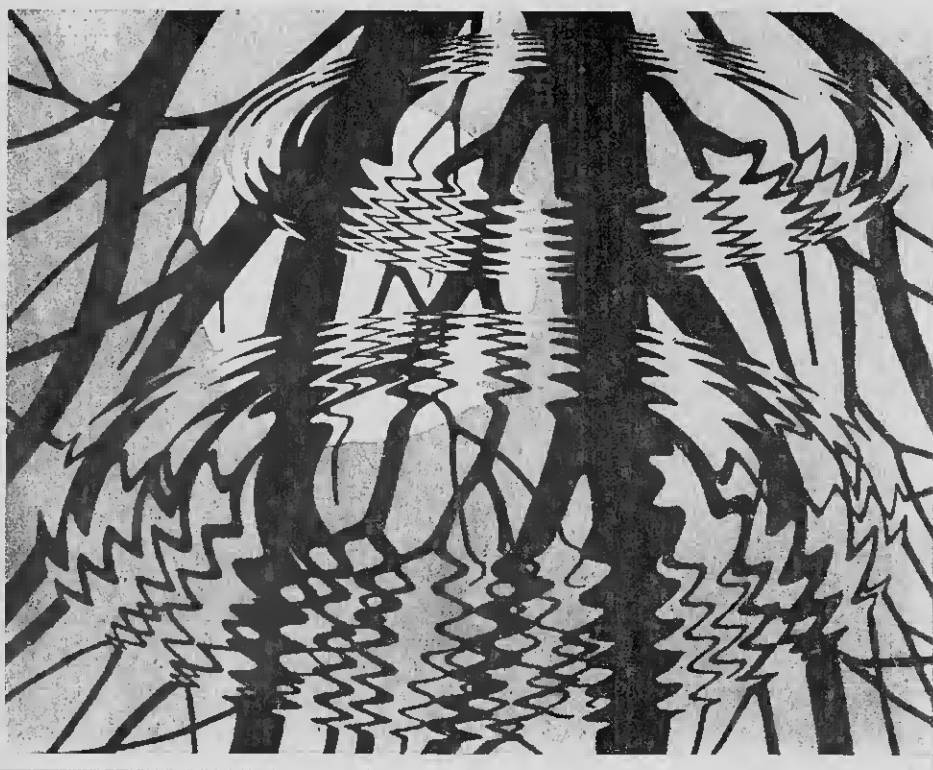


Cinética do crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* em reactores biológicos

Maria Emília Lima Costa



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias.

Faro, 1994



TESES
SD

Cinética do crescimento de células em suspensão de *Cynara ca.* Costa,



Cinética do crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* em reactores biológicos

Maria Emília Lima Costa

Dissertação apresentada na
Universidade do Algarve para efeito
da prestação de provas de
Doutoramento em Biotecnologia
Vegetal.

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias.

Faro, 1994

1054618108
631.52
COS - Cin

1

Ilustração da capa: *Águas Agitadas*, linóleogravura. Escher, (1950)

À memória de Nicolau van Uden

Pelo gosto pelas "cinéticas" que me transmitiu, desde os cursos de pós-graduação do I.G.C. em 1972.

Pelo apoio incondicional à minha estadia no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Groningen, em 74/75.

Pela aposta no desenvolvimento do projecto JNICT de cultura de células vegetais em reactores, na Universidade do Algarve.

Por tudo o que aprendi com o PROFESSOR

RESUMO

A espécie vegetal *Cynara cardunculus* L., vulgarmente conhecida por cardo das hortas ou cardo do coalho, encontra-se disseminada por toda a bacia mediterrânica, quer sob a forma espontânea quer sob a forma cultivada. Para além de diversas aplicações no campo terapêutico, das suas folhas e raízes, é reconhecida a elevada capacidade das flores para coagular o leite. Esta propriedade tem sido atribuída à presença de proteases na planta e tem possibilitado a utilização, no nosso país, das flores secas desta planta, no fabrico artesanal de queijo.

O elevado interesse nesta planta conduziu ao desenvolvimento do estudo de culturas *in vitro* que, embora evidenciando desvios a um comportamento ideal, reúnem as condições adequadas à implementação da produção em larga escala

Utilizou-se uma cultura de células em suspensão de *Cynara cardunculus*, como sistema modelo de abordagem ao estudo do "stress" hidrodinâmico e da cinética de crescimento e formação de produtos, em reactor biológico de 2 l, agitado mecânicamente. No âmbito deste estudo, pretendeu-se também verificar a adequação do projecto do reactor utilizado, a este tipo de cultura.

A transferência de massa volumétrica do oxigénio foi optimizada para diferentes valores de agitação e arejamento no reactor, constatando-se que elevados valores de $k_L a$ ($>14 \text{ h}^{-1}$) limitam o crescimento e a actividade metabólica celular. Por outro lado, verificou-se através da comparação dos tempos característicos dos processos metabólicos, que o oxigénio não é nutriente limitante, mesmo em condições de baixa agitação mecânica (30 r.p.m.).

O estudo da cinética de crescimento foi efectuado em sistemas descontínuo, semi-contínuo e contínuo. Foi avaliada a influência ponderal de macronutrientes essenciais no metabolismo da célula

vegetal (fonte de carbono, fonte de azoto e de fósforo) em sistema descontínuo. No que concerne aos ensaios, em que o teor em fosfato (P_i) do meio de cultura foi alterado, verificou-se que o aumento em P_i não induz aumento da produtividade e rendimento de biomassa ($Y_{x/p}$), nem da taxa específica de crescimento, afectando, no entanto, a produção fenólica e a actividade azocaseinólítica. Esta, apresentou valores mais elevados para maior concentração de fosfato (12,5 mM P_i) associada a um maior arejamento. A indisponibilidade de fosfato no meio de cultura, inibe o crescimento e a actividade das proteases presentes na suspensão celular.

Testaram-se várias concentrações dos compostos azotados, constituintes do meio basal B₅, tendo-se observado que a razão ponderal NO_3^-/NH_4^+ quando igual a 30, induz a melhor resposta na produção de biomassa e na taxa específica de crescimento. Paralelamente, foi observado, que o aumento da concentração em amónio no meio de cultura funcionava como inibidor do crescimento por alteração do pH ou da inactivação da glutamina sintetase, induzindo, em simultâneo, a proteólise da suspensão celular.

A influência da fonte de carbono e de energia do meio nutricional B₅ foi investigada, com a intenção, de avaliar o modo como a cinética do processo é afectada pela concentração do substrato. Verificou-se inibição do crescimento celular para elevados teores de sacarose (6-8%). As constantes cinéticas aparentes para o substrato dependem do teor inicial de sacarose utilizado.

Numa perspectiva de contribuir para uma melhor compreensão da cinética e do modelo de crescimento e, ainda, com o objectivo de obter informação acerca da aplicabilidade de teorias desenvolvidas para culturas microbianas, foram abordados alguns modelos não estruturados. O modelo de Pirt (1965) foi aplicado para concentrações de sacarose entre 1,5 e 3 % (p/v), constatando-se, que os rendimentos reais são mais elevados do que os rendimentos aparentes de biomassa. Elevados requisitos energéticos para a manutenção celular, foram associados a um menor rendimento

global em biomassa. O modelo de Beeftink *et al.* (1990) apresentou constantes cinéticas similares às calculadas de acordo com o modelo de Pirt (1965), o que permitiu propôr, que a energia de manutenção celular é fornecida pelo substrato, em situação de não esgotamento deste e pela degradação de biomassa, quando os hidratos de carbono presentes no meio extracelular ou intracelular estão indidponíveis. A cinética de utilização do substrato de Monod foi aplicável ao processo de crescimento celular para concentrações iniciais de sacarose situadas no intervalo 1-4% (p/v).

As células de *Cynara cardunculus* evidenciaram elevada capacidade de adaptação à cultura contínua em quimiostato modificado, o que foi atribuído ao elevado grau de homogeneização apresentado pela suspensão celular, reduzida agregação celular e não significativo crescimento nas paredes do biorreactor. Foram caracterizadas duas fases estacionárias de crescimento, obtendo-se rendimentos e produtividades de biomassa superiores aos determinados em sistema descontínuo, o mesmo se verificando com os valores das produtividades proteásicas. Em sistema contínuo, as maiores produtividades proteásicas foram obtidas para as maiores taxas específicas de crescimento e, portanto, associadas ao metabolismo primário.

A comparação dos resultados obtidos para reactor de monoturbina e de duas turbinas revelou a importância do "design" do biorreactor, atendendo a que o reactor munido com duas turbinas evidenciou uma maior produtividade de biomassa e maior taxa respiratória.

ABSTRACTS

The thistle *Cynara cardunculus* L. is wide spread in the mediterranean and is traditionally used in Portugal in farm house cheese-making, due to the milk clotting activity of the proteases. It has also been used, since early days, as medicine and has several curative properties.

