma fase de adaptação longa e um baixo  $K_{La}$ , devido à fraca mistura e pequena área interfacial gás-líquido desenvolvida. O  $K_{La}$  mais elevado foi obtido para o dispersor de ar poroso com a combinação turbina de Rushton e agitador em hélice, devido à existência de uma considerável área interfacial de contacto das bolhas de ar com o meio de crescimento. No entanto, observaram-se limitações no crescimento do fungo, como consequência da deficiente concentração de substrato disponível, devido a se ter formado uma emulsão ar-óleo no topo do tanque. A melhor situação de compromisso entre a mistura de fases, a transferência de oxigénio ( $K_{La}$ ) e o crescimento do fungo foi obtido com o dispersor de ar em anel e o sistema turbina de Rushton no topo e agitador em hélice na base do vaso.

### 5.3.2.3. Parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico

Tal como para as culturas cultivadas em reactor biológico de 2 L em diferentes condições operacionais, determinaram-se igualmente alguns parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico gerado pelos diferentes agitadores nas culturas de *C. calcitrapa*, cultivadas em biorreactor de 7 L (tabela 5.11.). Os parâmetros quantificados foram a potência volumétrica (P/V) transmitida pelo agitador, a energia dissipada média ( $\bar{\varepsilon}$ ), a velocidade da ponta do agitador ( $v_i$ ) e a velocidade de corte média ( $\gamma_{MÉDIA}$ ). Segundo Midler & Finn (1966), a velocidade de corte máxima é traduzida pelo cálculo da velocidade da ponta do agitador.

Nas culturas crescidas em reactor biológico de 7 L, mantendo constante o  $K_{La}$  igual a  $3,90 \text{ h}^{-1}$ , verificou-se, em geral, o aumento da potência volumétrica transmitida pelo agitador

e da energia dissipada média, entre o início e o final do ciclo de crescimento das células em suspensão de *C. calcitraba* (tabela 5.11.).

**Tabela 5.11.** – Parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico nas células em suspensão de *C. calcitraba*, crescidas em reactor biológico de 2 (assinalada com \*) e 7 L mecanicamente agitado, com diferentes dispersores de ar e agitadores, mantendo constante o  $K_{La}$  ( $3,9 \text{ h}^{-1}$ ).

AGITAÇÃO (rpm)	AREJAM (vvm)	AGITADOR DISPERSOR	Nº AGIT		P/V (W/m <sup>3</sup> )	$\bar{\varepsilon}$ (W/Kg)	$\gamma_{MÉDIA}$ (s <sup>-1</sup> )	$v_i$ (m/s)
100*	0,083*	Pás Inclín* em L*	1*	Início	1,201*	$1,153 \times 10^{-3} *$	16,667*	0,314*
				Fim	1,968*	$1,920 \times 10^{-3} *$		
100	0,120	Hélice em L	1	Início	0,517	$5,036 \times 10^{-4}$	16,667	0,314
				Fim	0,503	$4,900 \times 10^{-4}$		
100	0,020	Hélice poroso	1	Início	0,370	$3,600 \times 10^{-4}$	16,667	0,314
				Fim	1,072	$1,044 \times 10^{-3}$		
250	0,020	Hélice poroso	2	Início	8,690	$8,549 \times 10^{-3}$	41,667	0,785
				Fim	12,578	$12,374 \times 10^{-3}$		
100	0,020	Rushton poroso	1	Início	2,495	$2,448 \times 10^{-3}$	16,667	0,314
				Fim	3,081	$3,024 \times 10^{-3}$		
250	0,020	Rushton poroso	2	Início	61,930	$60,750 \times 10^{-3}$	41,667	0,785
				Fim	84,847	$83,250 \times 10^{-3}$		

Na tabela 5.11., são apresentados os dados da cultura que decorreu no biorreactor de 2 L com um  $K_{La}$  de  $3,90 \text{ h}^{-1}$ , sendo estes comparados com os resultados obtidos nos ensaios efectuados com o reactor biológico de 7 L, equipado com um agitador em hélice. Os valores da potência volumétrica transmitida pelo agitador e da energia dissipada média são significativamente superiores no biorreactor de 2 L, equipado com um agitador de pás inclinadas. Este sistema de agitação exerceu maiores forças de tensão, do que o sistema em hélice, originando maior stresse hidrodinâmico nas culturas de *C. calcitraba*.

Hooker *et al.* (1990) testaram diferentes tipos de agitadores no cultivo de células em suspensão de *Nicotiana tabacum*. Verificaram que o agitador tipo hélice provocava menor stresse hidrodinâmico nas células do que o agitador de pás planas. As células cultivadas em reactor com agitador em hélice não apresentaram fragmentos de células no meio de cultura, associado a danos celulares. O mesmo não se verificou com a cultura desenvolvida no biorreactor com o sistema de pás planas. Resultados similares foram obtidos neste trabalho

com as células em suspensão de *C. calcitrapa*, crescidas em biorreactor com os diferentes agitadores. Como já foi referido anteriormente, as células cultivadas no biorreactor com o agitador em hélice não apresentaram perda de viabilidade celular ao longo do ciclo de crescimento (figura 5.13.), ao contrário do que se verificou com as células cultivadas com a turbina de Rushton (figura 5.15.), que apresentam uma redução de 40 % em relação à viabilidade inicial.

As culturas que decorreram com dois agitadores apresentam valores da potência volumétrica e da energia dissipada média consideravelmente mais elevados, comparativamente com os restantes ensaios, sugerindo a existência de forças de tensão de maior intensidade sobre as células em suspensão e conseqüentemente, maior stresse hidrodinâmico.

Analisando ainda os diferentes ensaios realizados, constatamos que as culturas que decorreram nos reactores biológicos equipados com as turbinas de Rushton, quer com uma ou com duas turbinas, têm valores de energia dissipada média e de potência volumétrica transmitida pelo(s) agitador(es) superiores aos obtidos com o agitador em hélice, quando equipados quer com um ou com dois agitadores. Sendo a energia dissipada média e a potência volumétrica transmitida pelo agitador dois parâmetros que permitem avaliar o stresse hidrodinâmico a que a suspensão celular se encontra sujeita, pode-se afirmar que as células em suspensão de *C. calcitrapa* se encontram expostas a um maior stresse no biorreactor equipado com a turbina de Rushton. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Chen & Huang (2000), com células em cultura de *Stizolobium hassjoo*, quando cultivadas num biorreactor de 7 L com uma turbina de Rushton e com um agitador de pás direitas. A turbina de Rushton retarda significativamente o crescimento celular comparativamente com o agitador de pás. Segundo estes autores, tendo em conta o índice da força de tensão, o efeito nas células em suspensão que a turbina de Rushton a 200 rpm provoca é equivalente ao do agitador de pás planas a 300 rpm. A 300 rpm, as células em suspensão, crescidas no biorreactor equipado com o agitador de pás, apresentaram elevadas taxa específica e concentração final de biomassa, enquanto que as células cultivadas num biorreactor com uma turbina de Rushton apresentaram-se danificadas (Chen & Huang, 2000).

Wang & Zhong (1997) compararam a eficiência de dois tipos de agitadores na transferência de oxigénio. Observaram que o agitador tipo centrífuga era mais eficiente do que o convencional agitador de pás planas, para velocidades de agitação inferiores a 300 rpm. Também constataram que, para velocidades de agitação de 200 e 300 rpm, o novo tipo de agitador provocava menor stresse nas células do que o agitador de pás, sendo este avaliado por alterações no tamanho de partículas de agar, usadas para simular agregados celulares.

Da tabela 5.11. decorre ainda que os valores da velocidade de corte média ( $\gamma_{MÉDIA}$ ), da velocidade da ponta do agitador ( $v_i$ ) e conseqüentemente, da velocidade de corte máxima são iguais para as culturas que decorreram a 100 ou a 250 rpm, visto estes parâmetros serem função apenas da velocidade de agitação. Não relacionam as características da suspensão, nem o tipo de agitador, nem as condições operacionais em que a cultura se encontra. Assim sendo, não são bons indicadores do estado de stresse a que a cultura se encontra. Tanto a potência volumétrica transmitida pelo agitador como a energia dissipada média têm em conta as características da suspensão celular e o tipo de agitador. Estes dois parâmetros são potenciais indicadores do stresse hidrodinâmico, permitindo avaliar os danos que a suspensão celular se encontra sujeita.

### 5.3.3. Aumento de escala de 2 L para 7 L usando como critério a velocidade do agitador ( $\pi ND_i$ )

A velocidade da ponta do agitador ( $v_i$ ) é habitualmente usada como critério no aumento de escala de um processo de produção, principalmente no caso de fermentações de micélios com elevada viscosidade (Mijnbeek & Oosterhuis, 1992), devido à sensibilidade dos microrganismos às forças de tensão.

Neste ensaio, procedeu-se ao aumento de escala de 2 para 7 L das células em cultura de *Centaurea calcitrapa*, cultivadas em reactor biológico mecanicamente agitado, usando como critério a manutenção da velocidade da ponta do agitador. As velocidades testadas para proceder ao aumento de escala foram 0,314 e 0,785 m/s, encontrando-se os respectivos parâmetros de crescimento das células de *C. calcitrapa*, para cada uma destas velocidades, nas tabelas 5.12. e 5.13.

Analisando os dados de crescimento referentes à  $v_i = 0,314$  m/s, verificamos que a cultura de *C. calcitrapa* que apresenta melhores resultados foi a que decorreu no biorreactor de 7 L equipado com um agitador em hélice. Em termos de taxa específica de crescimento, rendimento e produtividade de biomassa é a que apresenta valores mais elevados, comparativamente com a cultura de 2 L e com a cultura que cresceu no biorreactor de 7 L com uma turbina de Rushton. No entanto, com o aumento de escala, observou-se uma nítida perda da actividade proteolítica específica máxima, embora ligeiramente inferior quando se utilizou o agitador em hélice. Estas perdas de actividade proteolítica devem-se a diferenças na transferência de massa de oxigénio. Takei *et al.* (1975) estudaram a produção de uma protease pela *Streptomyces* sp., com o aumento de escala de 0,03 m<sup>3</sup> para 0,2 m<sup>3</sup>. Verificaram que com o aumento de escala a produção de protease diminuía, estando esta dependente da taxa de transferência de oxigénio. No caso deste ensaio, o  $K_{La}$  para as

diferentes culturas foi semelhante (tabela 5.12.), no entanto, outros factores poderão ter interferido na transferência de oxigénio, como sendo os diferentes tipos de agitadores usados nestas culturas.

**Tabela 5.12.** – Parâmetros de crescimento referentes ao aumento de escala de 2 L para 7 L das células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas em biorreactor mecanicamente agitado, com um agitador, usando como critério  $v_i = 0,314$  m/s.

VOLUME (L)	AGITADOR	$K_{LA}$ ( $h^{-1}$ )	$\mu_g$ ( $dia^{-1}$ )	YX/s (g PS/g gluc)	PRODUT. (gPS/L.dia)	PS <sub>máx</sub> -PS <sub>i</sub> (g/L)	ACTIVIDADE PROTEOL ESPEC MÁX (U/mg PS)	VISCOS. MÁX (Ns/m <sup>2</sup> )
2	Pás Inclín	3,9	0,090	0,283	0,361	5,35	325,34	3,8E-2
7	Rushton	4,0	0,096	0,207	0,539	7,70	169,62	1,2E-1
7	Hélice	3,9	0,153	0,268	0,820	6,38	214,33	1,2E-1

Com o aumento de escala, tanto a cultura com o agitador em hélice como com a turbina de Rushton, apresentam uma taxa específica de crescimento e produtividade de biomassa superiores à obtida no biorreactor de 2 L. Igualmente, o aumento da viscosidade aparente é consequência do aumento da biomassa formada. Apenas o rendimento de biomassa da cultura com uma turbina de Rushton é ligeiramente inferior à do biorreactor de 2 L.

**Tabela 5.13.** – Parâmetros de crescimento referentes ao aumento de escala de 2 L para 7 L das células em suspensão de *C. calcitrapa*, cultivadas em biorreactor mecanicamente agitado, usando como critério  $v_i = 0,785$  m/s..

VOLUME (L)	AGITADOR	$K_{LA}$ ( $h^{-1}$ )	$\mu_g$ ( $dia^{-1}$ )	YX/s (g PS/g gluc)	PRODUT. (gPS/L.dia)	PS <sub>máx</sub> -PS <sub>i</sub> (g/L)	ACTIVIDADE PROTEOL ESPEC MÁX (U/mg PS)	VISCOS. MÁX (Ns/m <sup>2</sup> )
2	Pás Inclín	18,6	0,184	0,296	0,789	5,67	84,99	5,4E-2
7*	Rushton*	4,2	0,149	0,363	1,259	9,03	234,62	2,0E-1
7*	Hélice*	3,7	0,120	0,317	0,479	4,97	230,86	3,1E-2

\* Biorreactor equipado com dois agitadores.

Para a velocidade da ponta do agitador de 0,785 m/s, a cultura que apresentou melhores resultados foi a que decorreu no reactor biológico equipado com duas turbinas de Rushton. Embora a taxa específica de crescimento seja inferior à do reactor de 2 L, é importante notar que este parâmetro na cultura crescida no biorreactor de 2 L foi determinado com base numa fase exponencial curta, de apenas 6 dias (figura 2.30), comparativamente com as restantes culturas realizadas. Tanto o rendimento de biomassa como a produtividade, a biomassa formada e actividade proteolítica específica máxima são superiores na cultura crescida no biorreactor de 7 L com duas turbinas de Rushton. A viscosidade aparente da cultura é igualmente mais elevada nesta cultura. No entanto, tendo em conta os parâmetros de quantificação do stresse hidrodinâmico (tabela 5.11.), a cultura crescida no biorreactor de 7 L com duas turbinas de Rushton apresentou uma elevada energia dissipada média, comparativamente com as restantes culturas. Este dado é indicador do elevado stresse hidrodinâmico a que a cultura se encontrou exposta, não sendo contudo, a viabilidade celular relativa afectada. Este parâmetro manteve-se elevado durante todo o ciclo de crescimento, variando entre 96 e 85 %. Estes dados sugerem que quando se utilizam velocidades de agitação elevadas (250 rpm), o crescimento celular e a produção de enzimas com actividade proteolítica é favorecido num biorreactor mecanicamente agitado com duas turbinas de Rushton.

Para baixas velocidades de agitação (100 rpm), os dados apresentados são indicadores de que o aumento de escala da cultura de *C. calcitrata* de 2 para 7 L, num biorreactor mecanicamente agitado é mais eficiente com a utilização de um sistema em hélice. Estes resultados são concordantes com os obtidos, quando o critério para o aumento de escala é o  $K_L a$  constante. Os resultados dos ensaios realizados são indicativos de que existem diferenças importantes no processo de aumento de escala quando se utilizam velocidades de agitação diferentes.