Plant cell suspension cultures, as a potential source of valuable compounds (pharmaceuticals, favours, dyes) have been considered as an important alternative for biomass and metabolite production. This process offers the possibility to control production and can, subsequently, be scaled up as a biotechnological process.

C. cardunculus cell suspension cultures were used as a model system to study hydrodynamic stress, growth kinetics and product synthesis in a 2 l mechanically stirred bioreactor. In addition, it was intended to verify the suitability of this design reactor for culture of higher plant cells.

The growth kinetics of *C. cardunculus* were compared under different culture conditions, batch, semi-continuous and continuous systems. Cell growth was described in terms of biomass production, oxygen consumption, product formation, specific rates of nitrate, inorganic phosphorus, ammonium and carbohydrates consumption.

Oxygen transfer, expressed by the volumetric oxygen mass transfer coefficient $-k_{La}$ was determined at several agitation-aeration conditions and correlated with mixing, aeration and cell metabolism. It was observed that high k_{La} ($>14 \text{ h}^{-1}$) produces a negative effect on cell growth and metabolic activity. The comparative analysis of the mechanism involved in the process, through the characteristic times (time constant), showed that oxygen is not a limitant nutrient, even at low agitation conditions (30 r.p.m.).

To assess the influence of phosphate, nitrogen and carbon concentrations on plant cell metabolism and kinetics, several batch experiments were performed. Data obtained from phosphate assays, demonstrated that extracellular phosphate increase didn't induce any positive influence on growth, but enhanced the accumulation of phenolics. Thereafter, the proteolytic activities of cardoon cell culture increased with increasing phosphate concentration, when this culture medium condition was associated with higher fermenter aeration. Inorganic phosphorus depletion in the culture medium, revealed growth inhibition and protease inactivation.

In order to study the effect of nitrogen concentration in B₅ medium, an experiment was performed for different nitrate/ammonium uptake ratios. This demonstrated that optimal biomass production and specific growth rate was obtained with a nitrate/ammonium ratio equal to 30. Thereby, suggesting that enhanced ammonium concentration functioned as a limitant growth effector, probably due to glutamine synthetase inhibition or pH change.

With the aim to evaluate how the process kinetic is influenced by substrate concentration, the effect of carbon and energy source of B₅ was studied. High sucrose concentration (6-8%) inhibits growth. The obtained apparent yields for substrate consumption were dependent on the initial sucrose concentration.

To contribute to a best understanding of the growth kinetic model and furthermore, with the objective to obtain information about the applicability to plant cells of the developed models for microbial cell cultures, some unstructured models were applied to the results. The Pirt model fitted the *C. cardunculus* cell growth in the interval of 1,5-3% (p/v) sucrose. Moreover, it was found that, for the studied cell suspension, the true biomass yields were higher than apparent biomass yields and high energy requirement for cell coefficient were associated with a low biomass yield.

Pirt(1965) and Beeftink *et al.* (1990) presented similar kinetic parameters, which indicate that these models are equivalent in the reported conditions. Monod kinetics could be satisfactorily applied to the cell growth of *C. cardunculus* cell suspension for the initial sucrose concentration between 1-4%(p/v).

Continuous culture of *Cynara cardunculus* suspended cells could be successfully established, by using a modified chemostat to provide an homogenous effluent. The cell suspension culture presented good growth, due to high ability of adaptation to new environmental conditions. Low aggregation, high homogeneization and low cell growth on the fermenter walls, were the determinant *C. cardunculus* cell suspension properties, to bypass the bottlenecks of a plant cell continuous system. Two steady-states were described and it was shown that values of biomass productivities and biomass yields are higher than those determined for batch cultures. Similar pattern variation was observed for protease productivities in both systems. Proteases were produced in growth medium (Gamborg B₅ medium) and in continuous culture the higher protease productivities corresponded to the higher dilution rate, which led to the association of protease production to primary metabolism.

From a comparison between the performance of monoturbine and two turbines bioreactor, revealed that higher biomass productivity and higher respiratory rate were obtained for two turbines reactor, evidencing the relevance of the fermenter design.

PALAVRAS-CHAVE

Cultura de células vegetais

Reactor

Cinética de crescimento

"Stress" hidrodinâmico

Cultura contínua

Cynara cardunculus

KEYWORDS

Plant cell culture

Bioreactor

Growth kinetics

Hydrodynamic stress

Continuous culture

Cynara cardunculus

AGRADECIMENTOS

Pretendo agradecer em primeiro lugar, ao Professor Doutor Joaquim Manuel Sampaio Cabral por todo o apoio e compreensão na orientação desta tese, assim como todas sugestões e correcções ao seu desenvolvimento e, ainda, pela leitura crítica desta dissertação.

À Professora Doutora Maria Salomé Pais um particular obrigado, pelo entusiasmo contagiante com que sempre me incentivou e apoiou, pela sua disponibilidade em discutir os resultados, e, ainda, pela revisão atenta da sua redacção.

A ambos, uma palavra de agradecimento final, pelo apoio incondicional nos momentos críticos, institucionais, que este trabalho atravessou, assim como todo o empenho colocado no desenvolvimento da área de Biotecnologia da Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias desta Universidade, onde este estudo se insere, designadamente, na definição curricular do curso de Engenharia Biotecnológica.

Ao Professor Doutor Eugénio Faria, coordenador do projecto JNICT - Produção de Biomassa de Células em Suspensão de *Cynara cardunculus*-, quero agradecer o suporte logístico dado ao projecto, assim como todo o interesse e confiança demonstrados no seu desenvolvimento.

Aos Professores Hens ten Hoopen e Doutor Walter van Gulik quero testemunhar todo o meu apreço pelas facilidades, disponibilidade e amizade com que me acolheram e, muito particularmente, o cuidadoso acompanhamento da experimentação realizada no Departamento de Engenharia Bioquímica do Instituto de Biotecnologia da Universidade Técnica de Delft. Igualmente agradeço aos meus amigos Jurriaan Schaltmann e Ko Vinke todo o suporte científico e humano dispensado nos três "longos" meses de trabalho em Delft. Desejo, ainda, expressar o meu agradecimento ao

grupo científico de Delft, por toda a discussão crítica dos resultados deste trabalho.

Agradeço, igualmente, aos bolsheiros do projecto JNICT nº 87585/BIO, Benjamim Silva, Fernanda Correia e José Manuel Dantas, pela contribuição que deram a algumas partes desta tese.

Um agradecimento colectivo para todos os colegas que comigo têm partilhado estes anos na Universidade do Algarve, assim como aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica do Instituto Superior Técnico com quem partilhei as dificuldades encontradas ao longo deste estudo e a discussão dos resultados nas reuniões periódicas do grupo. Em particular, quero agradecer aos meus colegas de "carteira" do E13, Amílcar, Miguel, Nuno e Zé Graça pelo ambiente saudável e de confiança mútua que me rodeou, à colega Fátima Rosado pela sua, sempre, disponibilidade e atenção e, por fim, aos colegas do I.S.T., Lena, Marília, Luís, e Zé Santos pela forma calorosa como sempre me acolheram. À colega Manuela David agradeço o ter-me facultado a técnica de quantificação de hidratos de carbono pelo método enzimático e a sua disponibilidade para a testar com o material vegetal deste estudo. Quero ainda agradecer à Manuela David, à João Correia e à Graça Miguel a saudável e amiga "competição" destes "trabalhos", cujas dificuldades temos compartilhado.

À Professora Doutora Deborah Power tenho a agradecer a sua colaboração em algumas aulas teóricas da disciplina de Bioquímica II do ano lectivo de 92/93, tal como a realização da época de exames do 2º semestre desse mesmo ano. Igualmente agradeço, o seu apoio e incentivo na realização deste trabalho e o seu amável oferecimento para me rever a redacção do "abstracts".

Uma palavra de apreço para a Professora Doutora Helena Pereira, com quem partilhei as actividades pedagógicas da disciplina de Bioquímica dos cursos de Biologia Marinha e Pescas e de Engenharia Hortofrutícola, pelas facilidades concedidas para o desenvolvimento

do meu trabalho de investigação e pela saudável relação estabelecida durante todo aquele período.

À Professora Doutora Helena Santos do CTQB agradeço a sua disponibilidade em me facultar o acesso ao aparelho de -RMN- e em quantificar comigo o fósforo inorgânico intracelular presente no material vegetal deste trabalho.

Uma palavra muito especial para as auxiliares D. Ana e Fátinha, por toda a "Tecnologia de Fermentadores" que aprenderam, com a finalidade de me ajudarem neste longo trabalho experimental. Também, pela forma responsável e competente como sempre cuidaram do equipamento e material do laboratório E3. Um muito, muito obrigado.

Desejo ainda agradecer à Maria João, Paula e Aldina, as mais antigas funcionárias administrativas da UCTA, por me aturarem pacientemente, particularmente à Paula que fez a gestão financeira do Projecto JNICT nº 87585/BIO, a partir do seu 2º ano de existência.

À Leonor Canudo e à Sandra Barbosa agradeço a participação dada no processamento de parte do texto.

Aos funcionários dos Serviços Gráficos agradeço o profissionalismo e rapidez com que elaboraram a reprodução desta tese.

A todos os meus amigos de sempre, particularmente, Laurinda e Gavinhos, Teresa Fonseca e Cabanita, Lena Romero, Lena Miranda e Fátima Cecílio deixo aqui um especial agradecimento por todo o apoio e anseio com que esperaram o finalizar desta tese. À Lena Romero agradeço, especialmente, a discussão relativa à concepção da capa desta dissertação.

Aos meus filhos Joana, Zé Mário e Miguel e ao Zé Manuel quero exprimir toda a minha gratidão pela compreensão com que

encararam as minhas ausências e a minha indisponibilidade para com eles, particularmente no verão de 1993 e nestes últimos meses.

A meus pais desejo expressar o meu agradecimento por todo o afecto e carinho com que tentaram minimizar as minhas ausências junto dos meus filhos e toda a sua constante disponibilidade para me ajudarem.

Gostaria ainda de agradecer às seguintes instituições:

-À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica pelo financiamento do projecto nº 87585/BIO, que permitiu a realização deste trabalho.-

-À Fundação Calouste Gulbenkian por ter financiado as propinas relativas ao trabalho experimental realizado na Universidade Técnica de Delft.

-À UNESCO e à NATO por terem financiado as minhas estadias na Universidade Técnica de Delft.

GLOSSÁRIO

ABS	Absorvância
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
B ₅	Meio de Gamborg <i>et al.</i> (1968)
B _A	Meio Gamborg B5 na ausência de fosfato
BAP	Benzilaminopurina
B _B	Meio Gamborg B5 com fosfato 2,5 mM
B _C	Meio Gamborg B5 com fosfato 12,5 mM
B _D	Meio Gamborg B5 com NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ = 1/30
B _E	Meio Gamborg B5 com NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ = 1/1
B _F	Meio Gamborg B5 com NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ = 30/30
BlueG-250	Coomassie Brilliant Blue G
C _{av}	Concentração média de células no reactor (g/l)
C _c	Concentração de células no efluente (g/l)
2,4-D	Ácido 2,4-Diclofenoxiacético
D	Taxa de diluição (dia ⁻¹)
GDH	Glutamato desidrogenase
GGPDH	Glucose 6-Fosfato Desidrogenase
GOGAT	Glutamato sintetase
GS	Glutamina sintetase
HK	Hexocinase
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INV	Invertase
k _L a	Coefficiente de transferência de massa volumétrico de oxigénio (h ⁻¹)
K _m	Constante cinética de Michaelis-Menten (mM)
m _s	Coefficiente de manutenção (g/g p.s.h)
MS	Meio nutriente Murashige e Skoog (1962).
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfatada (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfatada (forma reduzida)
NR	Nitrato redutase
P.F.	Peso Fresco (g/l)
p.f.	Peso fresco (g/l)
PGI	Fosfoglucose Isomerase
P _i	Fósforo inorgânico
P.S.	Peso Seco (g/l)
p.s.	Peso seco (g/l)

p/v	Peso/volume (concentração)
q _p	Taxa específica de produção de fenóis (mg fenol/g p.s.dia)
q _s	Taxa específica de consumo de hidratos de carbono (g hidratos de carbono/g p.s.dia)
r	Coefficiente de Correlação
r.p.m.	Rotações por minuto
R.M.N.	Ressonância magnética nuclear.
S	Concentração média de hidratos de carbono em fase estacionária ("steady-state").
S ₀	Concentração inicial da sacarose no meio nutriente (g/l)
St	"Strokes" (movimento de agitação de vaivém em incubora)
t _{ci}	Tempos de circulação do gás no seio do líquido (s)
t _d	Tempo de duplicação (h)
t _m	Tempo de mistura (s)
TNH ₄ ⁺	Meio TNO ₃ ⁻ com NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ = 0/75mM
TNO ₃ ⁻	Meio nutriente Behrend e Mateles, (1975)
t ₀₁	Tempo de transferência do oxigénio calculado para as condições iniciais de operação
t' ₀₁	Tempo de transferência do oxigénio calculado para elevada densidade de biomassa (s)
t _p	Tempo de formação do produto (s)
TR	Taxa respiratória(μMO ₂ /l.min)
TRE	Taxa respiratória específica (μMO ₂ /min.g p.s.)
t _x	Tempo de crescimento (s)
U	Unidade enzimática (aumento de uma unidade de absorvância por hora de incubação).
v/v	Volume/volume (concentração)
v.v.m.	volume de arejamento, por volume de reactor e por minuto
X	Concentração média de biomassa, em fase estacionária ("steady-state").
X	Concentração de biomassa
Y _{F/S}	Produção de fenóis/unidade de hidratos de carbono consumidos
Y _{X/N}	Coefficiente de rendimento de biomassa em função do azoto consumido (g p.s./g azoto)
Y _{X/P}	Coefficiente de rendimento de biomassa em função do fosfato consumido (g p.s./g fosfato)
Y _{X/S}	Coefficiente de rendimento aparente de biomassa em função dos hidratos de carbono consumidos (g p.s./g hidratos de carbono)
Y' _{X/S}	Coefficiente de rendimento real de biomassa em função da sacarose consumida (g/g)

Y_{X/O_2}	Coeficiente de rendimento de biomassa em função do oxigénio consumido (g p.s./g.O ₂)
μ_g	Taxa específica de crescimento (dia ⁻¹)
μ_{MAX}	Taxa específica de crescimento máxima (dia ⁻¹)
θ_g	Tempo de residência das bolhas gasosas no seio líquido (s)
λ	Comprimento de onda (nm)

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	3
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. Material Químico	11
2.2. Equipamento	12
2.3. Material Vegetal	14
2.4. Condições de Manutenção e de Produção da Biomassa vegetal	
2.4.1. • Calli de <i>Cynara Cardunculus L.</i>	15
2.4.2. • Condições de Manutenção da Cultura de Células em Suspensão de <i>Cynara cardunculus L.</i>	15
2.4.3. • Condições de Produção de Biomassa de <i>Cynara cardunculus L.</i>	
2.4.3.1. <u>Sistema Descontínuo e Semi-Contínuo (Fermentador)</u>	16
2.4.3.2. <u>Sistema Descontínuo ("Erlenmeyer")</u>	18
2.4.3.3. <u>Sistema Contínuo</u>	18
2.4.4. • Parâmetros de Crescimento e de Processo	21
2.4.5. • "Design" dos Biorreactores Utilizados no Crescimento de Celular de <i>Cynara cardunculus L.</i>	
2.4.5.1. <u>Sistema Descontínuo e Semi-descontínuo</u>	21
2.4.5.2. <u>Sistema Contínuo</u>	22
2.5. Determinação dos Parâmetros de Crescimento da Cultura Celular em Suspensão de <i>C. cardunculus</i>	23
2.6. Transferência de Massa de Oxigénio	
2.6.1. • Método Dinâmico	26
2.6.2. • Método Estático	28
2.7. Determinação da Viabilidade Celular	28
2.8. Métodos Analíticos	
2.8.1. • Quantificação da sacarose, glucose e frutose no meio de cultura.	29
2.8.1.1. <u>Análise do hidrato de carbono pelo método enzimático.</u>	30
2.8.1.2. <u>Análise dos hidratos de carbono por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.</u>	33
2.8.2. • Quantificação de proteína total, solúvel no meio de cultura.	33
2.8.3. • Quantificação dos fenóis extracelulares no meio de cultura.	35

2.8.4.	• Determinação da actividade proteolítica da suspensão celular.	36
2.8.5.	• Quantificação do fósforo inorgânico total, no meio de cultura.	38
2.8.6.	• Quantificação do catião amónio no meio de cultura.	39
2.8.7.	• Quantificação do anião nitrato no meio de cultura.	41
3.	INFLUÊNCIA DO "STRESS" HIDRODINÂMICO NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>C. cardunculus</i> NUM FERMENTADOR DESCONTÍNUO, COM AGITAÇÃO E AREJAMENTO FORÇADO.	
3.1.	Metodologia e Objectivos	45
3.2.	Aspectos Gerais	48
3.3.	O "Stress" Hidrodinâmico	49
3.4.	Transferência de Massa	53
3.5.	Resultados e Discussão	
3.5.1.	• Transferência de massa e tempos constantes característicos do processo de crescimento celular de <i>Cynara cardunculus</i> .	58
3.5.2.	• Transferência de massa, "stress" hidrodinâmico e crescimento celular de <i>Cynara cardunculus</i> em suspensão.	64
3.5.3.	• "Stress hidrodinâmico" e consumo de oxigénio durante o crescimento da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i> .	74
4.	CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>Cynara cardunculus</i> EM SISTEMA DESCONTÍNUO.	
4.1.	Metodologia e Objectivos	83
4.2.	O Fósforo Inorgânico e sua Função na Célula Vegetal	85
4.3.	O Azoto e sua Função na Célula Vegetal	88
4.4.	Resultados e Discussão.	
4.4.1.	• Influência do fósforo inorgânico no crescimento de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> em "erlenmeyer".	93
4.4.2.	• Influência do fósforo inorgânico no crescimento de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> em fermentador descontínuo	98