#### 5.4. CONCLUSÕES

Neste capítulo procedeu-se ao aumento de escala, em reactor mecanicamente agitado de 2 para 7 L, das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*. Com este objectivo, seleccionou-se como critério para proceder ao aumento de escala a manutenção do  $K_{La}$  e da velocidade da ponta do agitador ( $v_i$ ). Assim, da execução deste trabalho podem-se tirar as seguintes conclusões:

1. Para baixas velocidades de agitação (100 rpm), o sistema que reúne as melhores condições para o crescimento das células em suspensão de *C. calcitrapa* é o biorreactor equipado com um agitador em hélice e um dispersor de ar poroso. Ambos os critérios usados no aumento de escala ( $K_{La}$  e  $v_i$ ) são concordantes com este resultado.
2. Para elevadas velocidades de agitação (250 rpm), tanto o critério do  $K_{La}$  e  $v_i$  constante, indicam que o biorreactor mecanicamente agitado com duas turbinas de Rushton e um dispersor poroso é o que proporciona melhores condições para o crescimento celular da suspensão de *C. calcitrapa*. Apesar do elevado stresse hidrodinâmico a que a cultura se encontra exposta, sendo quantificado pela energia dissipada média e pela potência volumétrica transmitida pelo agitador, a viabilidade das células não é afectada.
3. O dispersor de ar poroso em biorreactor de 7 L proporcionou um melhor desenvolvimento da cultura, comparativamente com a cultura cultivada num biorreactor com um dispersor em L, para igual  $K_{La}$ .

O projecto de aumento de escala de produção em laboratório está fortemente dependente da velocidade de agitação do sistema. Para baixas velocidades de agitação sugere-se a utilização de apenas um agitador em hélice, enquanto que para elevadas velocidades de agitação a introdução de duas turbinas de Rushton conferem um melhor crescimento das células em suspensão.

**5.5. REFERÊNCIAS**

- Atkinson, B. & Mavituna, F. (1991) "Gas-Liquid Mass Transfer and Mixing" in *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, 2<sup>nd</sup> ed., Macmillan, Basingstoke.
- Charles, M. & J. Wilson (1994) "Fermentor Design" in *Bioprocess Engineering – Systems, Equipment and Facilities*, 5-67, Wiley Interscience Publications, John Wiley and Sons Inc.
- Chen, S. Y. & S. Y. Huang (2000) Shear stress effects on cell growth and L-DOPA production by suspension culture of *Stizolobium hassjoo* cells in an agitated bioreactor. *Bioproc. Eng.* **22**: 5-12.
- Doran, P. (1998) "Fluid Flow and Mixing" in *Bioprocess Engineering Principles*, 129-163, Academic Press.
- Enfors, S.-O. & Häggström, L. (1998) "Scale-up of Aerobic Processes" in *Bioprocess Technology: Fundamentals and Applications*, 159-169, Royal Institute of Technology, Stockholm.
- Gogate, P. R., A. A. Beenackers & A. B. Pandit (2000) Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. *Biochem. Eng. J* **6**: 109-144.
- Ho, C.-H., K. Henderson & G. Rorrer (1995) Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **11**: 140-145.
- Hooker, B. S., J. M. Lee & G. An (1990) Cultivation of plant cells in a stirred vessel: effect of impeller design. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 296 – 309.
- Kato, A., Y. Shiozawa & S. Nagai (1975) Effect of initial  $K_La$  on growth of tobacco cells. *J. Ferment Technol.* **53**: 744 – 751.
- Keßler, M., H. J. ten Hoopen, J. J. Heijnen & S. Furusaki (1997)  $O_2$  uptake rate measurements as a novel tool to study shear effects on suspended strawberry cells. *Biotechnol Tech.* **11**: 507 – 510.
- Konstas, J. & S. Kintzios (2003) Developing a scale-up system for the micropropagation of cucumber (*Cucumis sativus* L.): the effect of growth retardants, liquid culture and vessel size. *Plant Cell Rep.* **21**: 538-548.
- Leckie, F., A. H. Scragg & K. R. Cliffe (1991a) Effect of impeller design and speed on the large-scale cultivation of suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Enzyme Microb. Tech.* **13**: 801 – 810.
- Leckie, F., A. H. Scragg & K. C. Cliffe (1991b) An investigation into the role of initial  $K_La$  on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 364 – 370.
- Lowe, D. A. (2001) "Production of enzymes" in *Basic Biotechnology*, 390 – 408, Editors Colin Ratledge & Bjørn Kristiansen, 2<sup>nd</sup> ed, Cambridge University Press.
- Menisher, T., M. Metghalchi & E. B. Guttoff (2000). Mixing studies in bioreactors. *Bioproc. Eng.* **22**: 115-120.
- Midler, M. & R. K. Finn (1966) A model system for evaluating shear in the design of stirred fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **8**: 71 – 84.
- Mijnbeek, G. & N. M. G. Oosterhuis (1992) "Strategies for scale-up" in *Bioreactor Design and Product Yield*, 7-48, Open Universiteit and Thames Polytechnic, Butterworth Heinemann.
- Nienow, A. W. (1998) "Stirred tank biorreactors" in *Bioprocess Engineering Course*, 235-260, European Federation of Biotechnology, Editor M. Berovič, Supetar, Island of Brac, Croatia.

- Nordkvist, M., T. Grotkjaer, J. Hummer & J. Villadsen (2003) Applying rotary jet heads for mixing and mass transfer in a forced recirculation tank reactor system. *Chem. Eng. Sci.* **58**: 3877-3890.
- O'Kennedy, R. D., J. M. Ward & E. Keshavarz-Moore (2003) Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**: 83-90.
- Oniscu, C., A. I. Galaction & D. Cascaval (2003) The characterization of mechanical mixing bioreactors efficiency. *Rev. Chim.* **54**: 241-249.
- Pan, Z.-W. & H.-Q. Wang, Zhong, J.-J (2000) Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. *Enzyme Microb. Tech.* **27**: 714-723.
- Parthasarathy, R., N. Ahmed & G. J. Jameson (1992) The effect of impeller type on gas holdup in stirred vessels. *Trans IChemE.* **70**: 37 – 43.
- Pestchanker, L. J., S. C. Roberts & M. L. Shuler (1996) Kinetics of taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type bioreactor. *Enzyme Microb. Tech.* **19**: 256 – 260.
- Raposo, S. (1993) Proteases com actividade coagulante do leite obtidas a partir de culturas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*- Extração, purificação e caracterização. *Tese de Licenciatura*. Universidade do Minho.
- Raposo, S. (1997) Proteinases aspárticas de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*: produção, purificação e caracterização (1997). *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Reisman, H. (1993) Problems in scale-up of Biotechnology production processes. *Critical Reviews Biotechnol.* **13**: 195-253.
- Rocha-Valadez, J. A., E. Galindo & L. Serrano-Carreón (2000) Effect of the impeller-sparger configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. *Bioproc Eng.* **23**: 403-410.
- Schenk, R. & A. Hildebrandt (1972) Medium techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* **22**: 55-64.
- Scragg, A. H., P. Morris, E. J. Allan, P. Bond & M. W. Fowler (1987) Effect of scale-up on serpentine formation by *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Enzyme Microbial Technology.* **9**: 619 – 624.
- Tanaka, H. (1981) Technological problems in cultivation of plant cells at high density. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 1203 – 1218.
- Taticek, R., M. Moo-Young & R. Legge (1991) The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* **24**: 139-158.
- Takei, M., K. Mizusawa, F. Yoshida (1975) *J. Ferment Technol.* **53**: 151-158.
- Vasconcelos, J. M., S. C. Orvalho, A. M. Rodrigues & S. S. Alves (2000) Effect of blade shape on the performance of six bladed disk turbine impellers. *Ind. Eng. Chem. Res.* **39**: 203.
- Wang, S.-J. & J.-J. Zhong (1997) Comparison of O<sub>2</sub> transfer characteristics between a new centrifugal impeller and flat-bladed turbine impeller. *Biotechnol. Tech.* **11**: 763 – 767.
- Wang, Z. & J. Zhong (2002) Repeated elicitation enhances taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors. *Biotechnol. Lett.* **24**: 445-448.
- Xie, L. Z., C. Metallo, J. Warren, W. Pilbrough, J. Peltier, T. Zhong, L. Pikus, A. Yancy, J. Leung, J. G. Aunins & W. C. Zhou (2003) Large-scale propagation of a replication-defective

adenovirus vector in stirred-tank bioreactor PER.C6 (TM) cell culture under sparging conditions. *Biotechnol Bioeng.* **83**: 45-52.

Zhong, J. J., Z. W. Pan, Z. Y. Wang, J. Y. Wu, F. Chen, M. Takagi & T Yoshida (2002) Effect of mixing time on taxoid production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in a centrifugal impeller bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* **94**: 244-250.

Zhong, J. J. (2002) Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *J. Biosci. Bioeng.* **94**: 591-599.

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## 6.1. CONCLUSÕES GERAIS

Nesta dissertação, estudou-se o comportamento da cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* quando expostas a condições de tensão hidrodinâmica durante o seu ciclo de crescimento, em reactores biológicos de diferentes geometrias (denominados ensaios de longa duração) e em condições muito bem definidas de tensão hidrodinâmica (denominados ensaios de curta duração).

As células em suspensão de *C. calcitrapa* foram sujeitas a condições intensas e bem definidas de stresse hidrodinâmico, no sistema de Fluxo Turbulento Submerso. Observou-se uma redução significativa na viabilidade celular assim como, da biomassa com o aumento do tempo de exposição. A redução da viabilidade celular foi descrita por um modelo cinético de morte de primeira ordem.

Por acção das forças de tensão observou-se ainda que, os agregados celulares de maiores dimensões eram preferencialmente quebrados com o aumento do tempo de exposição. O conceito de diâmetro equivalente máximo,  $D_{99}$ , mostrou ser um indicador de resposta adequado para avaliar os danos nas suspensões celulares.

A energia dissipada média e a energia dissipada acumulada mostraram ser igualmente, parâmetros adequados na avaliação indirecta dos danos celulares. Nas condições dos ensaios de curta duração efectuados, as células em suspensão de *C. calcitrapa* sofreram danos para a energia dissipada média de 37,10 KW/Kg, sendo a energia dissipada acumulada crítica de  $9 \times 10^5$  J/m<sup>3</sup>.

Os ensaios de longa duração, de avaliação da sensibilidade das células de *C. calcitrapa* ao stresse hidrodinâmico, decorreram em reactor biológico de 2 L mecanicamente agitado com um agitador de pás inclinadas. As culturas celulares foram caracterizadas em termos hidrodinâmicos e reológicos. Estudou-se o efeito da agitação (30, 60, 100 e 250 rpm) no crescimento celular e na produção de metabolitos. Constatou-se que as células eram sensíveis às forças de tensão, promovidas pelo agitador de pás inclinadas, para a agitação de 250 rpm. Em consequência da exposição das células ao ambiente hidrodinâmico adverso, verificou-se perda da viabilidade celular e aumento da concentração de fenóis no meio extracelular. O tamanho dos agregados celulares também sofreu uma redução significativa, comparativamente com as células crescidas em Erlenmeyer.

Nas culturas de células de *C. calcitrapa* crescidas em Erlenmeyer observou-se que o diâmetro equivalente médio diminui ao longo do ciclo de crescimento, variando entre 190,87 e 246,27  $\mu\text{m}$ . A distribuição log-normal permitiu caracterizar, com sucesso, a distribuição dos agregados celulares de *C. calcitrapa*. Com base nas duas técnicas usadas na análise morfológica da suspensão, FBRM e a análise digital de imagem, estabeleceram-se

correlações lineares, entre a biomassa e a contagem total e entre o diâmetro equivalente médio e o comprimento da corda médio, específicas da espécie.

A aplicação da técnica FBRM (*focused beam reflectance measurement*) ao estudo morfológico das culturas de células vegetais é extremamente recente, havendo apenas um trabalho publicado nesta área, até à data. Esta técnica corrobora os resultados obtidos da análise digital de imagem, podendo ser uma alternativa a esta técnica, por permitir a obtenção rápida de resultados e possibilitar medições *in-situ*.

Nos ensaios de longa duração, realizados no reactor biológico mecanicamente agitado, obtiveram-se valores de energia dissipada média bastante inferiores, comparativamente aos obtidos no Fluxo Turbulento. Os ensaios de curta duração são bastante mais agressivos para a cultura de células vegetais de *C. calcitrapa*, do que as condições impostas em reactor biológico. Neste tipo de ensaios ficou também patente que a intensidade das forças de tensão condicionam mais o comportamento da cultura do que a duração da exposição. Os valores das energias dissipadas reflectem, por assim dizer, a dimensão dos danos sofridos pela cultura.

Foram igualmente, realizados ensaios em reactor biológico de 2 L em que a agitação e o arejamento foram feitos por intermédio de uma membrana porosa. As viabilidades celulares mantiveram-se elevadas, ao longo de todo o ciclo de crescimento, e a produção de compostos fenólicos foi diminuta, comparativamente com os resultados obtidos em biorreactor mecanicamente agitado. Este tipo de biorreactor pode ser considerado um sistema de baixo stresse, podendo ser uma boa alternativa para o cultivo de células vegetais, sensíveis às condições de stresse hidrodinâmico.

Procedeu-se ao aumento de escala das células em suspensão de *C. calcitrapa*, em reactor biológico mecanicamente agitado de 2 para 7 L, utilizando-se como critérios a manutenção do  $K_L a$  e a velocidade da ponta do agitador. Com base em ambos os critérios, o sucesso do processo de aumento de escala das células em suspensão de *C. calcitrapa*, é dependente da velocidade de agitação, condicionando o tipo e o número de agitadores presentes no biorreactor mecanicamente agitado. Para baixas velocidades de agitação (100 rpm), o sistema que conferiu melhor crescimento das células de *C. calcitrapa* foi o biorreactor mecanicamente agitado com um agitador em hélice e um dispersor de ar poroso. Para elevadas velocidades de agitação (250 rpm), as melhores condições de crescimento das células de *C. calcitrapa* foram reunidas num biorreactor equipado com duas turbinas de Rushton e um dispersor poroso. Neste caso, embora a energia dissipada média e a potência volumétrica, parâmetros usados na quantificação do stresse hidrodinâmico, sejam elevados,

a cultura não perdeu viabilidade celular ao longo do ciclo de crescimento, mantendo os níveis de produtividade e de rendimento de biomassa elevados.

Tendo em conta os dois critérios, usados no aumento de escala laboratorial de 2 para 7 L,  $K_L a$  e velocidade da ponta do agitador, selecciona-se como critério preferencial o  $K_L a$ , visto ser mais abrangente das condições operacionais de cultura, relacionando o arejamento e a agitação, parâmetros estes que condicionam fortemente o desenvolvimento da cultura. A velocidade da ponta do agitador apenas relaciona a velocidade de agitação e o diâmetro do agitador.

Os resultados obtidos deste trabalho sugerem que, a sensibilidade das células de *C. calcitrpa* às forças de tensão, originadas pelo cultivo em reactores biológicos de diferentes geometrias depende do tipo de agitador, do número de agitadores e da velocidade de agitação.

## 6.2. PERSPECTIVAS PARA TRABALHO FUTURO

A capacidade que as células em suspensão têm de se multiplicar, após terem sido sujeitas a condições de elevadas forças de tensão, é extremamente importante para o sucesso da produção em larga-escala. A realização deste tipo de ensaios em que, as células em suspensão de *C. calcitrapa*, após sofrerem stresse, são cultivadas novamente, em Erlenmeyer e em reactor biológico mecanicamente agitado, são extremamente importantes, por permitirem avaliar a resistência desta linha celular a forças de tensão intensas. O crescimento celular será quantificado através dos parâmetros de crescimento e de alguns indicadores de resposta, como sejam a viabilidade celular, tensão de corte e energia dissipada média. Igualmente, este tipo de ensaios devem ser acompanhados da caracterização reológica da cultura, afim de se verificar se há alteração do comportamento reológico desta. Deve também ser feita a análise morfológica da cultura, de molde a verificar se há alterações no tamanho dos agregados celulares e quais as implicações que estas alterações morfológicas podem ter no comportamento reológico da cultura.