4.4.3.	• Influência do azoto inorgânico no crescimento de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> em "erlenmeyer".	103
4.4.4.	• Influência do azoto inorgânico no crescimento de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> em fermentador descontínuo.	109
4.4.5.	• Actividade proteolítica e produção fenólica em fermentador descontínuo e em "erlenmeyer" de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i>	113
5.	CINÉTICA E ENERGÉTICA DE CRESCIMENTO DA CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>Cynara cardunculus</i>.	
5.1.	Metodologia e Objectivos	125
5.2.	A Fonte de Carbono e de Energia em Culturas de Células Vegetais. Modelos Interpretativos.	127
5.3.	Modelos Matemáticos do Crescimento Celular Vegetal.	
5.3.1.	• Modelos não estruturados de crescimento celular	133
5.3.2.	• Modelos estruturados de crescimento celular	135
5.4.	- Resultados e Discussão.	
5.4.1.	• Parâmetros cinéticos e utilização da fonte de carbono de energia no crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> em sistema descontínuo.	143
5.4.2.	• Influência da fonte de carbono na actividade proteolítica e na produção fenólica da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i> em sistema descontínuo.	157
6.	CRESCIMENTO DA CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>Cynara cardunculus</i> EM SISTEMA CONTÍNUO E SEMI-CONTÍNUO	
6.1.	Metodologia e Objectivos	165
6.2.	Cinética de crescimento em cultura contínua e semi-contínua	
6.2.1.	• Aspectos gerais	166
6.2.2.	• Desvios à idealidade do sistema contínuo	169

6.2.3. • Cultura semi-contínua	172
6.3. Resultados e Discussão.	
6.3.1. • Crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> em quimiostato modificado e em sistema semi-contínuo.	174
6.3.2. • Actividades proteolíticas e produção fenólica das células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> em sistema contínuo e semi-contínuo	183
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS PARA TRABALHO FUTURO	
7.1. Conclusões	189
7.2. Perspectivas para trabalho futuro	195
REFERÊNCIAS	201
ANEXO	221

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1.	Produtos químicos, com grau de pureza <i>pro-analysis</i> , utilizados no desenvolvimento deste estudo.	11
Tabela 2.2.	Equipamento utilizado no desenvolvimento do trabalho	12
Tabela 2.3.	Composição dos meios de cultura (Gamborg B5, 1968 e Behrend e Mateles TNO ₃ ⁻ , 1975) utilizados na manutenção de <i>calli</i> e nos ensaios realizados com a cultura de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> .	14
Tabela 2.4.	Parâmetros de crescimento e do processo de produção de biomassa de <i>Cynara cardunculus</i> .	21
Tabela 2.5.	Equipamento e reagentes utilizados na determinação da viabilidade celular.	29
Tabela 3.1.	Valores de $k_L a$ (h ⁻¹) determinados pelo método dinâmico para diferentes condições operacionais de agitação e arejamento forçado, estabelecidas em reactor de 2 l, na ausência de células.	46
Tabela 3.2.	Tempos constantes característicos do processo de crescimento de células em suspensão de <i>C. Cardunculus</i> e seus mecanismos físicos para diferentes velocidades de agitação e arejamento constante (100 cm ³ /min), em biorreactor.	62
Tabela 3.3.	Parâmetros de crescimento da cultura celular de <i>C. Cardunculus</i> em fermentador descontínuo, para diferentes $K_L a$ iniciais (determinados para o meio de cultura, na ausência de células)	65
Tabela 3.4.	Comparação dos parâmetros respiratórios (em função do oxigénio consumido) de células de <i>C. cardunculus</i> , com parâmetros publicados na literatura.	77
Tabela 4.1.	Parâmetros de crescimento de células de <i>Cynara cardunculus</i> mantidas em diferentes concentrações de fosfato em "erlenmeyer".	94
Tabela 4.2.	Parâmetros de crescimento de <i>Cynara cardunculus</i> em sistema fermentador descontínuo, para diferentes concentrações de fósforo.	99
Tabela 4.3.	Parâmetros de crescimento de <i>Cynara cardunculus</i> em "erlenmeyer", para diferentes concentrações da fonte de azoto no meio nutriente B5 (Gamborg, 1968) e meio TNO ₃ ⁻ (Behrend e Mateles, 1975).	103
Tabela 4.4.	Parâmetros de crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> em fermentador descontínuo, para diferentes concentrações da fonte de azoto no meio basal B5.	109
Tabela 4.5.	Produtividades proteásicas, actividades proteolíticas e respectivos intervalos de confiança, determinadas em cultura de células de <i>C. cardunculus</i> em "erlenmeyer" e fermentador descontínuo para diferentes concentrações de fósforo e de azoto no meio basal B5 (Gamborg, 1968).	116
Tabela 5.1.	Parâmetros cinéticos de crescimento de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> para diferentes concentrações de substrato, em fermentador descontínuo de monoturbina e de duas turbinas	144

Tabela 5.2.	Rendimentos de biomassa aparentes e reais, produtividades, taxas específicas de crescimento e coeficientes de manutenção de culturas de células em suspensão de diferentes espécies vegetais.	145
Tabela 5.3.	Estimativa dos parâmetros de rendimento real de biomassa e coeficiente da manutenção de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> 2% sacarose (modelo Beftink <i>et al.</i> 1990).	153
Tabela 5.4.	Comparação das constantes cinéticas características da utilização da fonte de carbono no crescimento celular de <i>C. cardunculus</i> com outras constantes referidas na literatura.	155
Tabela 5.5	Influência do teor em sacarose na actividade proteolítica média e na produtividade proteásica em células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> , mantidas em "erlenmeyer"	160
Tabela 6.1.	Sistemas de cultura contínuas e semi-contínuas para diferentes espécies vegetais, diferentes taxas de diluição e diferentes nutrientes limitantes.	171
Tabela 6.2.	Parâmetros cinéticos de crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> em sistema contínuo para as taxas de diluição 0.0085 h^{-1} e 0.012 h^{-1} e em sistema semi-contínuo.	175
Tabela 6.3.	Produtividades proteásicas e actividades proteolíticas específicas médias, determinadas durante os estados estacionários de crescimento de <i>Cynara cardunculus</i> em cultura contínua e semi-contínua.	185

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.2.1.	Representação esquemática do sistema do fermentador descontínuo utilizado no crescimento da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i>	17
Fig.2.2.	Representação esquemática do sistema de cultura contínua utilizado (adaptado de van Gulik <i>et al.</i> 1989).	19
Fig.2.3.	Sistema de remoção do efluente. (adaptado de van Gulik <i>et al.</i> 1989).	20
Fig.2.4.	Procedimento experimental utilizado para a quantificação da proteína total solúvel de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> .	34
Fig.2.5.	Procedimento experimental para determinação da actividade proteolítica da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i>	37
Fig.2.6.	Procedimento experimental utilizado na determinação do teor em fósforo inorgânico do meio de cultura de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> .	39
Fig.2.7.	Procedimento experimental para determinar o teor em amónio de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i>	40
Fig.2.8.	Equipamento e condições de análise para quantificar o teor em nitrato em células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> .	41
Fig.3.1.	Esquema organizativo da experimentação do capítulo	45
Fig.3.2.	Valores do coeficiente de transferência de massa volumétrico do oxigénio - k_{La} - determinados em biorreactor de 2 l para diferentes caudais de arejamento e para diferentes velocidades de agitação, na ausência de células.	59
Fig.3.3.	Influência da densidade da suspensão de <i>C. cardunculus</i> no coeficiente de transferência volumétrico do oxigénio, determinado para diferentes condições de agitação e arejamento	60
Fig.3.4.	Variação do incremento máximo dos parâmetros de crescimento ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> para diferentes coeficientes de transferência de massa volumétrica de oxigénio.	66
Fig.3.5.	Perfil da variação da razão peso fresco/peso seco de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> , para diferentes velocidades de agitação em fermentador de 2 l.	68
Fig.3.6.	Crescimento da suspensão celular de <i>C. cardunculus</i> num fermentador descontínuo iniciado para $K_{La} = 24,0 \text{ h}^{-1}$.	70
Fig.3.7.	Crescimento da suspensão celular de <i>C. cardunculus</i> num fermentador descontínuo iniciado para $k_{La} = 14,0 \text{ h}^{-1}$.	71
Fig.3.8.	Crescimento da suspensão celular de <i>C. cardunculus</i> num fermentador descontínuo iniciada para $k_{La} = 6,07 \text{ h}^{-1}$.	73
Fig.3.9.	Perfil da variação da taxa respiratória e da taxa respiratória específica ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> para diferentes coeficientes iniciais de transferência de massa volumétrico de oxigénio - k_{La} -.	75
Fig.3.10.	Influência da transferência de massa volumétrica do oxigénio no rendimento de biomassa, determinado em função do oxigénio consumido.	79
Fig.4.1.	Esquema organizativo da experimentação.	83
Fig.4.2.	Ciclo metabólico do fósforo inorgânico na célula vegetal.	86

Fig.4.3.	Representação esquemática das vias metabólicas alternativas de assimilação de azoto (adaptado de Mifflin e Lea, 1976).	92
Fig.4.4.	Variação do incremento máximo dos parâmetros de crescimento ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> para diferentes concentrações de fosfato no meio nutriente B ₅ em "erlenmeyer".	95
Fig.4.5.	Perfil do crescimento da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i> em "erlenmeyer" e consumo de fósforo inorgânico para diferentes concentrações de fosfato inicial no meio nutriente B ₅ .	97
Fig.4.6.	Variação do incremento máximo dos parâmetros de crescimento ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> para diferentes concentrações de fosfato no meio nutriente B ₅ , em fermentador descontínuo.	100
Fig.4.7.	Perfil do crescimento da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i> e consumo de fósforo inorgânico para diferentes concentrações de fosfato inicial no meio nutriente em fermentador descontínuo.	101
Fig.4.8.	Variação do incremento máximo dos parâmetros de crescimento ao longo do ciclo de crescimento da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i> , para diferentes concentrações da fonte de azoto do meio basal B ₅ , em "erlenmeyer".	104
Fig.4.9.	Perfil do crescimento da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i> e consumo de azoto, para diferentes concentrações da fonte de azoto no meio nutriente B ₅ .	107
Fig.4.10.	Perfil do crescimento da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i> e consumo de azoto para diferentes concentrações da fonte de azoto no meio nutriente	108
Fig.4.11.	Variação do incremento máximo dos parâmetros de crescimento ao longo do ciclo de crescimento da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i> , para diferentes concentrações da fonte de azoto do meio basal B ₅ , em fermentador descontínuo.	110
Fig.4.12.	Perfil do crescimento da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i> e consumo de azoto para diferentes concentrações da fonte de azoto no meio nutriente	111
Fig.4.13.	Actividade proteolítica e produção fenólica determinadas ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> em sistema "erlenmeyer".	114
Fig.4.14.	Actividade proteolítica e produção fenólica determinadas ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> em fermentador descontínuo para concentrações diferentes de fosfato em meio Gamborg,(1968) B ₅	115
Fig.4.15.	Actividade proteolítica e produção fenólica determinadas ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> , em "erlenmeyer"	117
Fig.4.16,	Actividade proteolítica determinada ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> em fermentador descontínuo.	118
Fig.5.1.	Esquema organizativo da experimentação do capítulo 5.	126
Fig.5.2.	Utilização do substrato e formação de biomassa segundo o modelo de Beeftink <i>et al.</i> (1990).	133

Fig.5.3.	Esquema representativo do comportamento do substrato celular no modelo de crescimento de Nyholm (1976).	134
Fig.5.4.	Diagrama representativo do modelo cinético estruturado de Hooker e Lee, (1992).	139
Fig.5.5.	Diagrama conceptual do modelo estruturado de van Gulik <i>et al.</i> (1993)	141
Fig.5.6.	Influência de diferentes teores iniciais de sacarose no crescimento celular da suspensão celular de <i>Cynara cardunculus</i> , em fermentador descontínuo. Consumo dos hidratos de carbono ao longo do crescimento.	149
Fig.5.7.	Representação de Lineweaver-Burk para a cinética de crescimento da suspensão celular de <i>C. cardunculus</i> .	156
Fig.5.8.	Influência do teor inicial em sacarose no meio basal B5, na actividade proteolítica e na produção fenólica em células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> , determinadas em "erlenmeyer".	158
Fig.5.9.	Influência do teor inicial de sacarose (1, 2, 3, 4, 6, 8 % p/v) presente no meio basal B5, na produção fenólica de células em suspensão de <i>C. cardunculus</i> durante o ciclo de crescimento, em biorreactor descontínuo.	161
Fig.6.1.	Esquema organizativo dos ensaios realizados em cultura contínua de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> .	165
Fig.6.2.	Parâmetros de crescimento e nutrientes consumidos decélulas em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> cultivadas em quimiostato. O estado estacionário localiza-se entre o 16º e o 25º dia.após inicio da diluição, para $D=0,0087\text{ h}^{-1}$	178
Fig.6.3.	Parâmetros de crescimento e nutrientes consumidos de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> cultivadas em quimiostato. O estado estacionário localiza-se entre o 12º e o 26º dia .após inicio da diluição, para $D= 0,012\text{ h}^{-1}$	179
Fig. 6.4.	Parâmetros de crescimento e nutrientes consumidos de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> em cultura semi-contínua.	182
Fig.6.5.	Actividades proteolíticas e produção fenólica determinada durante os estados estacionários obtidos durante a cultura contínua de células em suspensão de <i>Cynara cardunculus</i> para $D= 0,085\text{ h}^{-1}$ e $D= 0,012\text{ h}^{-1}$	184

CAPÍTULO 1

Introdução e Objectivos

Os trabalhos mais recentemente publicados em culturas de células em suspensão dizem respeito na sua maioria, à optimização da produção de metabolitos em "erlenmeyer". As expectativas criadas desde que foi comercializada no Japão a primeira substância vegetal obtida por via biotecnológica -chiconina-, produzida a partir de uma cultura de células em suspensão de *Lithospermum erythrorhizon* conduziram à implementação desta área de investigação durante a última década. Geralmente é aceite, que um dos principais problemas, reside no desconhecimento da regulação das enzimas chave das vias metabólicas de síntese dos referidos compostos. Contudo, segundo Buitelaar e Tramper (1992), é possível, pela utilização de algumas técnicas específicas aumentar a produção e excreção dos produtos do metabolismo celular. Entre essas técnicas, os autores referem a imobilização de células vegetais, o uso de sistemas de duas fases, a selecção de biorreactores apropriados à produção de metabolitos e a modelização que permite a descrição matemática do fenómeno durante o crescimento celular e a produção metabólica.

Todavia, a manipulação do genoma vegetal realizada por transferência directa do DNA para protoplastos, por bombardeamento ou microinjecção de células vegetais ou ainda por hibridação somática aparece como o grande desafio da Biotecnologia Vegetal.

A problemática não reside apenas no sucesso tecnológico do processo de produção de metabolitos realizado *in vitro*, mas, principalmente, na discussão das vantagens da produzir metabolitos por culturas celulares heterotróficas com elevado consumo energético, comparativamente com as condições *ex vitro*. O elevado consumo energético de produtos gerados artificialmente pode levar a posições irreversivelmente desestabilizadoras no equilíbrio produtivo, como refere Gomes Guerreiro (1981). A viabilidade do processo de produção dependerá, antes de mais, da positividade do balanço energético, de molde a que o sistema produtivo se caracterize por um equilíbrio dinâmico sustentado.

1. Introdução e Objectivos

Nesta perspectiva, e considerando o elevado custo dos produtos vegetais obtidos por via biotecnológica, apenas produtos que provêm de plantas em extinção (berberina e chiconina) ou cujo produto não é produzido pela planta *in vivo* (sanguinarina) apresentam viabilidade económica. Existe, actualmente interesse considerável no estabelecimento de culturas de células do teixo, devido às comprovadas propriedades anti-neoplásicas do taxol, produto extraído daquela espécie.

O futuro desenvolvimento da produção à escala industrial de produtos naturais a partir de suspensões celulares, depende grandemente de estratégias para aumentar o rendimento da biomassa, diminuir o tempo de fermentação e estabilizar a produção da linha de células seleccionada.

Por outro lado, é necessário estudar as reacções das vias biossintéticas, regulação das enzimas intervenientes, activação dos genes usando stress biótico ou elicitação, minimização das aberrações genéticas e cromossómicas, aspectos reguladores da bioquímica e morfologia da diferenciação, caracterização do genoma vegetal e tecnologia de manipulação genética (Kauppinen *et al.* 1987). A regulação e o controle das vias metabólicas de síntese, para aumentar a produtividade do sistema ou para aumentar os rendimentos, requer alteração no fluxo dos compostos nas vias metabólicas, quer primárias ou secundárias, ou seja, intervenção ao nível de pontos do controlo enzimático do metabolismo. Tal manipulação, apenas se torna possível pela utilização de técnicas da biologia molecular, nomeadamente de DNA recombinante e, actualmente, tem sido definida como -Engenharia Metabólica- (Cameron e Tong 1993, Stephanopoulos e Sinskey 1993). Cameron e Tong (1993) distinguem entre Engenharia Celular e Engenharia Metabólica e consideram este último conceito mais abrangente, pois engloba processos metabólicos *in vitro*, tais como os sistemas multienzimáticos. A Engenharia Celular restringe-se a processos, que envolvem a modificação das propriedades celulares e é

geralmente utilizada em sistemas de culturas celulares vegetais e animais.