Embora no capítulo 2, se tenha estudado o efeito do  $K_L a$  no crescimento das células de *C. calcitrapa*, um estudo mais exaustivo deve ser levado a cabo, testando uma maior gama de  $K_L a$ . O comportamento da cultura de *C. calcitrapa* em reactor biológico mecanicamente agitado, deve ser estudado a  $K_L a$  superiores e mesmo inferiores, do que os estudados neste trabalho. Inclusive, para ficar bem claro a influência do arejamento / agitação no stresse hidrodinâmico da cultura.

Como já foi dito, a análise morfológica das suspensões cultivadas em biorreactor ganha importância, sendo essencial, por permitir uma melhor compreensão do ambiente hidrodinâmico e reológico da cultura. Relativamente à cultura de células em suspensão de *C. calcitrapa*, embora haja uma boa caracterização morfológica das células crescidas em Erlenmeyer, em reactor biológico mecanicamente agitado, é necessário proceder a mais estudos, de molde a permitir uma compreensão mais aprofundada do comportamento da cultura perante ambientes de stresse hidrodinâmico impostos. Um dos ensaios que deverá ser realizado, é o estudo da variação do tamanho dos agregados celulares, ao longo do ciclo de crescimento, em reactor biológico mecanicamente agitado e em diferentes ambientes hidrodinâmicos, através da variação das condições agitação/arejamento.

Também, a passagem da suspensão celular de *C. calcitrapa*, cultivada em biorreactor mecanicamente agitado, por um sistema de crivos irá permitir a análise dos agregados dominantes na cultura, ao longo do ciclo de crescimento. A influência que determinado tamanho de agregado celular tem na biomassa total, deverá ser avaliada.

A cultura de células em suspensão de *Centaurea calcitrapa* apresenta potencialidades na sua aplicação industrial. Esta cultura demonstrou igualmente, uma elevada adequação ao crescimento, em sistema descontínuo, em biorreactor mecanicamente agitado, à escala laboratorial. No entanto, pensa-se que a optimização da produção de elevada densidade de biomassa e de enzimas com actividade coagulante, ainda poderá ser melhorada através da adição de compostos, chamados vectores de oxigénio, que têm elevada capacidade de solubilizar oxigénio (hidrocarbonetos e perfluorcarbonetos) no meio de cultura. Estes compostos, iriam otimizar a capacidade de transferência de massa de oxigénio na suspensão celular.

Ainda na perspectiva de aumentar e otimizar as produtividades e rendimentos de biomassa e metabolitos, a possibilidade de uma maior oxigenação da cultura, através da diminuição do teor de dióxido de carbono presente na fase gasosa, no interior do biorreactor, e na variação da proporção dos elementos considerados essenciais na composição do ar, deverá ser estudada em sistema descontínuo. O efeito do teor de dióxido de carbono no crescimento celular e na produtividade dos sistemas celulares vegetais carece de comprovação. Comportamentos antagónicos têm sido observados por vários autores em culturas de células vegetais distintas.

O reactor biológico de agitação e arejamento por membrana porosa mostrou ser um bom sistema, de baixo stresse hidrodinâmico, para a cultura das células em suspensão de *Centaurea calcitrapa*. Deverão ser realizados novos ensaios com vista a optimização das condições de transferência de massa de oxigénio, através do aumento do  $K_L a$  e testando outros tipos de membranas e outras configurações de enrolamento desta.

Na produção em larga escala da cultura de células vegetais de *C. calcitrapa* é necessário proceder à optimização das condições de produção, através da combinação de diferentes tipos de agitadores, principalmente de agitadores de pás inclinadas, como testado no biorreactor de 2 L, e da optimização da distância entre estes, de forma a garantir uma transferência de massa sem limitações para a cultura. Igualmente, é importante a realização de novos ensaios a elevadas velocidades de agitação, superiores a 250 rpm e com diferentes tipos de agitadores, a fim de se averiguar a sensibilidade das células às forças de tensão, impostas por estes agitadores. É de extrema importância averiguar quais os agitadores e quais as velocidades de agitação que promovem stresse hidrodinâmico na suspensão celular de *C. calcitrapa*.

**ANEXOS**

## ANEXO A - PROGRAMA PARA AQUISIÇÃO DE IMAGENS

Image Acquisition Routine.Q5R

Routine Header:  
Number of fields: 1  
Standard Frames

\*\*\*\*\*ROUTINE TO ACQUIRE IMAGES FOR SUBSEQUENT ANALYSIS\*\*\*\*\*

\*\*\*\*\*Required Number of Images\*\*\*\*\*

PauseText ( "Input number of Images to acquire" )

Input ( NUMFIELDS )

\*\*\*\*\*Specifying Incrementing Destination of Image Files\*\*\*\*\*

PATH\$ = "E:\Patricia Kleran\Images\"

PauseText ( "Input root name for image files (no drive location, incrementing number or extension)" )

Input ( IMAGEFILEROOT\$ )

\*\*\*\*\*Acquiring Images\*\*\*\*\*

Select Lens [PAUSE] ( Transmitted, 4x (DPlan 4), mag changer 1.0 x)

PauseText ( "Use Advanced Settings to Set Up Automatic Shading, Standard, On, Apply to Live..." )

Image Setup [PAUSE] ( CAMERA, Upper IMSGAIN, Lower IMSOFFSET, Lamp IMSVOLTS )

For ( ACQIM = 1 to NUMFIELDS, step 1 )

Display ( ImageO (on), frames (on,on), planes (off,off,off,off,off,off), lut 0, x 0, y 0, z 1, Reduction off )

Live On

PauseText ( "Select Field of View..." )

Pause ( No dialog )

Acquire ( into ImageO )

ACQFILE\$ = PATH\$+IMAGEFILEROOT\$+STR\$(ACQIM)+".jpg"

Write Image ( from ACQOUTPUT Into file ACQFILE\$, export calibration )

Next ( ACQIM )

END

## ANEXO B – PROGRAMA DE ANÁLISE DAS IMAGENS

Raposo Algorithm -updated 24-04.Q5R

Routine Header:  
Number of fields: 1  
Standard Frames

\*\*\*\*\*ROUTINE TO ANAL YSE PREVIOUSLY ACQUIRED IMAGES\*\*\*\*\*

\*\*\*\*\*RAPOSO ALGORITHM -UPDATED 24-04.Q5R\*\*\*\*\*

\*\*\*\*\*Specifying Root Name of Image Files\*\*\*\*

PATH1\$ = "E:\Sara Raposo\  
PATH2\$ = "Viability time after slevd\2.5 hour 1to20\  
PauseText ( "Input root name for image files (no drive location, incrementing number or extension)" )  
Input ( IMAGEFILEROOT\$ )  
PauseText ( "Input root name for output file (no drive location, Incrementing number or extension)" )  
Input ( OUTPUTFILEROOT\$ )

\*\*\*\*\*Maximum Number of Image Files Available\*\*\*\*

PauseText ( "Input counter of FIRST Image file to be analysed" )  
Input ( FIRSTIMAGE )  
PauseText ( "Input counter of LAST image file to be analysed" )  
Input ( LASTIMAGE )

\*\*\*\*\*Required Number of Entities to Analyse\*\*\*\*

PauseText ( "Input number of entities to analyse... " )  
Input ( NUMCHAINS )

\*\*\*\*\*Output file\*\*\*\*\*

Enter Results Header  
OPENFILE\$ = PATH1\$+PATH2\$+OUTPUTFILEROOT\$+".q5d"  
Open File ( OPENFILE\$, channel #CHAN )  
File Results Header ( channel #1 )

\*\*\*\*\*Opening Image File\*\*\*\*\*

IMAGECOUNTER = FIRSTIMAGE  
FTRTOT = 0  
Repeat  
ACQFILE\$ = PATH1\$+PATH2\$+IMAGEFILEROOT\$+STR\$(IMAGECOUNTER)+".jpg"  
ACQOUTPUT=0  
Read image ( from file ACQFILE\$ into ACQOUTPUT, import calibration )  
Display ( Image0 (on), frames (on,on), planes (off,off,off,off,off,off), lut 0, x 0, y 0, z 1, Reduction off )

\*\*\*\*\*Image Manipulation\*\*\*\*\*

Grey Transform ( BSharpen from Image0 to Image1 , cycles 5, operator Disc )  
PauseText ( "Adjust detection level as required..." )  
Detect [PAUSE] ( blacker than 150, from Image1 into Binary0 )  
Display ( Image1 (on), frames (on,on), planes (0,off,off,off,off,off), lut 0, x 0, y 0, z 1, Reduction off )

\*\*\*\*\*Cleaning Up Image by Removing Non-Cellular Material\*\*\*\*\*

Clear Accepts  
MINAREA = 750  
MFEATINPUT=0  
Measure feature ( plane MFEATINPUT, FERETS ferets, minimum area: MINAREA, grey Image:  
FTRGREY.IMAGE  
feature counts into FTRCOUNT(2), results into FTRRESUL TS(count,3) )  
Selected parameters: Area, X FCP, Y FCP  
Copy Accepted Features ( from Binary0 into Binary1 )  
Display ( Image1 (on), frames (on,on), planes (off,1,off,off,off,off), lut 0, x 0, y 0, z 1, Reduction off )

\*\*\*\*\*Manual Editing Stage to Remove Any Residual Non-Chains, Complete Any Incomplete Chains\*\*\*\*

PauseText ( "Remove non-chains; ensure all chain outlines complete... " )

Binary Edit [PAUSE] ( Draw from Binary1 to Binary1, nib Fill, width 2 )

\*\*\*\*\*Binary Image Manipulation to Identify/Separate Whole Chains\*\*\*\*\*

Display ( Image1 (on), frames (on,on), planes (off,off,2,off,off,off), lut 0, x 0, y 0, z 1, Reduction off )  
Binary Amend ( Skeleton from Binary1 to Binary2, cycles 1, operator Disc, edge erode on )  
Binary Identify ( FillHoles from Binary2 to Binary3 )  
PauseText ( "Separate touching chains, If necessary..." )  
Binary Edit [PAUSE] ( Cut from Binary3 to Binary4, nib Fill, width 2 )  
Display ( Image1 (on), frames (on,on), planes (off,off,off,off,4,off), lut 0, x 0, y 0, z 1, Reduction off )

\*\*\*\*\*Feature Measurement\*\*\*\*\*

MFEATINPUT=4  
Measure feature ( plane MFEATINPUT, FERETS ferets, minimum area: MINAREA, grey image: FTRGREY.IMAGE  
feature counts into FTRCOUNT(2), results into FTRRESULTS(count,3) )  
Selected parameters: Area, Perimeter, EquivDiam .  
File Feature Results ( channel #1 )  
Display Feature Results ( x -3, y -5, w 112, h 116 )  
Display ( Image0 (on), frames (on,on), planes (off,off,off,off,4,off), lut 0, X 0, y 0, z 1, Reduction off )  
Define Button ( #1, "No" )  
Define Button ( #2, "Yes" )  
Pause ( Buttons, "Proceed?" )  
If ( BUTTON = 1 )  
    Goto FINISHING  
Endif

\*\*\*\*\*Incrementing Image File\*\*\*\*\*

IMAGECOUNTER=IMAGECOUNTER+1

\*\*\*\*\*Comparing Updated Chain Count with Specified Limit\*\*\*\*\*

FTRTOT= FTRTOT+FTRCOUNT(2)  
Setup Output Window ( "Updated Image and Feature Counts", Move to x 10, y 634, w 479, h 88 )  
Display ( "Have just analysed image number "+STR\$(IMAGECOUNTER-1), tab follows )  
Display Line  
Display ( "Total Number of Entities Counted is "+STR\$(FTRTOT), tab follows )  
Display Line

\*\*\*\*\*Comparing Updated Image Count with Specified Limit\*\*\*\*\*

If ( IMAGECOUNTER>LASTIMAGE )  
    Pause Message Group:  
    PauseText ("+++++")  
    PauseText ( "Entity limit not reached, but" )  
    PauseText ( "Image limit reached; Program terminating" )  
    PauseText ("+++++")  
    Pause ( No dialog )  
    Goto FINISHING  
Endif  
Until ( FTRTOT>=NUMCHAINS )  
FINISHING:  
File ( "The first image analysed was image number "+STR\$(FIRSTIMAGE), channel #1 )  
File Line ( channel #1 )  
File ( "The last Image analysed was image number "+STR\$(IMAGECOUNTER-1), channel #1 )  
File Line ( channel #1 )  
File ( "The total number of entities counted was "+STR\$(FTRTOT), channel #1 )  
Close File ( channel #1 )  
END

**ANEXO C – FÓRMULAS USADAS NOS CÁLCULOS EXPERIMENTAIS DO JACTO DE FLUXO  
TURBULENTO**

Caudal Médio,  $Q$

$$Q = \frac{V_{\text{ciclo}}}{T_{\text{ciclo}}}$$

Área do Bocal de Saída,  $A$

$$A = \frac{\pi d_0^2}{4}$$

Velocidade Média do Fluido,  $U_0$

$$U_0 = \frac{Q}{A}$$

Energia Dissipada Média,  $\bar{\varepsilon}$

$$\bar{\varepsilon} = 0,0057 \frac{U_0^3}{d_0}$$

Tempo de Exposição,  $T_{\text{exp}}$

$$T_{\text{exp}} = 20,61 \frac{d_0}{U_0}$$

Probabilidade de Exposição por ciclo,  $p$

$$p = \frac{1000}{2000} \times \frac{1000}{1200} = 0,4167$$

Tempo de Exposição por ciclo,  $T_{\text{exp},n}$

$$T_{\text{exp},n} = T_{\text{exp}} \cdot p \cdot n$$

(tendo em conta a probabilidade)

## ANEXO D – DADOS DOS ENSAIOS DO SISTEMA DE JACTO TURBULENTO

<b>01-05-2001</b>	<b>Pressão</b>	<b>5,6 bar</b>
	<b>Peso Fresco</b>	<b>15 g/L</b>
	<b>Idade</b>	<b>5 dias</b>
	<b>Tempo Ciclo</b>	<b>16,00 s</b>
	<b>Volume Total</b>	<b>2,2 L</b>
	<b>Volume Exposto</b>	<b>1,3 L</b>
	<b>Diâmetro do Bocal</b>	<b>2 mm</b>
	<b>Energia Dissipada</b>	<b>49,40 KW/Kg</b>

Ciclos	Tempo Exposição (s)	Energia Dissip. Acum. (J/m <sup>3</sup> )	Viabilidade (%)	D <sub>eq</sub> /D <sub>eq-0</sub> (–)	PS (g/L)	PS/PSo (–)
0	0,00E+00	0	89,47	1,00	0,77	1,00
5,0	4,48E-03	225650,0		0,85		
10,0	8,96E-03	451310,0		0,81		
15,0	1,34E-02	676460,0		0,79		
20,0	1,79E-02	902110,0	58,06	0,77	0,54	0,65

Ciclos	D <sub>99</sub> (µm)	D <sub>99</sub> /D <sub>99-0</sub>	Viab/Viab <sub>0</sub> (–)	K <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )
0	358,88	1,00	1	
5,0	264,92	0,74		
10,0	228,65	0,64		19,60
15,0	220,46	0,61		
20,0	224,17	0,62	0,65	