Sublinhe-se que uma outra linha de investigação da área da Biotecnologia de Plantas, com importância relevante na Agricultura, Agro-Indústria e Indústria Farmacêutica é a utilização da célula vegetal cultivada *in vitro* como biocatalisador, permitindo a investigação da fisiologia e morfologia celular face a situações de stress biótico (nutricional) ou abiótico (ambiental, xenobióticos) e a biotransformação de produtos metabólicos naturais, com interesse medicamentoso.

É indispensável, a integração de conhecimentos de bioquímica, microbiologia, engenharia química, fermentação e processamento, de molde a permitir a aplicação dos resultados de investigação nesta área da Biotecnologia.

* * *

A maioria dos trabalhos publicados em cultura de células vegetais em suspensão foram realizados em "erlenmeyer", do que resulta uma lacuna na informação da cinética do crescimento em biorreactor e particularmente das alterações das características das suspensões celulares quando sujeitas a uma produção em larga escala, designadamente transferência de massa, oxigenação, sensibilidade das células à agitação, consumo de nutrientes, taxas respiratórias.

O objectivo deste trabalho é realizar o estudo cinético do crescimento de uma suspensão celular vegetal em sistema descontínuo, e contínuo em reactor agitado mecânicamente, descrevendo quantitativamente o comportamento da cultura celular em função das condições ambientais. Para tal, foi escolhido como sistema modelo, o crescimento da suspensão celular de *Cynara cardunculus* com quantificação da expressão da sua actividade

proteolítica (pressupondo que a produção de proteases esteja associada ao metabolismo celular primário) e da produção fenólica associada ao metabolismo secundário.

A adequação do biorreactor com agitação mecânica, à cultura de células vegetais, a identificação dos principais factores que condicionam a produtividade de biomassa, proteases e fenóis, o rendimento de biomassa e a taxa específica de crescimento são objectivos específicos deste trabalho. Como parâmetros condicionadores da actividade metabólica celular em sistema descontínuo, foram estudados o "stress" hidrodinâmico, a composição do meio nutriente (fonte de carbono, de fósforo, de azoto) e a oxigenação da suspensão celular. Numa perspectiva de modelização futura do processo, foram abordados alguns modelos matemáticos não estruturados com a finalidade de estimar parâmetros cinéticos do crescimento celular, capazes de permitir uma melhor interpretação física dos resultados experimentais e subsequentemente uma aproximação mais real ao comportamento do processo em estudo.

Esta dissertação está organizada nos diferentes capítulos:

1. Optimização do valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio no crescimento celular em biorreactor e sua influência no metabolismo celular. Avaliação da sensibilidade celular ao "stress hidrodinâmico", e da adequação do reactor descontínuo utilizado, ao crescimento de suspensões celulares vegetais.
2. Avaliação da influência da fonte de fósforo inorgânico e de azoto, no crescimento celular, taxa de proteólise e produção de fenóis, em sistema descontínuo ("erlenmeyer" e fermentador).
3. Avaliação da influência da fonte de carbono e de energia presente no meio nutriente, no crescimento e metabolismo celular vegetal, em biorreactor descontínuo. Determinação de parâmetros

cinéticos de crescimento, de acordo com modelos matemáticos não estruturados.

4. Estabelecimento da cultura celular em quimiostato, adaptado a células vegetais; caracterização das fases estacionárias fisiológicas do crescimento celular, obtidas para diferentes taxas de diluição; avaliação da complexidade e aplicabilidade deste sistema para este tipo de culturas.

5. Estabelecimento da cultura celular semi-contínua, com a finalidade de prolongar a fase exponencial do crescimento celular, através de adições programadas de nutrientes ao longo do ciclo de crescimento.

Com este trabalho pretendeu-se obter informação sobre a cinética de crescimento da suspensão celular vegetal em biorreactor. Mais do que uma abordagem dum caso particular, este estudo deve ser considerado como uma contribuição para a obtenção de dados experimentais e teóricos necessários ao desenvolvimento de um projecto de reactor adequado a um processo de produção e à modelização desse processo.

CAPÍTULO 2

Materiais e Métodos

- 2.1. Material Químico
 - 2.2. Equipamento
 - 2.3. Material Vegetal
 - 2.4. Condições de Produção e de Manutenção da Biomassa Vegetal
 - 2.4.1. • *Calli* de *Cynara Cardunculus L.*
 - 2.4.2. • Condições de Manutenção da Cultura de Células em Suspensão de *C. cardunculus*
 - 2.4.3. • Condições de Produção de Biomassa de *Cynara cardunculus L.*
 - 2.4.3.1. Sistema Descontínuo e Semi-Contínuo (Fermentador)
 - 2.4.3.2. Sistema Descontínuo ("Erlenmeyer")
 - 2.4.3.3. Sistema Contínuo.
 - 2.4.4. • Parâmetros de Crescimento e de Processo
 - 2.4.5. • "Design" dos Biorreactores Utilizados no Crescimento da Suspensão Celular de *C. cardunculus*.
 - 2.5. Determinação dos Parâmetros de Crescimento da Cultura Celular em Suspensão de *Cynara cardunculus*.
 - 2.6. Transferência de Massa de Oxigénio.
 - 2.7. Determinação da Viabilidade Celular
 - 2.8. Métodos Analíticos
 - 2.8.1. • Quantificação da sacarose, glucose e frutose no meio de cultura.
 - 2.8.2. • Quantificação de proteína total, solúvel no meio de cultura.
 - 2.8.3. • Quantificação de fenóis excretados para o meio de cultura.
 - 2.8.4. • Determinação da actividade proteolítica da suspensão celular.
 - 2.8.5. • Quantificação do fósforo inorgânico total, no meio de cultura.
 - 2.8.6. • Quantificação do catião amónio no meio de cultura.
 - 2.8.7. • Quantificação do anião nitrato no meio de cultura
-

2.1. MATERIAL QUÍMICO

O material químico utilizado nesta tese, encontra-se descrito na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Produtos químicos, com grau de pureza *pro-analysis*, utilizados no desenvolvimento deste estudo.

Produtos Químicos	Marca	Referência
Acetato de sódio	Fluka	71181
Acetonitrilo (<i>HPLC grade</i>)	Merck	9930
Ácido bórico	Fluka	15670
Ácido aspártico - L	Sigma	A- 0651
Acido clorídico 37%	Pronalab	924210
Acido de acético glacial 100%	Pronalab	86927
Ácido 2,4 diclorofenoxiacético(2,4D)	Sigma	D-8407
Acido dinitrosalicílico	Merck	800141
Acido nicotínico (nicotinamida)	Fluka	72310
Acido Tricloroacético	Fluka	91230
Adenosinatrifosfato (ATP)	Boehringer	127523
Alcool absoluto	Pronalab	57629
Azocaseína	Sigma	A- 2765
Azoto gasoso	Ar líquido	
Azoto líquido	Ar líquido	
Bacto-Agar	Difco	0140-09
Benzilaminopurina	Fluka	13151
Cloreto de cálcio dihidratado	Riedel-De-Haën	31307
Cloreto de cobalto hexahidratado	Fluka	60820
Cloreto de Magnésio	Merck	58833.0250
Cloreto de Potássio	Riedel-De-Haën	31248
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma	B- 0770
Diacetato de Fluoresceína	Sigma	F-1397
Fenol	Merck	206.0250
Fosfogluose Isomerase	Boehringer	128139
Fosfato de Potássio dihidrogenado	Fluka	60230
Fosfato de Sódio dihidrogenado	Fluka	71500
Glucose - 6-Fosfato desidrogenase	Boehringer	127679
Hexoquinase	Boehringer	127809
Hidróxido de sódio p.a.	Merck	6498
Imidazol	Merck	4716.0050
Invertase	Fluka	57629
Metanol (<i>HPLC grade</i>)	Genzyme	51-11282

(continua)

2. Materiais e Métodos

Tabela 2.1. Produtos químicos, de grau de pureza *pro-analysis*, utilizados no desenvolvimento do trabalho (continuação).

Produtos Químicos	Marca	Referência
Mio-Inositol	Merck	4728
NADP	Boheringer	128040
Nitrato de Potássio	Fluka	60415
Nitroprussiato de Sódio	Fluka	71780
Piridoxina - HCL (Vitamina B ₆)	Fluka	95180
Sacarose	Fluka	84100
Sacarose	Merck	7651
Sulfato de amônio	Fluka	0998
Sulfato de ferro heptahidratado	Riedel - De - Haën	31236
Sulfato de magnésio heptahidratado	Fluka	6314
Sulfato de manganês monohidratado	Fluka	635
Tiamina-HCl (vitamina B ₁)	Fluka	95160

2.2. EQUIPAMENTO

O equipamento utilizado durante esta tese encontra-se descrito na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Equipamento utilizado no desenvolvimento do trabalho.

Equipamento	Marca	Modelo
Agitador orbital termostaticado	Cassel	NEI-O; NEII -O
Autoclave	AJC, Lda	—
Balança de precisão (0.9mg)	Sartorius	analítica
Banho termostaticado	Grant	SS 40-2
Bidestilador	Astell Scientific	—
Bomba de arejamento para aquário	Tagus	2000
Bomba peristáltica de velocidade variável	Sétric Génie Industriel	PAP

(continua)

Tabela 2.2. Equipamento utilizado no desenvolvimento do trabalho (continuação).

Equipamento	Marca	Modelo
Bomba peristáltica de velocidade variável	Inceltech	—
Câmara de cultura equipada com lâmpadas de luz branca (Osram L 36w/77)	Aralab	Fitoclima E
Câmara de fluxo Laminar Horizontal	Interlaminar	HF
Centrífuga de bancada refrigerada com rotor para tubos Eppendorf	Heracus Sepatech	Biofuge A
Centrífuga refrigerada	Kubota	KR - 600 P
Cromatógrafo de gás líquido de alta eficiência (HPLC)	Jasco	880-PU
Bomba para HPLC	Jasco	880-PU,
Bomba de mistura	Jasco	880-31
Compressor de ar	Vacufix	—
Circulador de água termostatizada	Tchene	C-85D
Detector de radiação UV-Vísivel	Jasco	875 -UV
Eléctrodo de oxigénio esterilizável	Ingold	—
Eléctrodo de pH esterilizável	Ingold	—
Espectrofotómetro	Shimadzu	UV 3000
Espectrofotómetro	Shimadzu	UV 160 A
Estufa de secagem	Cassel	—
Fermentador 2l	Sétric Génie Industriel	Série 2 CV
Fermentador 2l	LH fermentation	Série 210
Frigorífico	Bauknecht	—
Máquina de gelo	Scotsman	AF-10
Medidor de pH	Consort	P 307
Placa de aquecimento com agitador magnético	Labinco	L 32
Sistema de Filtração de água	Millipore	Sistema Milli Q
Sonicador	Vibracel	600 watt
Vortex	Labinco	L 46

2.3. MATERIAL VEGETAL

Os *calli* e suspensões celulares de *Cynara cardunculus* utilizados neste trabalho, foram cultivados em meio Gamborg B5 (1968), suplementado com 1 mg/ml de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) e com 0,1 mg/ml de benzilaminopurina (BAP) e em meio TNO₃⁻ (Behrend e Mateles, 1975), suplementado com 0,1 mg/ml de cinetina e com 1 mg/ml de 2,4 D (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Composição dos meios de cultura (Gamborg B5, 1968 e Behrend e Mateles TNO₃⁻, 1975) utilizados na manutenção de *calli* e nos ensaios realizados com a cultura de células em suspensão de *C. cardunculus*.

NUTRIENTES (mg/l)	B5	TNO ₃ ⁻
Macro-nutrientes		
KNO ₃	3000	—
Ca Cl ₂ . 2 H ₂ O	300,0	200
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	500,0	760
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150,0	300
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,0	—
KCl	—	400
Na ₂ SO ₄	—	200
Micro-nutrientes		
Mn SO ₄ . HO ₂	10,00	0,80
H ₃ BO ₃	3,000	0,20
Zn SO ₄ . 7 HO ₂	2,000	0,50
Na MoO ₄ . 2 HO ₂	0,250	0,01
Cu SO ₄ . 5 HO ₂	0,025	0,02
KI	0,750	0,50
Co Cl ₂ . 6 HO ₂	0,025	0,01
Composto Férrico		
Fe SO ₄ . 7 H O ₂	15,00	—
Constituintes Orgânicos		
Mio-Inositol	100,0	100
Tiamina HCl	10,00	0,50
Ácido Nicotínico	1,000	1,00
Piridoxina HCl	1,000	0,50
Sacarose	20000*	20000
	8000**	
Agar	8000***	8000***
pH	5,5	5,3

* Concentração de sacarose utilizada em sistema descontínuo e semi-contínuo.

** Concentração de sacarose utilizada em sistema contínuo;*** O agar é apenas adicionada na preparação de meios sólidos.

Esta cultura foi iniciada em 1988, a partir de *calli* mantidos em meio TNO_3^{-2} (Tulecke, 1966).

A cultura de células em suspensão mantida em balões "erlenmeyer" de 500 ml foi utilizada como inóculo de ensaios, em sistema descontínuo, realizados em fermentador de 2l (descontínuo-fermentador), em balões "erlenmeyer" de 500 ml (descontínuo-"erlenmeyer") e de ensaios de cultura contínua e semi-descontínua.

2.4. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA VEGETAL.

2.4.1. *Calli* de *Cynara Cardunculus* L.

Os *calli* foram mantidos em meio Gamborg B5 (Gamborg *et al.* 1968) com 2% (p/v) de sacarose, em fotoperíodo (16 h luz) a 25 °C. Foram subcultivados periodicamente de 3 em 3 semanas, em condições de assépsia. O meio de cultura foi gelificado com agar 0,8% (p/v).

2.4.2. Condições de Manutenção da Cultura de Células em Suspensão de *Cynara cardunculus* L.

A cultura de células em suspensão foi iniciada pela adição de 2 g (peso fresco) de *calli* friável, a 100 ml de meio nutriente Gamborg B5 (Gamborg *et al.* 1968). As culturas foram mantidas em "erlenmeyer" de 500 ml em agitadora orbital refrigerada à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, agitação de 120 r.p.m. e luz difusa (Tabela 2.4.). A subcultura foi realizada semanalmente em condições

assépticas. Decantou-se uma quantidade equivalente de biomassa celular para 2 balões contendo meio fresco, na proporção de 1:1.

A cultura de células em suspensão de cardo foi utilizada como inóculo para ensaios em fermentador e em "erlenmeyer", após várias subculturas semanais (5-6 gerações, no mínimo), de molde a atingir estabilidade metabólica.

2.4.3. Condições de Produção de Biomassa de *Cynara cardunculus* L.

2.4.3.1. Sistema descontínuo e semi-contínuo (fermentador)

A produção de biomassa vegetal em fermentador descontínuo foi iniciada pela adição de um inóculo de cerca de 300 ml de suspensão celular com sete dias de subcultura, a 900 ml de meio nutriente B₅ autoclavado no fermentador.

O sistema utilizado, de cultura descontínua, está representado na Fig. 2.1. O arejamento do fermentador é feito através de um tubo metálico em forma de L e o ar é esterilizado pela passagem através de uma membrana Millipore hidrofóbica, com a porosidade de 0,2 μ m. O caudal de ar injectado no fermentador, é controlado por um fluxímetro, de forma a que, a concentração de oxigénio dissolvido na cultura não atinja valores inferiores a 30 % (v/v), durante o ciclo de crescimento celular. Os gases efluentes passam por um condensador, com a finalidade de diminuir as perdas de meio líquido e posteriormente são filtrados por uma membrana Millipore 0,2 μ m.

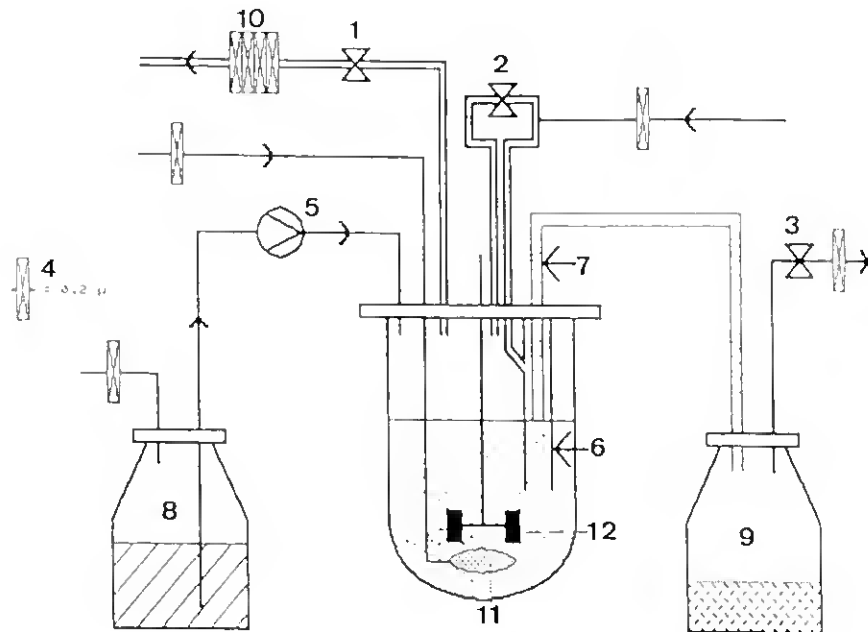


Fig. 2.2. Representação esquemática do sistema de cultura contínua utilizado (adaptado de van Gulik *et al.* 1989). 1, 2, 3- válvulas; 4- filtro; 5- bomba peristáltica; 6- tubo de vidro; 7- saída do efluente; 8- vaso contendo meio nutricional; 9- vaso receptor do efluente; 10- filtro de algodão; 11- dispersor de ar; 12- turbina com duas pás.