<b>03-05-2001</b>	<b>Pressão</b>	<b>5,6 bar</b>
	<b>Peso Fresco</b>	<b>15 g/L</b>
	<b>Idade</b>	<b>5 dias</b>
	<b>Tempo Ciclo</b>	<b>13,00 s</b>
	<b>Volume Total</b>	<b>2,2 L</b>
	<b>Volume Exposto</b>	<b>1,0 L</b>
	<b>Diâmetro do Bocal</b>	<b>2 mm</b>
	<b>Energia Dissipada</b>	<b>41,90 KW/Kg</b>

Ciclos	Tempo Exposição (s)	Energia Dissip. Acum. (J/m <sup>3</sup> )	Viabilidade (%)	D <sub>eq</sub> /D <sub>eq-0</sub> (–)	PS (g/L)	PS/PSo (–)
0	0	0	91,33	1,00	0,77	1,00
6,0	4,2E-03	179860,0		0,86		
13,0	9,1E-03	389630,0		0,83		
19,0	1,3E-02	569060,0		0,84		
26,0	1,8E-02	778820,0	57,44	0,81	0,71	0,92

Ciclos	D <sub>99</sub> (µm)	D <sub>99</sub> /D <sub>99-0</sub>	Viab/Viab <sub>0</sub> (–)	K <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )
0	326,10	1,00	1	
6,0	272,83	0,84		
13,0	223,79	0,69		20,72
19,0	237,80	0,73		
26,0	228,30	0,70	0,63	

**11-05-2001** Pressão 5,6 bar  
 Peso Fresco 15 g/L  
 Idade 7 dias  
 Tempo Ciclo 13,54 s  
 Volume Total 2,2 L  
 Volume Exposto 1,0 L  
 Diâmetro do Bocal 2 mm  
 Energia Dissipada 37,10 KW/Kg

Ciclos	Tempo Exposição (s)	Energia Dissip. Acum. (J/m <sup>3</sup> )	Viabilidade (%)	D <sub>eq</sub> /D <sub>eq-0</sub> (–)	PS (g/L)	PS/PS <sub>0</sub> (–)
0	0	0	86,56	1,00	0,75	1,00
6,0	4,4E-03	165690,0		0,95		
13,0	9,5E-03	358990,0		0,91		
19,0	1,4E-02	524670,0		0,91		
26,0	1,9E-02	717970,0	54,53	0,88	0,47	0,62

Ciclos	D <sub>99</sub> (µm)	D <sub>99</sub> /D <sub>99-0</sub>	Viab/Viab <sub>0</sub> (–)	K <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )
0	290,12	1,00	1	
6,0	260,46	0,90		
13,0	235,10	0,81		19,50
19,0	239,98	0,83		
26,0	234,26	0,81	0,63	

**18-05-2001** Pressão 5,6 bar  
 Peso Fresco 15 g/L  
 Idade 7 dias  
 Tempo Ciclo 13,44 s  
 Volume Total 2,2 L  
 Volume Exposto 1,0 L  
 Diâmetro do Bocal 2 mm  
 Energia Dissipada 37,94 KW/Kg

Ciclos	Tempo Exposição (s)	Energia Dissip. Acum. (J/m <sup>3</sup> )	Viabilidade (%)	D <sub>eq</sub> /D <sub>eq-0</sub> (–)	PS (g/L)	PS/PS <sub>0</sub> (–)
0	0	0	85,94	1,00	0,67	1,00
6,0	4,4E-03	168277,0		0,91		
13,0	9,4E-03	364407,0		0,87		
19,0	1,4E-02	532684,0		0,84		
26,0	1,9E-02	728814,0	62,31	0,83	0,54	0,80

Ciclos	D <sub>99</sub> (µm)	D <sub>99</sub> /D <sub>99-0</sub>	Viab/Viab <sub>0</sub> (–)	K <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )
0	299,45	1	1	
6,0	257,47	0,859809651		
13,0	231,31	0,772449491		14,59
19,0	210,34	0,702421105		
26,0	220,37	0,735915846	0,73	

23-05-2001 Pressão 9,0 bar  
 Peso Fresco 15 g/L  
 Idade 5 dias  
 Tempo Ciclo 10,64 s  
 Volume Total 2,2 L  
 Volume Exposto 1,0 L  
 Diâmetro do Bocal 2 mm  
 Energia Dissipada 76,41 KW/Kg

Ciclos	Tempo Exposição (s)	Energia Dissip. Acum. (J/m <sup>3</sup> )	Viabilidade %	D <sub>eq</sub> /D <sub>eq-0</sub> (--)	P S (g/L)	PS/PSo (--)
0	0	0	92,53	1,00	0,83	1,00
6,0	3,5E-03	263614,5		0,82		
13,0	7,5E-03	571546,8		0,78		
19,0	1,1E-02	835161,3		0,73		
26,0	1,5E-02	1142329,5	35,22	0,73	0,58	0,69

Ciclos	D <sub>99</sub> (µm)	D <sub>99</sub> /D <sub>99-0</sub>	Viab/Viab <sub>0</sub> (--)	K <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )
0	297,03	1	1	
6,0	232,67	0,78332155		41,43
13,0	213,34	0,718243948		
19,0	183,52	0,617850049		
26,0	195,69	0,658822341	0,38	

28-05-2001 Pressão 9,0 bar  
 Peso Fresco 15 g/L  
 Idade 5 dias  
 Tempo Ciclo 10,60 s  
 Volume Total 2,2 L  
 Volume Exposto 1,0 L  
 Diâmetro do Bocal 2 mm  
 Energia Dissipada 77,29 KW/Kg

Ciclos	Tempo Exposição (s)	Energia Dissip. Acum. (J/m <sup>3</sup> )	Viabilidade %	D <sub>eq</sub> /D <sub>eq-0</sub> (--)	PS (g/L)	PS/PSo (--)
0	0	0	92,06	1,00	0,84	1,00
6,0	3,4E-03	262086,3		0,89		
13,0	7,4E-03	567726,3		0,83		
19,0	1,1E-02	829812,6		0,81		
26,0	1,5E-02	1136216,7	42,54	0,79	0,59	0,70

Ciclos	D <sub>99</sub> (µm)	D <sub>99</sub> /D <sub>99-0</sub>	Viab/Viab <sub>0</sub> (--)	K <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )
0	285,57	1	1	
6,0	241,57	0,845922191		36,17
13,0	221,69	0,776307035		
19,0	204,67	0,716706937		
26,0	193,65	0,678117449	0,46	

## ANEXO E – FÓRMULAS PARA ANÁLISE DOS DADOS DE FBRM

### Proof of Mean Chord Length Calculations

$$\text{Unweighted Mean Chord} = \overline{C_u} = \frac{\sum_{i=1}^k Y_{i,u} M_i}{\sum_{i=1}^k Y_{i,u}} = \frac{\sum_{i=1}^k \left[ \left( \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i} \right) M_i \right]}{\sum_{i=1}^k \left( \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i} \right)} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i M_i^1}{\sum_{i=1}^k n_i M_i^0}$$

$$\text{Length Weight Mean Chord} = \overline{C_l} = \frac{\sum_{i=1}^k Y_{i,l} M_i}{\sum_{i=1}^k Y_{i,l}} = \frac{\sum_{i=1}^k \left[ \left( \frac{n_i M_i}{\sum_{i=1}^k n_i M_i} \right) M_i \right]}{\sum_{i=1}^k \left( \frac{n_i M_i}{\sum_{i=1}^k n_i M_i} \right)} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i M_i^2}{\sum_{i=1}^k n_i M_i^1}$$

$$\text{Length Square Weight Mean Chord} = \overline{C_s} = \frac{\sum_{i=1}^k Y_{i,s} M_i}{\sum_{i=1}^k Y_{i,s}} = \frac{\sum_{i=1}^k \left[ \left( \frac{n_i M_i^2}{\sum_{i=1}^k n_i M_i^2} \right) M_i \right]}{\sum_{i=1}^k \left( \frac{n_i M_i^2}{\sum_{i=1}^k n_i M_i^2} \right)} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i M_i^3}{\sum_{i=1}^k n_i M_i^2}$$

$$\text{Length Cube Weight Mean Chord} = \overline{C_c} = \frac{\sum_{i=1}^k Y_{i,c} M_i}{\sum_{i=1}^k Y_{i,c}} = \frac{\sum_{i=1}^k \left[ \left( \frac{n_i M_i^3}{\sum_{i=1}^k n_i M_i^3} \right) M_i \right]}{\sum_{i=1}^k \left( \frac{n_i M_i^3}{\sum_{i=1}^k n_i M_i^3} \right)} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i M_i^4}{\sum_{i=1}^k n_i M_i^3}$$

$n_i$  = Counts in an individual measurement channel

$u$  = Unweighted

$M_i$  = Midpoint of an individual channel

$l$  = Length weight

$Y_i$  = % per channel

$s$  = Length square weight

$\bar{C}$  = Average chord

$c$  = Length cube weight

$k$  = Upper channel # ( $2 \leq k \leq 38$ )

**Channel Midpoint (for linear channel groupings)** ( $M_i$ ) - the chord length corresponding to the midpoint (arithmetic mean) of a given channel .

**Channel Midpoint (for log channel groupings)** - the chord length corresponding to the midpoint (geometric mean) of a given channel  $i$ .

$$c_{m,i} = \text{square root of } c_i \times c_{i+1}, \quad \text{for } i = 1; \quad c_{m,38} = 1085 \mu\text{m}$$

**Chord Count** - The number of Chord Length measurements detected in a given channel during a Measurement Duration.

**Total Chord Counts** - The sum of the Chord Counts from the Chord Length Distribution (Channels 1 through 38).

**Mean Chord** ( $\bar{c}$ ) - The average chord length calculated from the Primary Chord Length Distribution [or from a portion of the Chord Length Distribution in a selected Channel Range (R)].

$$\bar{c} = \frac{1}{n_T} \sum_{i=1}^{38} (n_i \cdot c_{m,i})$$

**Standard Deviation** - Statistical measurement of the width of the distribution about the mean.

**Coefficient of Variation** - The ratio (as a percentage) of the standard deviation of a given distribution to the mean.

## ANEXO F – FACTORES CARACTERÍSTICOS DO *SPINDLE* □

### Viscosímetro - RVT

#### UL Adapter

Factor = 64 / N

Tensão de corte ( $s^{-1}$ ) = 1,224\*N

N – rpm

#### Dimensões do UL Adapter (mm)

COMPRIMENTO EFFECTIVO DO <i>SPINDLE</i> *	COMPRIMENTO ACTUAL	DIÂMETRO	DIÂMETRO DO RECIPIENTE EXTERIOR
92,39	90,74	25,15	27,62

## ANEXO G – ANÁLISE ESTATÍSTICA

### CAPÍTULO 2

#### Ensaio em Erlenmeyer - Concentração de glucose - análise do PF e PS General Linear Model

##### Between-Subjects Factors

	Value Label	N
glu	20,00	36
	30,00	36
	40,00	24
	60,00	36
t	,00	22
	2,00	22
	4,00	22
	6,00	22
	8,00	22
	11,00	22

##### Multivariate Tests<sup>c</sup>

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	,991	5856,604 <sup>a</sup>	2,000	107,000	,000
	Wilks' Lambda	,009	5856,604 <sup>a</sup>	2,000	107,000	,000
	Hotelling's Trace	109,469	5856,604 <sup>a</sup>	2,000	107,000	,000
	Roy's Largest Root	109,469	5856,604 <sup>a</sup>	2,000	107,000	,000
GLUCOSE	Pillai's Trace	1,538	120,003	6,000	216,000	,000
	Wilks' Lambda	,038	146,959 <sup>a</sup>	6,000	214,000	,000
	Hotelling's Trace	10,100	178,440	6,000	212,000	,000
	Roy's Largest Root	8,273	297,829 <sup>b</sup>	3,000	108,000	,000
TEMPO	Pillai's Trace	1,300	40,135	10,000	216,000	,000
	Wilks' Lambda	,022	121,287 <sup>a</sup>	10,000	214,000	,000
	Hotelling's Trace	29,109	308,558	10,000	212,000	,000
	Roy's Largest Root	28,608	617,927 <sup>b</sup>	5,000	108,000	,000
GLUCOSE * TEMPO	Pillai's Trace	1,482	20,612	30,000	216,000	,000
	Wilks' Lambda	,061	21,741 <sup>a</sup>	30,000	214,000	,000
	Hotelling's Trace	6,484	22,909	30,000	212,000	,000
	Roy's Largest Root	4,510	32,472 <sup>b</sup>	15,000	108,000	,000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+GLUCOSE+TEMPO+GLUCOSE \* TEMPO

**Tests of Between-Subjects Effects**

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	pf	3438973,668 <sup>a</sup>	23	149520,594	150,479	,000
	ps	4445,328 <sup>b</sup>	23	193,275	153,280	,000
Intercept	pf	8843682,877	1	8843682,877	8900,397	,000
	ps	14307,929	1	14307,929	11347,162	,000
GLUCOSE	pf	213689,757	3	71229,919	71,687	,000
	ps	772,373	3	257,458	204,181	,000
TEMPO	pf	2917734,822	5	583546,964	587,289	,000
	ps	3029,955	5	605,991	480,592	,000
GLUCOSE * TEMPO	pf	330649,158	15	22043,277	22,185	,000
	ps	608,658	15	40,577	32,180	,000
Error	pf	107311,817	108	993,628		
	ps	136,180	108	1,261		
Total	pf	12449632,5	132			
	ps	19305,105	132			
Corrected Total	pf	3546285,485	131			
	ps	4581,508	131			

a. R Squared = ,970 (Adjusted R Squared = ,963)

b. R Squared = ,970 (Adjusted R Squared = ,964)

**Post Hoc Tests**

**glu**

**Homogeneous Subsets**

**pf**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

glu	N	Subset		
		1	2	3
20	36	209,5408		
60	36		239,3817	
40	24			297,4096
30	36			305,0767
Sig.		1,000	1,000	,333

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 993,628.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 32,000.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**ps**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

glu	N	Subset		
		1	2	3
20	36	6,7556		
40	24		10,6967	
30	36			12,2525
60	36			12,5858
Sig.		1,000	1,000	,238

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1,261.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 32,000.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**t**

**Homogeneous Subsets**

**pf**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

t	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
,00	22	61,9427					
2,00	22		96,1864				
4,00	22			198,2309			
6,00	22				363,5800		
8,00	22					406,8327	
11,00	22						431,4909
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 993,628.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 22,000.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**ps**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

t	N	Subset				
		1	2	3	4	5
,00	22	3,5709				
2,00	22		5,4473			
4,00	22			9,2473		
6,00	22				13,7482	
11,00	22					15,5391
8,00	22					15,8155
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	,416

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1,261.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 22,000.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**Ensaio em Erlenmeyer - Concentração de glucose - Biomassa formada  
Oneway**

**ANOVA**

BIOM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	406,533	3	135,511	87,014	,000
Within Groups	28,032	18	1,557		
Total	434,565	21			

**Post Hoc Tests  
Homogeneous Subsets**

**BIOM**

Duncan<sup>a,b</sup>

gluc	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
20	6	6,1521		
40	4		13,1188	
30	6		14,5867	
60	6			17,3063
Sig.		1,000	,071	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,333.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

**Ensaio em Erlenmeyer - Concentração de glucose - Consumo de Glucose  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
gluc	20,00	18
	30,00	18
	40,00	18
	60,00	18
T	,00	12
	2,00	12
	4,00	12
	6,00	12
	8,00	12
	11,00	12

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: GLUCOSE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	17479,718 <sup>a</sup>	23	759,988	148,876	,000
Intercept	22164,949	1	22164,949	4341,948	,000
GLUC	9618,036	3	3206,012	628,034	,000
T	7200,866	5	1440,173	282,119	,000
GLUC * T	660,816	15	44,054	8,630	,000
Error	245,032	48	5,105		
Total	39889,700	72			
Corrected Total	17724,751	71			

a. R Squared = ,986 (Adjusted R Squared = ,980)

**Post Hoc Tests**

**gluc**

**Homogeneous Subsets**

**GLUCOSE**

Duncan<sup>a,b</sup>

gluc	N	Subset			
		1	2	3	4
20	18	6,1772			
30	18		10,8383		
40	18			16,6650	
60	18				36,5017
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5,105.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

b. Alpha = ,05.

**T**  
**Homogeneous Subsets**

**GLUCOSE**

Duncan<sup>a,b</sup>

T	N	Subset				
		1	2	3	4	5
11,00	12	6,9567				
8,00	12	8,0475				
6,00	12		10,3183			
4,00	12			19,3950		
2,00	12				27,2900	
,00	12					33,2658
Sig.		,243	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 5,105.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

b. Alpha = ,05.

**Ensaio em Erlenmeyer - Concentração de Glucose - Act. Proteolítica**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
gluc	20,00	18
	30,00	18
	40,00	18
	60,00	18
	60	18
T	,00	12
	2,00	12
	4,00	12
	6,00	12
	8,00	12
	11,00	12

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: ACTPROT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	70495830,0 <sup>a</sup>	23	3065036,088	149,067	,000
Intercept	104555874	1	104555874,0	5085,035	,000
GLUC	39817110,2	3	13272370,06	645,497	,000
T	14573458,1	5	2914691,616	141,755	,000
GLUC * T	16105261,8	15	1073684,118	52,218	,000
Error	986951,284	48	20561,485		
Total	176038655	72			
Corrected Total	71482781,3	71			

a. R Squared = ,986 (Adjusted R Squared = ,980)

**Post Hoc Tests**

**gluc**

**Homogeneous Subsets**

**ACTPROT**

Duncan<sup>a,b</sup>

gluc	N	Subset		
		1	2	3
40	18	732,7778		
60	18	742,0556		
20	18		855,0000	
30	18			2490,3989
Sig.		,847	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 20561,485.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

b. Alpha = ,05.

**T**  
**Homogeneous Subsets**

**ACTPROT**

Duncan<sup>a,b</sup>

T	N	Subset		
		1	2	3
,00	12	850,3025		
11,00	12	879,3150		
6,00	12	965,6917		
4,00	12		1146,5675	
8,00	12		1223,4983	
2,00	12			2164,9733
Sig.		,067	,195	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 20561,485.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

b. Alpha = ,05.

**Ensaio em Erlenmeyer - Concentração de Glucose - Nitratos e Fósforo**  
**General Linear Model**

**Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
glu	20,00	20	36
	30,00	30	36
	40,00	40	32
	60,00	60	36
t	,00		24
	2,00		24
	4,00		24
	6,00		24
	8,00		22
	11,00		22

**Tests of Between-Subjects Effects**

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	NITRATOS	1157895,707 <sup>a</sup>	23	50343,292	43,858	,000
	FOSFORO	392425,456 <sup>b</sup>	23	17061,976	104,198	,000
Intercept	NITRATOS	948609,986	1	948609,986	826,409	,000
	FOSFORO	1446032,744	1	1446032,744	8830,945	,000
GLUCOSE	NITRATOS	35961,320	3	11987,107	10,443	,000
	FOSFORO	12374,881	3	4124,960	25,191	,000
TEMPO	NITRATOS	1063096,718	5	212619,344	185,229	,000
	FOSFORO	366174,260	5	73234,852	447,246	,000
GLUCOSE * TEMPO	NITRATOS	53493,186	15	3566,212	3,107	,000
	FOSFORO	13025,367	15	868,358	5,303	,000
Error	NITRATOS	133152,898	116	1147,870		
	FOSFORO	18994,547	116	163,746		
Total	NITRATOS	2305696,050	140			
	FOSFORO	1923036,180	140			
Corrected Total	NITRATOS	1291048,605	139			
	FOSFORO	411420,003	139			

a. R Squared = ,897 (Adjusted R Squared = ,876)

b. R Squared = ,954 (Adjusted R Squared = ,945)

**Post Hoc Tests**

**glu**

**Homogeneous Subsets**

**NITRATOS**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

glu	N	Subset	
		1	2
20	36	56,7778	
40	32		93,8875
60	36		94,2806
30	36		96,5556
Sig.		1,000	,759

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1147,870.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 34,909.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = ,05.

**FOSFORO**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

glu	N	Subset		
		1	2	3
30	36	90,8300		
40	32		102,5928	
20	36		107,3025	
60	36			114,7678
Sig.		1,000	,127	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 Based on Type III Sum of Squares  
 The error term is Mean Square(Error) = 163,746.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 34,909.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**t**  
**Homogeneous Subsets**

**NITRATOS**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

t	N	Subset			
		1	2	3	4
11,00	22	4,4091			
8,00	22	10,9636			
6,00	24	21,4667			
4,00	24		63,1250		
2,00	24			159,9167	
,00	24				238,0042
Sig.		,107	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 Based on Type III Sum of Squares  
 The error term is Mean Square(Error) = 1147,870.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 23,294.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**FOSFORO**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

t	N	Subset				
		1	2	3	4	5
8,00	22	50,4736				
11,00	22	54,3729				
6,00	24		62,6415			
4,00	24			109,0775		
2,00	24				159,6217	
,00	24					178,6908
Sig.		,301	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 163,746.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 23,294.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**Ensaio em Erlenmeyer - Concentração de Glucose - Fenóis**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
gluc	20,00	20	17
	30,00	30	18
	40,00	40	18
	60,00	60	18
	,00		12
T	2,00		12
	4,00		11
	6,00		12
	8,00		12
	11,00		12

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: FENÓIS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	172342,630 <sup>a</sup>	23	7493,158	5,440	,000
Intercept	1207874,763	1	1207874,763	876,871	,000
GLUC	24838,896	3	8279,632	6,011	,001
T	97310,512	5	19462,102	14,129	,000
GLUC * T	56996,559	15	3799,771	2,758	,004
Error	64741,711	47	1377,483		
Total	1418486,984	71			
Corrected Total	237084,341	70			

a. R Squared = ,727 (Adjusted R Squared = ,593)

**Post Hoc Tests**

**gluc**

**Homogeneous Subsets**

**FENÓIS**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

gluc	N	Subset	
		1	2
30	18	105,4433	
40	18	123,6694	
20	17	131,0153	131,0153
60	18		155,9606
Sig.		,057	,051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1377,483.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 17,739.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**T**  
**Homogeneous Subsets**

**FENÓIS**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

T	N	Subset		
		1	2	3
,00	12	69,5442		
2,00	12	96,1167		
11,00	12		129,6633	
8,00	12		154,5175	154,5175
4,00	11		156,7536	156,7536
6,00	12			169,6825
Sig.		,088	,100	,356

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1377,483.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11,821.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**Tempos de Mistura 2L - Goma de Xantano  
Oneway**

**ANOVA**

TM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	40795,167	2	20397,583	125,358	,000
Within Groups	5369,583	33	162,715		
Total	46164,750	35			

**Post Hoc Tests**

**Homogeneous Subsets**

TM

Duncan<sup>a</sup>

agit	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
100,00	12	20,6667		
60,00	12		49,5833	
30,00	12			102,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

**Tempos de Mistura 2 L**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
arejam	100,00	12
	200,00	12
	300,00	12
	400,00	12
agit	30,00	12
	60,00	12
	100,00	12
	250,00	12

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	556,646 <sup>a</sup>	15	37,110	80,967	,000
Intercept	1621,688	1	1621,688	3538,227	,000
AREJAM	16,896	3	5,632	12,288	,000
AGIT	526,896	3	175,632	383,197	,000
AREJAM * AGIT	12,854	9	1,428	3,116	,008
Error	14,667	32	,458		
Total	2193,000	48			
Corrected Total	571,313	47			

a. R Squared = ,974 (Adjusted R Squared = ,962)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
300	12	5,4167	
200	12	5,4167	
400	12	5,5833	
100	12		6,8333
Sig.		,575	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,458.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

b. Alpha = ,05.

**agit**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

agit	N	Subset			
		1	2	3	4
250,00	12	1,1667			
100,00	12		4,5833		
60,00	12			7,4167	
30,00	12				10,0833
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,458.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

b. Alpha = ,05.

**Efeito da Agitação - 0,083 vvm - PF e PS  
General Linear Model**

**Between-Subjects Factors**

	Value	Label	N
agit	30,0	30	24
	60,0	60	24
	100,0	100	24
	250,0	250	27
t	,00		12
	2,00		12
	4,00		12
	6,00		12
	8,00		9
	9,00		3
	10,00		3
	11,00		9
	12,00		3
	13,00		9
	14,00		6
	15,00		6
	17,00		3

**Multivariate Tests<sup>c</sup>**

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	,998	14313,264 <sup>a</sup>	2,000	65,000	,000
	Wilks' Lambda	,002	14313,264 <sup>a</sup>	2,000	65,000	,000
	Hotelling's Trace	440,408	14313,264 <sup>a</sup>	2,000	65,000	,000
	Roy's Largest Root	440,408	14313,264 <sup>a</sup>	2,000	65,000	,000
AGIT	Pillai's Trace	1,014	22,629	6,000	132,000	,000
	Wilks' Lambda	,195	27,455 <sup>a</sup>	6,000	130,000	,000
	Hotelling's Trace	3,067	32,720	6,000	128,000	,000
	Roy's Largest Root	2,665	58,631 <sup>b</sup>	3,000	66,000	,000
TEMPO	Pillai's Trace	1,657	26,614	24,000	132,000	,000
	Wilks' Lambda	,005	68,507 <sup>a</sup>	24,000	130,000	,000
	Hotelling's Trace	61,796	164,790	24,000	128,000	,000
	Roy's Largest Root	59,729	328,511 <sup>b</sup>	12,000	66,000	,000
AGIT * TEMPO	Pillai's Trace	1,078	4,543	34,000	132,000	,000
	Wilks' Lambda	,110	7,691 <sup>a</sup>	34,000	130,000	,000
	Hotelling's Trace	6,358	11,968	34,000	128,000	,000
	Roy's Largest Root	6,077	23,591 <sup>b</sup>	17,000	66,000	,000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+AGIT+TEMPO+AGIT \* TEMPO

**Tests of Between-Subjects Effects**

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	PF	233226,079 <sup>a</sup>	32	7288,315	82,020	,000
	PS	365,257 <sup>b</sup>	32	11,414	87,851	,000
Intercept	PF	1149350,736	1	1149350,736	12934,354	,000
	PS	2542,351	1	2542,351	19567,377	,000
AGIT	PF	11037,078	3	3679,026	41,402	,000
	PS	12,479	3	4,160	32,016	,000
TEMPO	PF	191531,351	12	15960,946	179,618	,000
	PS	309,797	12	25,816	198,698	,000
AGIT * TEMPO	PF	20893,407	17	1229,024	13,831	,000
	PS	30,007	17	1,765	13,585	,000
Error	PF	5864,781	66	88,860		
	PS	8,575	66	,130		
Total	PF	1313340,860	99			
	PS	2877,857	99			
Corrected Total	PF	239090,860	98			
	PS	373,832	98			

a. R Squared = ,975 (Adjusted R Squared = ,964)

b. R Squared = ,977 (Adjusted R Squared = ,966)

**Post Hoc Tests**

**agit**

**Homogeneous Subsets**

**PF**

Duncan<sup>a,b</sup>

agit	N	Subset			
		1	2	3	4
250	27	88,7819			
30	24		97,5375		
100	24			104,5225	
60	24				127,7542
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 88,860.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,686.

b. Alpha = ,05.

**PS**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

agit	N	Subset		
		1	2	3
100	24	4,5958		
250	27	4,7044		
30	24		4,9623	
60	24			5,8950
Sig.		,294	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 Based on Type III Sum of Squares  
 The error term is Mean Square(Error) = ,130.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,686.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**t**  
**Homogeneous Subsets**

**PF**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

t	N	Subset								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
,00	12	52,0675								
2,00	12	56,6158	56,6158							
4,00	12		64,2633							
6,00	12			79,9967						
17,00	3				96,9167					
8,00	9					115,2189				
9,00	3					123,6533	123,6533			
11,00	9						131,9478			
13,00	9							146,0156		
15,00	6							150,2733		
10,00	3							152,4200		
14,00	6								178,1433	
12,00	3									216,4067
Sig.		,424	,180	1,000	1,000	,140	,147	,291	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 Based on Type III Sum of Squares  
 The error term is Mean Square(Error) = 88,860.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,571.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

PS

Duncan<sup>a,b,c</sup>

t	N	Subset								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
,00	12	2,0525								
2,00	12		3,1575							
4,00	12			3,7633						
17,00	3				4,5033					
6,00	12				4,6950					
9,00	3					5,3933				
8,00	9						6,1533			
13,00	9						6,4033	6,4033		
15,00	6						6,4100	6,4100		
11,00	9							6,7689		
14,00	6								7,2423	
10,00	3								7,6133	
12,00	3									8,5000
Sig.		1,000	1,000	1,000	,378	1,000	,268	,114	,091	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,130.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,571.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = ,05.

## CAPÍTULO 4

### Tempos de Mistura 3L - 0,1 vvm e dif agitações Univariate Analysis of Variance

#### Between-Subjects Factors

	N
AGIT 30,00	2
60,00	2
100,00	2

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3409,333 <sup>a</sup>	2	1704,667	28,176	,011
Intercept	11528,167	1	11528,167	190,548	,001
AGIT	3409,333	2	1704,667	28,176	,011
Error	181,500	3	60,500		
Total	15119,000	6			
Corrected Total	3590,833	5			

a. R Squared = ,949 (Adjusted R Squared = ,916)

#### Post Hoc Tests

##### AGIT

##### Homogeneous Subsets

#### TM

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset	
		1	2
60,00	2	25,5000	
30,00	2	28,5000	
100,00	2		77,5000
Sig.		,725	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 60,500.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b. Alpha = ,05.

**Tempos de Mistura 3L - 0,05 vvm - dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 30,00	2
60,00	2
100,00	2

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2452,333 <sup>a</sup>	2	1226,167	28,188	,011
Intercept	11008,167	1	11008,167	253,061	,001
AGIT	2452,333	2	1226,167	28,188	,011
Error	130,500	3	43,500		
Total	13591,000	6			
Corrected Total	2582,833	5			

a. R Squared = ,949 (Adjusted R Squared = ,916)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset	
		1	2
60,00	2	24,5000	
30,00	2	33,0000	
100,00	2		71,0000
Sig.		,288	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 43,500.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b. Alpha = ,05.

**Tempos de Mistura 3L-0,25 vvm e dif agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	30,00	2
	60,00	2
	100,00	2

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1099,000 <sup>a</sup>	2	549,500	8,935	,055
Intercept	6733,500	1	6733,500	109,488	,002
AGIT	1099,000	2	549,500	8,935	,055
Error	184,500	3	61,500		
Total	8017,000	6			
Corrected Total	1283,500	5			

a. R Squared = ,856 (Adjusted R Squared = ,760)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset	
		1	2
60,00	2	22,0000	
30,00	2	26,0000	
100,00	2		52,5000
Sig.		,645	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 61,500.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b. Alpha = ,05.

**Diferentes KLa 3 L- Comparação do PF**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
kla 2,20	2,20	24
3,30	3,30	21
4,54	4,54	24

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PF

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	20456,257 <sup>a</sup>	2	10228,128	65,923	,000
Intercept	307375,556	1	307375,556	1981,104	,000
KLA	20456,257	2	10228,128	65,923	,000
Error	10240,143	66	155,154		
Total	348662,612	69			
Corrected Total	30696,400	68			

a. R Squared = ,666 (Adjusted R Squared = ,656)

**Post Hoc Tests**

**kla**

**Homogeneous Subsets**

**PF**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

kla	N	Subset		
		1	2	3
3,30	21	43,6967		
2,20	24		70,8333	
4,54	24			86,0979
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 155,154.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 22,909.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = ,05.

**Diferentes KLa 3L - Comparação do PS**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
kla	2,20	24
	3,30	21
	4,54	24

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	77,995 <sup>a</sup>	2	38,997	24,862	,000
Intercept	909,626	1	909,626	579,924	,000
KLA	77,995	2	38,997	24,862	,000
Error	103,523	66	1,569		
Total	1117,563	69			
Corrected Total	181,517	68			

a. R Squared = ,430 (Adjusted R Squared = ,412)

**Post Hoc Tests**

**kla**

**Homogeneous Subsets**

**PS**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

kla	N	Subset	
		1	2
3,30	21	2,5995	
2,20	24	3,2158	
4,54	24		5,0987
Sig.		,101	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1,569.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 22,909.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**BIOSTAT-Viabilidades a KLa 2,20; 3,30 e 4,54 1/h  
Oneway**

**ANOVA**

VIABIL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1087,282	2	543,641	4,729	,011
Within Groups	13106,568	114	114,970		
Total	14193,850	116			

**Post Hoc Tests**

**Homogeneous Subsets**

**VIABIL**

Duncan<sup>a,b</sup>

kla	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3,30	42	73,0300	
2,20	42		78,8029
4,54	33		79,9603
Sig.		1,000	,637

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 38,500.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

**CAPÍTULO 5**

**TM 7 L - Dispersor poroso e agitador em hélice - 60 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	329,667 <sup>a</sup>	3	109,889	219,778	,000
	4256,333	1	4256,333	8512,667	,000
	329,667	3	109,889	219,778	,000
	4,000	8	,500		
	4590,000	12			
	333,667	11			

a. R Squared = ,988 (Adjusted R Squared = ,984)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,12	3	13,0000		
,04	3		17,3333	
,08	3		17,6667	
,02	3			27,3333
Sig.		1,000	,580	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,500.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L-Dispensor poroso e agitador em hélice - 100 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	336,917 <sup>a</sup>	3	112,306	224,611	,000
Intercept	2002,083	1	2002,083	4004,167	,000
AREJAM	336,917	3	112,306	224,611	,000
Error	4,000	8	,500		
Total	2343,000	12			
Corrected Total	340,917	11			

a. R Squared = ,988 (Adjusted R Squared = ,984)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,12	3	6,6667		
,08	3		11,6667	
,04	3		12,0000	
,02	3			21,3333
Sig.		1,000	,580	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,500.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L-Dispensor poroso e agitador em hélice-250 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6,250 <sup>a</sup>	3	2,083	4,167	,047
Intercept	546,750	1	546,750	1093,500	,000
AREJAM	6,250	3	2,083	4,167	,047
Error	4,000	8	,500		
Total	557,000	12			
Corrected Total	10,250	11			

a. R Squared = ,610 (Adjusted R Squared = ,463)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
,12	3	5,6667	
,04	3	6,6667	6,6667
,08	3	7,0000	7,0000
,02	3		7,6667
Sig.		,058	,135

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,500.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 1 agitador em hélice - 0,02 vvm e dif agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	609,556 <sup>a</sup>	2	304,778	914,333	,000
Intercept	3173,444	1	3173,444	9520,333	,000
AGIT	609,556	2	304,778	914,333	,000
Error	2,000	6	,333		
Total	3785,000	9			
Corrected Total	611,556	8			

a. R Squared = ,997 (Adjusted R Squared = ,996)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	7,6667		
100,00	3		21,3333	
60,00	3			27,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,333.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e agitador em hélice - 0,04 vvm e dif agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	170,667 <sup>a</sup>	2	85,333	153,600	,000
	1296,000	1	1296,000	2332,800	,000
	170,667	2	85,333	153,600	,000
	3,333	6	,556		
	1470,000	9			
	174,000	8			

a. R Squared = ,981 (Adjusted R Squared = ,974)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	6,6667		
100,00	3		12,0000	
60,00	3			17,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,556.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 1 agitador em hélice - 0,08 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	171,556 <sup>a</sup>	2	85,778	154,400	,000
	1320,111	1	1320,111	2376,200	,000
	171,556	2	85,778	154,400	,000
	3,333	6	,556		
	1495,000	9			
	174,889	8			

a. R Squared = ,981 (Adjusted R Squared = ,975)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	7,0000		
100,00	3		11,6667	
60,00	3			17,6667
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,556.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 1 agitador em hélice - 0,12 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	94,889 <sup>a</sup>	2	47,444	85,400	,000
	641,778	1	641,778	1155,200	,000
	94,889	2	47,444	85,400	,000
	3,333	6	,556		
	740,000	9			
	98,222	8			

a. R Squared = ,966 (Adjusted R Squared = ,955)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset	
		1	2
250,00	3	5,6667	
100,00	3	6,6667	
60,00	3		13,0000
Sig.		,151	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,556.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L-Dispensor poroso e agitador em hélice - dif. agitações**

**Oneway**

**ANOVA**

TM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	876,167	2	438,083	21,110	,000
Within Groups	684,833	33	20,753		
Total	1561,000	35			

**Post Hoc Tests  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a</sup>

AGIT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
250,00	12	6,7500		
100,00	12		12,9167	
60,00	12			18,8333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

**Tempos de Mistura 7 L - dispersor em L e agitador em hélice- 60 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3076,563 <sup>a</sup>	3	1025,521	7032,143	,000
Intercept	15732,521	1	15732,521	107880,1	,000
AREJAM	3076,562	3	1025,521	7032,143	,000
Error	1,167	8	,146		
Total	18810,250	12			
Corrected Total	3077,729	11			

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = ,999)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,12	3	20,0000		
,08	3	20,5000		
,04	3		50,3333	
,02	3			54,0000
Sig.		,147	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,146.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Tempos de Mistura 7 L - Dispersor em L e agitador em hélice 100 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2622,750 <sup>a</sup>	3	874,250	4196,400	,000
Intercept	13534,083	1	13534,083	64963,600	,000
AREJAM	2622,750	3	874,250	4196,400	,000
Error	1,667	8	,208		
Total	16158,500	12			
Corrected Total	2624,417	11			

a. R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,999)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset			
		1	2	3	4
,12	3	18,5000			
,08	3		24,5000		
,04	3			34,0000	
,02	3				57,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,208.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Tempos de Mistura 7L - dispersor em L e agitador em hélice - 250 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	40,500 <sup>a</sup>	3	13,500	108,000	,000
Intercept	2883,000	1	2883,000	23064,000	,000
AREJAM	40,500	3	13,500	108,000	,000
Error	1,000	8	,125		
Total	2924,500	12			
Corrected Total	41,500	11			

a. R Squared = ,976 (Adjusted R Squared = ,967)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,08	3	13,0000		
,12	3		14,5000	
,02	3			17,0000
,04	3			17,5000
Sig.		1,000	1,000	,122

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,125.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 1 agitador em hélice - 0,02 vvm e dif. agitações  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3006,889 <sup>a</sup>	2	1503,444	13531,000	,000
Intercept	16469,444	1	16469,444	148225,0	,000
AGIT	3006,889	2	1503,444	13531,000	,000
Error	,667	6	,111		
Total	19477,000	9			
Corrected Total	3007,556	8			

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = 1,000)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	17,0000		
60,00	3		54,0000	
100,00	3			57,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,111.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 1 agitador em hélice - 0,04 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1617,056 <sup>a</sup>	2	808,528	4158,143	,000
Intercept	10370,028	1	10370,028	53331,571	,000
AGIT	1617,056	2	808,528	4158,143	,000
Error	1,167	6	,194		
Total	11988,250	9			
Corrected Total	1618,222	8			

a. R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,999)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	17,5000		
100,00	3		34,0000	
60,00	3			50,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,194.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e agitador em hélice - 0,08 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	204,500 <sup>a</sup>	2	102,250	613,500	,000
Intercept	3364,000	1	3364,000	20184,000	,000
AGIT	204,500	2	102,250	613,500	,000
Error	1,000	6	,167		
Total	3569,500	9			
Corrected Total	205,500	8			

a. R Squared = ,995 (Adjusted R Squared = ,994)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	13,0000		
60,00	3		20,5000	
100,00	3			24,5000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,167.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e agitador em hélice - 0,12 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	48,500 <sup>a</sup>	2	24,250	145,500	,000
Intercept	2809,000	1	2809,000	16854,000	,000
AGIT	48,500	2	24,250	145,500	,000
Error	1,000	6	,167		
Total	2858,500	9			
Corrected Total	49,500	8			

a. R Squared = ,980 (Adjusted R Squared = ,973)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	14,5000		
100,00	3		18,5000	
60,00	3			20,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,167.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L-dispersor em L e agitador em hélice - diferentes agitações**  
**Oneway**

**ANOVA**

TM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3050,931	2	1525,465	8,765	,001
Within Groups	5743,646	33	174,050		
Total	8794,576	35			

**Post Hoc Tests**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a</sup>

AGIT	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
250,00	12	15,5000	
100,00	12		33,5833
60,00	12		36,2083
Sig.		1,000	,629

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

**TM 7 L - Dispersor em L e 1 turbina de Rushton - 60 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	868,250 <sup>a</sup>	3	289,417	124,036	,000
Intercept	7154,083	1	7154,083	3066,036	,000
AREJAM	868,250	3	289,417	124,036	,000
Error	18,667	8	2,333		
Total	8041,000	12			
Corrected Total	886,917	11			

a. R Squared = ,979 (Adjusted R Squared = ,971)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,12	3	17,0000		
,08	3	19,0000		
,04	3		23,0000	
,02	3			38,6667
Sig.		,147	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2,333.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispersor em L e 1 Turbina de Rushton - 100 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	80,333 <sup>a</sup>	3	26,778	12,359	,002
Intercept	2760,333	1	2760,333	1274,000	,000
AREJAM	80,333	3	26,778	12,359	,002
Error	17,333	8	2,167		
Total	2858,000	12			
Corrected Total	97,667	11			

a. R Squared = ,823 (Adjusted R Squared = ,756)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
,12	3	12,3333	
,04	3	14,0000	
,08	3	15,0000	
,02	3		19,3333
Sig.		,066	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2,167.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispersor em L e 1 Turbina de Rushton - 250 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8,250 <sup>a</sup>	3	2,750	33,000	,000
Intercept	690,083	1	690,083	8281,000	,000
AREJAM	8,250	3	2,750	33,000	,000
Error	,667	8	,083		
Total	699,000	12			
Corrected Total	8,917	11			

a. R Squared = ,925 (Adjusted R Squared = ,897)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
,02	3	7,0000	
,04	3	7,0000	
,08	3	7,3333	
,12	3		9,0000
Sig.		,212	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,083.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 1 turbina de Rushton - 0,02 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1528,667 <sup>a</sup>	2	764,333	343,950	,000
Intercept	4225,000	1	4225,000	1901,250	,000
AGIT	1528,667	2	764,333	343,950	,000
Error	13,333	6	2,222		
Total	5767,000	9			
Corrected Total	1542,000	8			

a. R Squared = ,991 (Adjusted R Squared = ,988)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	7,0000		
100,00	3		19,3333	
60,00	3			38,6667
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2,222.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 1 turbina de Rushton - 0,04 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	386,000 <sup>a</sup>	2	193,000	144,750	,000
	1936,000	1	1936,000	1452,000	,000
	386,000	2	193,000	144,750	,000
	8,000	6	1,333		
	2330,000	9			
	394,000	8			

a. R Squared = ,980 (Adjusted R Squared = ,973)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	7,0000		
100,00	3		14,0000	
60,00	3			23,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1,333.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 1 turbina de Rushton - 0,08 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	210,889 <sup>a</sup>	2	105,444	135,571	,000
	1708,444	1	1708,444	2196,571	,000
	210,889	2	105,444	135,571	,000
	4,667	6	,778		
	1924,000	9			
	215,556	8			

a. R Squared = ,978 (Adjusted R Squared = ,971)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	7,3333		
100,00	3		15,0000	
60,00	3			19,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,778.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 1 turbina de Rushton - 0,12 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TM

	96,889 <sup>a</sup>	2	48,444	27,250	,001
	1469,444	1	1469,444	826,562	,000
	96,889	2	48,444	27,250	,001
	10,667	6	1,778		
	1577,000	9			
	107,556	8			

a. R Squared = ,901 (Adjusted R Squared = ,868)

### Post Hoc Tests

AGIT

### Homogeneous Subsets

TM

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	9,0000		
100,00	3		12,3333	
60,00	3			17,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1,778.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

### TM 7 L - Dispensor em L e 1 Turbina de Rushton - dif. agitações

### Oneway

### ANOVA

TM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1705,722	2	852,861	28,329	,000
Within Groups	993,500	33	30,106		
Total	2699,222	35			

**Post Hoc Tests  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a</sup>

AGIT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
250,00	12	7,5833		
100,00	12		15,1667	
60,00	12			24,4167
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

**TM 7 L-Dispensor poroso e 1 turbina de Rushton - 60 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	124,917 <sup>a</sup>	3	41,639	41,639	,000
Intercept	3234,083	1	3234,083	3234,083	,000
AREJAM	124,917	3	41,639	41,639	,000
Error	8,000	8	1,000		
Total	3367,000	12			
Corrected Total	132,917	11			

a. R Squared = ,940 (Adjusted R Squared = ,917)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

TM

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,12	3	11,3333		
,08	3		16,0000	
,04	3			18,6667
,02	3			19,6667
Sig.		1,000	1,000	,256

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1,000.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispensor poroso e 1 turbina de Rushton - 100 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	96,667 <sup>a</sup>	3	32,222	42,963	,000
Intercept	1633,333	1	1633,333	2177,778	,000
AREJAM	96,667	3	32,222	42,963	,000
Error	6,000	8	,750		
Total	1736,000	12			
Corrected Total	102,667	11			

a. R Squared = ,942 (Adjusted R Squared = ,920)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
,08	3	8,6667	
,12	3	9,0000	
,04	3		14,3333
,02	3		14,6667
Sig.		,650	,650

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,750.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispensor poroso e 1 turbina de Rushton - 250 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8,333 <sup>a</sup>	3	2,778	6,667	,014
Intercept	280,333	1	280,333	672,800	,000
AREJAM	8,333	3	2,778	6,667	,014
Error	3,333	8	,417		
Total	292,000	12			
Corrected Total	11,667	11			

a. R Squared = ,714 (Adjusted R Squared = ,607)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,12	3	3,6667		
,08	3	4,6667	4,6667	
,04	3		5,0000	5,0000
,02	3			6,0000
Sig.		,094	,545	,094

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,417.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 1 turbina de Rushton - 0,02 vvm e dif. agitações  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	286,889 <sup>a</sup>	2	143,444	645,500	,000
Intercept	1626,778	1	1626,778	7320,500	,000
AGIT	286,889	2	143,444	645,500	,000
Error	1,333	6	,222		
Total	1915,000	9			
Corrected Total	288,222	8			

a. R Squared = ,995 (Adjusted R Squared = ,994)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	6,0000		
100,00	3		14,6667	
60,00	3			19,6667
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,222.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 1 turbina de Rushton - 0,04 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	292,667 <sup>a</sup>	2	146,333	119,727	,000
Intercept	1444,000	1	1444,000	1181,455	,000
AGIT	292,667	2	146,333	119,727	,000
Error	7,333	6	1,222		
Total	1744,000	9			
Corrected Total	300,000	8			

a. R Squared = ,976 (Adjusted R Squared = ,967)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	5,0000		
100,00	3		14,3333	
60,00	3			18,6667
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1,222.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 1 turbina de Rushton - 0,08 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	198,222 <sup>a</sup>	2	99,111	111,500	,000
Intercept	860,444	1	860,444	968,000	,000
AGIT	198,222	2	99,111	111,500	,000
Error	5,333	6	,889		
Total	1064,000	9			
Corrected Total	203,556	8			

a. R Squared = ,974 (Adjusted R Squared = ,965)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	4,6667		
100,00	3		8,6667	
60,00	3			16,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,889.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 1 turbina de Rushton - 0,12 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	92,667 <sup>a</sup>	2	46,333	83,400	,000
Intercept	576,000	1	576,000	1036,800	,000
AGIT	92,667	2	46,333	83,400	,000
Error	3,333	6	,556		
Total	672,000	9			
Corrected Total	96,000	8			

a. R Squared = ,965 (Adjusted R Squared = ,954)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	3,6667		
100,00	3		9,0000	
60,00	3			11,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,556.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispensor poroso e 1 turbina de Rushton - dif. agitações**  
**Oneway**

**ANOVA**

TM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	813,722	2	406,861	54,303	,000
Within Groups	247,250	33	7,492		
Total	1060,972	35			

**Post Hoc Tests**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a</sup>

AGIT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
250,00	12	4,8333		
100,00	12		11,6667	
60,00	12			16,4167
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

**TM 7 L-Dispensor em L e 2 agitadores em hélice - 60 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	42,563 <sup>a</sup>	3	14,188	75,667	,000
Intercept	2146,687	1	2146,687	11449,000	,000
AREJAM	42,562	3	14,187	75,667	,000
Error	1,500	8	,188		
Total	2190,750	12			
Corrected Total	44,063	11			

a. R Squared = ,966 (Adjusted R Squared = ,953)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
,08	3	11,5000	
,12	3	11,5000	
,04	3		15,0000
,02	3		15,5000
Sig.		1,000	,195

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,188.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispersor em L e 2 agitadores em hélice - 100 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	19,500 <sup>a</sup>	3	6,500	52,000	,000
Intercept	588,000	1	588,000	4704,000	,000
AREJAM	19,500	3	6,500	52,000	,000
Error	1,000	8	,125		
Total	608,500	12			
Corrected Total	20,500	11			

a. R Squared = ,951 (Adjusted R Squared = ,933)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,12	3	5,5000		
,04	3		6,5000	
,08	3		7,0000	
,02	3			9,0000
Sig.		1,000	,122	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,125.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L- Dispersor em L e 2 agitadores em hélice-250 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12,750 <sup>a</sup>	3	4,250	34,000	,000
Intercept	216,750	1	216,750	1734,000	,000
AREJAM	12,750	3	4,250	34,000	,000
Error	1,000	8	,125		
Total	230,500	12			
Corrected Total	13,750	11			

a. R Squared = ,927 (Adjusted R Squared = ,900)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
,12	3	3,0000	
,08	3	3,5000	
,04	3		5,0000
,02	3		5,5000
Sig.		,122	,122

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,125.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 2 agitadores em hélice - 0,02 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	154,500 <sup>a</sup>	2	77,250	463,500	,000
Intercept	900,000	1	900,000	5400,000	,000
AGIT	154,500	2	77,250	463,500	,000
Error	1,000	6	,167		
Total	1055,500	9			
Corrected Total	155,500	8			

a. R Squared = ,994 (Adjusted R Squared = ,991)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	5,5000		
100,00	3		9,0000	
60,00	3			15,5000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,167.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 2 agitadores em hélice - 0,04 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	174,500 <sup>a</sup>	2	87,250	1047,000	,000
	702,250	1	702,250	8427,000	,000
	174,500	2	87,250	1047,000	,000
	,500	6	,083		
	877,250	9			
	175,000	8			

a. R Squared = ,997 (Adjusted R Squared = ,996)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	5,0000		
100,00	3		6,5000	
60,00	3			15,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,083.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 2 agitadores em hélice - 0,08 vvm e dif. agitações**

**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	96,500 <sup>a</sup>	2	48,250	289,500	,000
	484,000	1	484,000	2904,000	,000
	96,500	2	48,250	289,500	,000
	1,000	6	,167		
	581,500	9			
	97,500	8			

a. R Squared = ,990 (Adjusted R Squared = ,986)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	3,5000		
100,00	3		7,0000	
60,00	3			11,5000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,167.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 2 agitadores em hélice - 0,12 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	114,500 <sup>a</sup>	2	57,250	343,500	,000
	400,000	1	400,000	2400,000	,000
	114,500	2	57,250	343,500	,000
	1,000	6	,167		
	515,500	9			
	115,500	8			

a. R Squared = ,991 (Adjusted R Squared = ,988)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	3,0000		
100,00	3		5,5000	
60,00	3			11,5000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,167.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7L- Dispensor em L e 2 agitadores em Hélice- dif. agitações**

**Oneway**

**ANOVA**

TM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	525,875	2	262,938	110,799	,000
Within Groups	78,313	33	2,373		
Total	604,188	35			

**Post Hoc Tests  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a</sup>

AGIT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
250,00	12	4,2500		
100,00	12		7,0000	
60,00	12			13,3750
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

**TM 7 L - Dispersor em L e 2 turbinas de Rushton - 60 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	20,250 <sup>a</sup>	3	6,750	5,400	,025
Intercept	2436,750	1	2436,750	1949,400	,000
AREJAM	20,250	3	6,750	5,400	,025
Error	10,000	8	1,250		
Total	2467,000	12			
Corrected Total	30,250	11			

a. R Squared = ,669 (Adjusted R Squared = ,545)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
,08	3	13,0000	
,12	3	13,0000	
,02	3	15,0000	15,0000
,04	3		16,0000
Sig.		,069	,305

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1,250.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispersor em L e 2 turbinas de Rushton - 100 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8,917 <sup>a</sup>	3	2,972	3,242	,081
Intercept	1026,750	1	1026,750	1120,091	,000
AREJAM	8,917	3	2,972	3,242	,081
Error	7,333	8	,917		
Total	1043,000	12			
Corrected Total	16,250	11			

a. R Squared = ,549 (Adjusted R Squared = ,379)

**Post Hoc Tests**  
**arejam**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
,08	3	8,3333	
,04	3	9,0000	9,0000
,12	3	9,0000	9,0000
,02	3		10,6667
Sig.		,437	,075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,917.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispersor em L e 2 turbinas de Rushton - 250 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7,333 <sup>a</sup>	3	2,444	5,867	,020
Intercept	341,333	1	341,333	819,200	,000
AREJAM	7,333	3	2,444	5,867	,020
Error	3,333	8	,417		
Total	352,000	12			
Corrected Total	10,667	11			

a. R Squared = ,688 (Adjusted R Squared = ,570)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
,08	3	4,6667	
,04	3	5,0000	
,12	3	5,0000	
,02	3		6,6667
Sig.		,561	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,417.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 2 turbinas de Rushton - 0,02 vvm e dif. agitações  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	104,222 <sup>a</sup>	2	52,111	58,625	,000
Intercept	1045,444	1	1045,444	1176,125	,000
AGIT	104,222	2	52,111	58,625	,000
Error	5,333	6	,889		
Total	1155,000	9			
Corrected Total	109,556	8			

a. R Squared = ,951 (Adjusted R Squared = ,935)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	6,6667		
100,00	3		10,6667	
60,00	3			15,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,889.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 2 turbinas de Rushton - 0,04 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	186,000 <sup>a</sup>	2	93,000	69,750	,000
Intercept	900,000	1	900,000	675,000	,000
AGIT	186,000	2	93,000	69,750	,000
Error	8,000	6	1,333		
Total	1094,000	9			
Corrected Total	194,000	8			

a. R Squared = ,959 (Adjusted R Squared = ,945)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	5,0000		
100,00	3		9,0000	
60,00	3			16,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1,333.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor em L e 2 turbinas de Rushton - 0,08 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	104,667 <sup>a</sup>	2	52,333	94,200	,000
Intercept	676,000	1	676,000	1216,800	,000
AGIT	104,667	2	52,333	94,200	,000
Error	3,333	6	,556		
Total	784,000	9			
Corrected Total	108,000	8			

a. R Squared = ,969 (Adjusted R Squared = ,959)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	4,6667		
100,00	3		8,3333	
60,00	3			13,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,556.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM dispersor em L e 2 turbinas de Rushton - 0,12 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	96,000 <sup>a</sup>	2	48,000	72,000	,000
Intercept	729,000	1	729,000	1093,500	,000
AGIT	96,000	2	48,000	72,000	,000
Error	4,000	6	,667		
Total	829,000	9			
Corrected Total	100,000	8			

a. R Squared = ,960 (Adjusted R Squared = ,947)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	5,0000		
100,00	3		9,0000	
60,00	3			13,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,667.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7L - Dispersor em L e 2 turbinas de Rushton - dif. agitações**  
**Oneway**

**ANOVA**

TM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	479,389	2	239,694	138,366	,000
Within Groups	57,167	33	1,732		
Total	536,556	35			

**Post Hoc Tests**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a</sup>

AGIT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
250,00	12	5,3333		
100,00	12		9,2500	
60,00	12			14,2500
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

**Tm 7 L- Dispersor poroso e 2 agitadores em hélice - 60 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	228,917 <sup>a</sup>	3	76,306	152,611	,000
Intercept	3710,083	1	3710,083	7420,167	,000
AREJAM	228,917	3	76,306	152,611	,000
Error	4,000	8	,500		
Total	3943,000	12			
Corrected Total	232,917	11			

a. R Squared = ,983 (Adjusted R Squared = ,976)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,08	3	11,3333		
,04	3		17,3333	
,12	3		18,0000	
,02	3			23,6667
Sig.		1,000	,282	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,500.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L- Dispersor poroso e 2 agitadores em hélice - 100 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	124,667 <sup>a</sup>	3	41,556	99,733	,000
Intercept	1728,000	1	1728,000	4147,200	,000
AREJAM	124,667	3	41,556	99,733	,000
Error	3,333	8	,417		
Total	1856,000	12			
Corrected Total	128,000	11			

a. R Squared = ,974 (Adjusted R Squared = ,964)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,08	3	9,0000		
,12	3	10,0000		
,04	3		11,6667	
,02	3			17,3333
Sig.		,094	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,417.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L- Dispersor poroso e 2 agitadores em hélice - 250 rpm**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	47,583 <sup>a</sup>	3	15,861	95,167	,000
Intercept	420,083	1	420,083	2520,500	,000
AREJAM	47,583	3	15,861	95,167	,000
Error	1,333	8	,167		
Total	469,000	12			
Corrected Total	48,917	11			

a. R Squared = ,973 (Adjusted R Squared = ,963)

**Post Hoc Tests**

**arejam**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset	
		1	2
,08	3	4,3333	
,04	3	5,0000	
,12	3	5,0000	
,02	3		9,3333
Sig.		,091	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,167.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Tm 7 L dispersor poroso e 2 agitadores em hélice - 0,02 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	309,556 <sup>a</sup>	2	154,778	464,333	,000
Intercept	2533,444	1	2533,444	7600,333	,000
AGIT	309,556	2	154,778	464,333	,000
Error	2,000	6	,333		
Total	2845,000	9			
Corrected Total	311,556	8			

a. R Squared = ,994 (Adjusted R Squared = ,991)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	9,3333		
100,00	3		17,3333	
60,00	3			23,6667
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,333.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 2 agitadores em hélice - 0,04 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	228,667 <sup>a</sup>	2	114,333	205,800	,000
	1156,000	1	1156,000	2080,800	,000
	228,667	2	114,333	205,800	,000
	3,333	6	,556		
	1388,000	9			
	232,000	8			

a. R Squared = ,986 (Adjusted R Squared = ,981)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	5,0000		
100,00	3		11,6667	
60,00	3			17,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,556.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 2 agitadores em hélice - 0,08 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

	76,222 <sup>a</sup>	2	38,111	171,500	,000
	608,444	1	608,444	2738,000	,000
	76,222	2	38,111	171,500	,000
	1,333	6	,222		
	686,000	9			
	77,556	8			

a. R Squared = ,983 (Adjusted R Squared = ,977)

**Post Hoc Tests**

**AGIT**

**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	4,3333		
100,00	3		9,0000	
60,00	3			11,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,222.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 2 agitadores em hélice - 0,12 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
AGIT 60,00	3
100,00	3
250,00	3

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TM

	258,000 <sup>a</sup>	2	129,000	387,000	,000
	1089,000	1	1089,000	3267,000	,000
	258,000	2	129,000	387,000	,000
	2,000	6	,333		
	1349,000	9			
	260,000	8			

a. R Squared = ,992 (Adjusted R Squared = ,990)

### Post Hoc Tests

AGIT

### Homogeneous Subsets

TM

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	5,0000		
100,00	3		10,0000	
60,00	3			18,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,333.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

### TM 7 L-Dispensor poroso e 2 agitadores em hélice - dif. agitações

Oneway

### ANOVA

TM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	817,167	2	408,583	32,899	,000
Within Groups	409,833	33	12,419		
Total	1227,000	35			

**Post Hoc Tests  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a</sup>

AGIT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
250,00	12	5,9167		
100,00	12		12,0000	
60,00	12			17,5833
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

**TM 7 L - Dispensor poroso e 2 turbinas de Rushton - 60 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,917 <sup>a</sup>	3	,306	,407	,752
Intercept	1752,083	1	1752,083	2336,111	,000
AREJAM	,917	3	,306	,407	,752
Error	6,000	8	,750		
Total	1759,000	12			
Corrected Total	6,917	11			

a. R Squared = ,133 (Adjusted R Squared = -,193)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset
		1
,04	3	11,6667
,02	3	12,0000
,08	3	12,3333
,12	3	12,3333
Sig.		,400

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,750.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispensor poroso e 2 turbinas de Rushton - 100 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	16,917 <sup>a</sup>	3	5,639	22,556	,000
Intercept	602,083	1	602,083	2408,333	,000
AREJAM	16,917	3	5,639	22,556	,000
Error	2,000	8	,250		
Total	621,000	12			
Corrected Total	18,917	11			

a. R Squared = ,894 (Adjusted R Squared = ,855)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

TM

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset		
		1	2	3
,02	3	5,3333		
,12	3		6,6667	
,08	3			8,0000
,04	3			8,3333
Sig.		1,000	1,000	,438

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,250.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispensor poroso e 2 turbinas de Rushton - 250 rpm  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
arejam ,02	3
,04	3
,08	3
,12	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1,583 <sup>a</sup>	3	,528	1,267	,349
Intercept	154,083	1	154,083	369,800	,000
AREJAM	1,583	3	,528	1,267	,349
Error	3,333	8	,417		
Total	159,000	12			
Corrected Total	4,917	11			

a. R Squared = ,322 (Adjusted R Squared = ,068)

**Post Hoc Tests  
arejam  
Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

arejam	N	Subset
		1
,12	3	3,0000
,02	3	3,6667
,04	3	3,6667
,08	3	4,0000
Sig.		,113

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,417.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 2 turbinas de Rushton - 0,02 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	116,667 <sup>a</sup>	2	58,333	262,500	,000
Intercept	441,000	1	441,000	1984,500	,000
AGIT	116,667	2	58,333	262,500	,000
Error	1,333	6	,222		
Total	559,000	9			
Corrected Total	118,000	8			

a. R Squared = ,989 (Adjusted R Squared = ,985)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	3,6667		
100,00	3		5,3333	
60,00	3			12,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,222.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Tm 7 L dispersor poroso e 2 turbinas de Rushton -0,04 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	96,889 <sup>a</sup>	2	48,444	145,333	,000
Intercept	560,111	1	560,111	1680,333	,000
AGIT	96,889	2	48,444	145,333	,000
Error	2,000	6	,333		
Total	659,000	9			
Corrected Total	98,889	8			

a. R Squared = ,980 (Adjusted R Squared = ,973)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	3,6667		
100,00	3		8,3333	
60,00	3			11,6667
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,333.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor poroso e 2 turbinas de Rushton - 0,08 vvm e dif. agitadores**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	104,222 <sup>a</sup>	2	52,111	117,250	,000
Intercept	592,111	1	592,111	1332,250	,000
AGIT	104,222	2	52,111	117,250	,000
Error	2,667	6	,444		
Total	699,000	9			
Corrected Total	106,889	8			

a. R Squared = ,975 (Adjusted R Squared = ,967)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	4,0000		
100,00	3		8,0000	
60,00	3			12,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,444.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L dispersor posoro e 2 turbinas de Rushton - 0,12 vvm e dif. agitações**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

		N
AGIT	60,00	3
	100,00	3
	250,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: TM

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	132,667 <sup>a</sup>	2	66,333	74,625	,000
Intercept	484,000	1	484,000	544,500	,000
AGIT	132,667	2	66,333	74,625	,000
Error	5,333	6	,889		
Total	622,000	9			
Corrected Total	138,000	8			

a. R Squared = ,961 (Adjusted R Squared = ,948)

**Post Hoc Tests**  
**AGIT**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a,b</sup>

AGIT	N	Subset		
		1	2	3
250,00	3	3,0000		
100,00	3		6,6667	
60,00	3			12,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,889.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**TM 7 L - Dispersor poroso e 2 turbinas de Rushton - dif. agitações**  
**Oneway**

**ANOVA**

TM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	438,000	2	219,000	235,024	,000
Within Groups	30,750	33	,932		
Total	468,750	35			

**Post Hoc Tests**  
**Homogeneous Subsets**

**TM**

Duncan<sup>a</sup>

AGIT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
250,00	12	3,5833		
100,00	12		7,0833	
60,00	12			12,0833
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

**Comparação de 2 e 7 L - PF e PS**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3
8,00	3
10,00	3
12,00	3
14,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PF

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	84612,972 <sup>a</sup>	7	12087,567	162,525	,000
Intercept	391707,050	1	391707,050	5266,741	,000
TEMPO	84612,972	7	12087,567	162,525	,000
Error	1189,979	16	74,374		
Total	477510,001	24			
Corrected Total	85802,951	23			

a. R Squared = ,986 (Adjusted R Squared = ,980)

**Post Hoc Tests**

**TEMPO**

**Homogeneous Subsets**

**PF**

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset				
		1	2	3	4	5
2,00	3	63,9067				
,00	3	65,2067				
4,00	3	70,9933				
6,00	3		104,3933			
8,00	3			131,7067		
10,00	3				152,4200	
12,00	3					216,4067
14,00	3					217,0000
Sig.		,355	1,000	1,000	1,000	,934

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 74,374.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

## Univariate Analysis of Variance

### Between-Subjects Factors

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3
8,00	3
10,00	3
12,00	3
14,00	3

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	110,544 <sup>a</sup>	7	15,792	165,217	,000
Intercept	834,025	1	834,025	8725,628	,000
TEMPO	110,544	7	15,792	165,217	,000
Error	1,529	16	,096		
Total	946,098	24			
Corrected Total	112,073	23			

a. R Squared = ,986 (Adjusted R Squared = ,980)

### Post Hoc Tests

#### TEMPO

#### Homogeneous Subsets

#### PS

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
,00	3	2,7333					
2,00	3	3,0200					
4,00	3		4,5933				
6,00	3			5,5667			
8,00	3				6,7133		
10,00	3					7,6133	
14,00	3						8,4200
12,00	3						8,5000
Sig.		,273	1,000	1,000	1,000	1,000	,755

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,096.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

### General Linear Model

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	PF	1315,851 <sup>a</sup>	3	438,617	11,277	,003
	PS	8,204 <sup>b</sup>	3	2,735	27,774	,000
Intercept	PF	77129,954	1	77129,954	1983,034	,000
	PS	291,265	1	291,265	2958,001	,000
TEMPO	PF	1315,851	3	438,617	11,277	,003
	PS	8,204	3	2,735	27,774	,000
Error	PF	311,159	8	38,895		
	PS	,788	8	,098		
Total	PF	78756,964	12			
	PS	300,257	12			
Corrected Total	PF	1627,010	11			
	PS	8,992	11			

a. R Squared = ,809 (Adjusted R Squared = ,737)

b. R Squared = ,912 (Adjusted R Squared = ,880)

**Post Hoc Tests**

**TEMPO**

**Homogeneous Subsets**

**PF**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

TEMPO	N	Subset	
		1	2
,00	3	63,0067	
2,00	3		82,8433
6,00	3		83,4300
4,00	3		91,4067
Sig.		1,000	,145

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 38,895.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**PS**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

TEMPO	N	Subset		
		1	2	3
,00	3	3,6333		
6,00	3		4,7800	
2,00	3			5,6033
4,00	3			5,6900
Sig.		1,000	1,000	,744

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
Based on Type III Sum of Squares  
The error term is Mean Square(Error) = ,098.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

**Cultura em biorreactor de 7 L com dispersor poroso e um agitador em hélice- peso fresco**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3
9,00	3
11,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PF

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	108623,151 <sup>a</sup>	5	21724,630	123,231	,000
Intercept	376567,347	1	376567,347	2136,047	,000
TEMPO	108623,151	5	21724,630	123,231	,000
Error	2115,500	12	176,292		
Total	487305,998	18			
Corrected Total	110738,651	17			

a. R Squared = ,981 (Adjusted R Squared = ,973)

**Post Hoc Tests**  
**TEMPO**  
**Homogeneous Subsets**

PF

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset			
		1	2	3	4
2,00	3	60,5367			
,00	3	65,3700			
4,00	3		100,5733		
6,00	3			147,6533	
9,00	3				245,1333
11,00	3				248,5667
Sig.		,664	1,000	1,000	,757

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 176,292.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Cultura em biorreactor de 7 L com dispersor poroso e um agitador em hélice - peso seco**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3
9,00	3
11,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	112,091 <sup>a</sup>	5	22,418	503,027	,000
Intercept	560,009	1	560,009	12565,644	,000
TEMPO	112,091	5	22,418	503,027	,000
Error	,535	12	,045		
Total	672,635	18			
Corrected Total	112,626	17			

a. R Squared = ,995 (Adjusted R Squared = ,993)

**Post Hoc Tests**  
**TEMPO**  
**Homogeneous Subsets**

**PS**

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
,00	3	2,0800					
2,00	3		2,8900				
4,00	3			4,8100			
6,00	3				7,0467		
11,00	3					8,0767	
9,00	3						8,5633
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,045.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Biorreactor 7L c/ 1 agitador em hélice e dispersor em L-viabilidades relativas**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,0	3
2,0	3
4,0	3
6,0	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: L

	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,245 <sup>a</sup>	3	,082	115,242	,000
Intercept	8,207	1	8,207	11572,947	,000
TEMPO	,245	3	,082	115,242	,000
Error	,006	8	,001		
Total	8,458	12			
Corrected Total	,251	11			

a. R Squared = ,977 (Adjusted R Squared = ,969)

**Post Hoc Tests**  
**TEMPO**  
**Homogeneous Subsets**

L

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset			
		1	2	3	4
6,0	3	,6077			
4,0	3		,8140		
2,0	3			,8863	
,0	3				1,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,001.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Biorreactor 7L c/ 1agitador em hélice- dispersor poroso - viabilidades relativas**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,0	3
2,0	3
4,0	3
6,0	3
9,0	3
11,0	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: POROSO

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,020 <sup>a</sup>	5	,004	173,631	,000
Intercept	16,688	1	16,688	739640,6	,000
TEMPO	,020	5	,004	173,631	,000
Error	,000	12	2,256E-05		
Total	16,708	18			
Corrected Total	,020	17			

a. R Squared = ,986 (Adjusted R Squared = ,981)

**Post Hoc Tests**  
**TEMPO**  
**Homogeneous Subsets**

**POROSO**

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset			
		1	2	3	4
11,0	3	,91293			
9,0	3		,92831		
6,0	3			,96439	
4,0	3			,97145	
,0	3				1,00000
2,0	3				1,00011
Sig.		1,000	1,000	,094	,978

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2,256E-05.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Biorreactor 7L- dispersor poroso e uma turbina de Rushton - peso fresco**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3
8,00	3
10,00	3
12,00	3
14,00	3
17,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PF

	168069,939 <sup>a</sup>	8	21008,742	128,998	,000
	553437,093	1	553437,093	3398,212	,000
	168069,939	8	21008,742	128,998	,000
	2931,503	18	162,861		
	724438,535	27			
	171001,442	26			

a. R Squared = ,983 (Adjusted R Squared = ,975)

**Post Hoc Tests**

**TEMPO**

**Homogeneous Subsets**

**PF**

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset						
		1	2	3	4	5	6	7
,00	3	39,9640						
2,00	3		65,7100					
4,00	3		79,4067					
8,00	3			107,9767				
6,00	3			111,3933				
10,00	3				149,8167			
12,00	3					210,8733		
17,00	3						248,7833	
14,00	3							274,6067
Sig.		1,000	,205	,747	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 162,861.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Biorreactor de 7L - dispersor poroso e uma turbina de Rushton - peso seco**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3
8,00	3
10,00	3
12,00	3
14,00	3
17,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	163,229 <sup>a</sup>	8	20,404	61,592	,000
Intercept	1524,906	1	1524,906	4603,207	,000
TEMPO	163,229	8	20,404	61,592	,000
Error	5,963	18	,331		
Total	1694,098	27			
Corrected Total	169,192	26			

a. R Squared = ,965 (Adjusted R Squared = ,949)

**Post Hoc Tests**

**TEMPO**

**Homogeneous Subsets**

**PS**

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset				
		1	2	3	4	5
,00	3	3,4467				
2,00	3		4,8967			
4,00	3		5,6833			
6,00	3			6,7667		
8,00	3			6,8233		
10,00	3				9,4100	
17,00	3				9,7000	
12,00	3				9,7633	
14,00	3					11,1467
Sig.		1,000	,111	,905	,487	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,331.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Biorreactor de 7L dispersor poroso e 2 agitadores em hélice - peso fresco e peso seco  
Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3
8,00	3
10,00	3
12,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PF

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	19096,317 <sup>a</sup>	6	3182,719	199,127	,000
Intercept	118365,122	1	118365,122	7405,534	,000
TEMPO	19096,317	6	3182,719	199,127	,000
Error	223,767	14	15,983		
Total	137685,205	21			
Corrected Total	19320,083	20			

a. R Squared = ,988 (Adjusted R Squared = ,983)

**Post Hoc Tests**  
**TEMPO**  
**Homogeneous Subsets**

PF

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset						
		1	2	3	4	5	6	7
,00	3	32,8067						
2,00	3		41,7733					
4,00	3			57,5533				
6,00	3				73,2333			
8,00	3					98,2433		
12,00	3						106,1167	
10,00	3							115,8067
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 15,983.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3
8,00	3
10,00	3
12,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	67,116 <sup>a</sup>	6	11,186	323,427	,000
Intercept	477,620	1	477,620	13809,751	,000
TEMPO	67,116	6	11,186	323,427	,000
Error	,484	14	,035		
Total	545,220	21			
Corrected Total	67,600	20			

a. R Squared = ,993 (Adjusted R Squared = ,990)

**Post Hoc Tests**  
**TEMPO**  
**Homogeneous Subsets**

**PS**

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
,00	3	2,1533					
2,00	3		2,9367				
4,00	3			3,7367			
6,00	3				4,9900		
8,00	3					5,4167	
12,00	3						7,0333
10,00	3						7,1167
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	,592

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,035.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Biorreactor 7L dispersor poroso e 2 turbinas de Rushton - peso fresco e peso seco**  
**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3
8,00	3
10,00	3
12,00	3
14,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PF

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	264825,287 <sup>a</sup>	7	37832,184	30,484	,000
Intercept	1116027,569	1	1116027,569	899,252	,000
TEMPO	264825,287	7	37832,184	30,484	,000
Error	19856,999	16	1241,062		
Total	1400709,855	24			
Corrected Total	284682,286	23			

a. R Squared = ,930 (Adjusted R Squared = ,900)

**Post Hoc Tests**

**TEMPO**

**Homogeneous Subsets**

**PF**

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset			
		1	2	3	4
,00	3	71,8500			
2,00	3	81,1867			
4,00	3	122,2433			
6,00	3		210,1667		
14,00	3		250,8167	250,8167	
10,00	3			311,1467	311,1467
12,00	3				334,1867
8,00	3				343,5333
Sig.		,115	,177	,052	,302

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 1241,062.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

**Univariate Analysis of Variance**

**Between-Subjects Factors**

	N
TEMPO ,00	3
2,00	3
4,00	3
6,00	3
8,00	3
10,00	3
12,00	3
14,00	3

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PS

	220,112 <sup>a</sup>	7	31,445	97,606	,000
	1905,849	1	1905,849	5915,877	,000
	220,112	7	31,445	97,606	,000
	5,155	16	,322		
	2131,116	24			
	225,266	23			

a. R Squared = ,977 (Adjusted R Squared = ,967)

**Post Hoc Tests**

**TEMPO**

**Homogeneous Subsets**

**PS**

Duncan<sup>a,b</sup>

TEMPO	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
,00	3	3,8433					
2,00	3		5,2467				
4,00	3			7,1433			
6,00	3				9,4533		
14,00	3				9,4833		
10,00	3					11,3900	
12,00	3					11,8600	
8,00	3						12,8700
Sig.		1,000	1,000	1,000	,949	,326	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,322.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.