O arejamento do reactor foi feito por um fluxo de ar contínuo esterilizado por um filtro de algodão e por uma membrana Millipore hidrofóbica $0,2 \mu\text{m}$ e mantido constante por um sistema controlador de caudal gasoso. Os gases de saída do fermentador foram igualmente esterilizados, por um sistema idêntico de filtração e atravessam um condensador arrefecido a 40°C , para minimizar as perdas de meio líquido por evaporação. Apesar da presença do condensador, foi possível verificar perdas de água que foram quantificadas, usando uma coluna de sílica. A diferença em peso desta coluna, antes e depois de ser integrada no circuito dos gases efluentes do reactor, permitiu calcular a perda de água total durante a fermentação. O valor da taxa de diluição foi corrigida para as perdas por evaporação.

A diluição foi iniciada 3-4 dias após o início da cultura em sistema descontínuo. O efluente foi retirado periodicamente, usando um sistema desenvolvido por van Gulik *et al.* (1989), que se baseia no

estabelecimento de uma diferença de pressão no seio do biorreactor, de acordo com o esquema representado na Fig. 2.3. O efluente é expelido pelo tubo metálico 7 que aflora a superfície do líquido e que se encontra instalado dentro do tubo de vidro 8. Este tubo de vidro, durante a fermentação, é continuamente esvaziado por um fluxo de ar esterilizado. Quando a saída de ar do fermentador é fechada (válvula 1), a pressão no interior do tubo de vidro (P_2) é equilibrada pela pressão dentro do reactor (P_1). Abrindo as válvulas 2 e 3, observa-se uma rápida subida da suspensão celular no interior do tubo de vidro, até que a superfície do líquido desça ao nível da extremidade inferior do tubo de metal A. A altura do tubo de metal é determinante, para definir o mínimo de cultura celular expelida. Esta operação de remoção, descontínua, da suspensão celular dura cerca de 5s e a sua periodicidade depende da taxa de diluição utilizada. A variação do volume da cultura não deverá exceder +/-1%. O sistema de remoção do efluente foi despoletado por um compressor duplo pneumático e as válvulas eléctricas foram controladas por relógio programável.

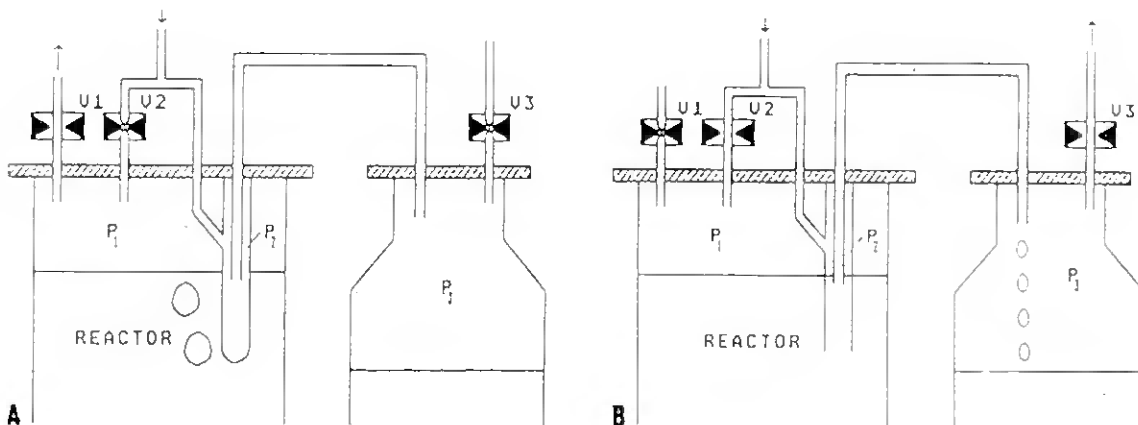


Fig.2.3. Sistema de remoção do efluente. A- As válvulas V_2 e V_3 estão abertas e a válvula V_1 encontra-se fechada. O tubo de remoção do efluente é mantido sem suspensão celular, por acção de um pequeno fluxo de ar. ($P_2 = P_3$ e $P_2 > P_1$) B- A válvula V_1 está fechada e as válvulas V_2 e V_3 estão abertas. O efluente sobe no tubo de saída ($P_1 = P_2$ e $P_1 > P_3$) P_1 - pressão no interior do reactor, P_2 - pressão no interior do tubo de remoção do efluente, P_3 - pressão no interior do frasco do efluente. V_1, V_2, V_3 - válvulas. (adaptado de van Gulik *et al.* 1989).

2. Materiais e Métodos

- * Previamente à inoculação, foi colhida uma amostra de meio B₅ esterilizado, que serviu como controlo inicial dos constituintes do meio nutriente B₅.
- * Concomitantemente com a inoculação do reactor, procedeu-se à transferência de 50 ml da cultura celular utilizada como inóculo, para um balão erlenmeyer de 500 ml, contendo 150 ml de meio B₅, para controlo do crescimento.

2.4.3.2. Sistema Descontínuo ("Erlenmeyer")

Nos ensaios efectuados em "erlenmeyer", a inoculação foi efectuada por decantação de 50 ml de suspensão celular estabilizada, (após sete dias de subcultura), para um "erlenmeyer" de 500 ml, contendo 150 ml de meio nutriente B₅. A cultura celular foi estabelecida de acordo com as condições descritas na Tabela 2.4. Os parâmetros de crescimento e os produtos metabólicos formados foram quantificados, tal como referido anteriormente para os ensaios em fermentador descontínuo.

2.4.3.3. Sistema Contínuo.

A cultura contínua de células em suspensão de *Cynara cardunculus* foi estabelecida em meio B₅, contendo um teor em sacarose de 0,8 % (p/v) de sacarose e nas condições referidas na Tabela 2.4. O meio de cultura foi esterilizado por sistema de microfiltração Millipore e a inoculação foi efectuada por transferência simultânea para o biorreactor, de 500 ml de cultura celular (após sete dias de subcultura) e 1500 ml de meio fresco B₅. O biorreactor foi equipado com eléctrodos de pH e de pO₂ esterilizáveis.

Como sistema de cultura em contínuo da suspensão de células de *C. cardunculus*, utilizou-se um quimiostato adaptado a células vegetais por Van Gulik (1989), esquematizado na Fig.2.2.

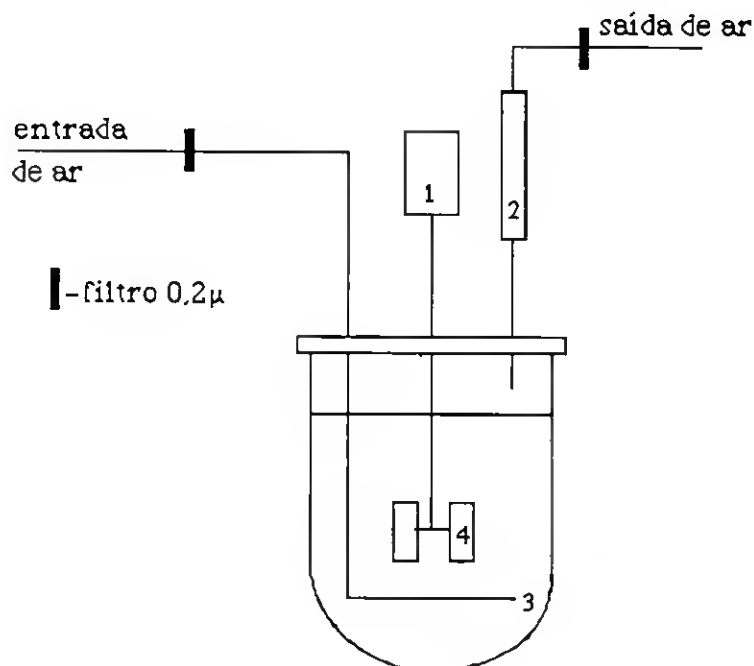


Fig.2.1. Representação esquemática do sistema do fermentador descontínuo utilizado no crescimento da suspensão celular de *Cynara cardunculus*. 1. rotor; 2. condensador; 3. dispersor do ar; 4. turbina com duas pás.

A inoculação foi efectuada numa câmara de fluxo laminar, nas condições referidas em 2.4.2. Após estabilização das condições de temperatura, agitação e arejamento requeridas para o desenvolvimento do processo de crescimento celular (Tabela 2.4.), procedeu-se à recolha da amostra, que se considerou corresponder ao tempo zero de crescimento ($t=0$). As restantes amostras foram retiradas periodicamente de dois em dois dias, de forma a permitir a obtenção do perfil do crescimento celular, (peso fresco, peso seco, nº de células/ml, taxa específica de crescimento, produtividade de biomassa e rendimentos) e a caracterização do comportamento da produção de produtos (proteases e fenóis) em função do consumo de nutrientes (fonte de carbono, fonte de azoto, fonte de fósforo).

2.4.4. Parâmetros de Crescimento e de Processo.

A Tabela 2.4. contém os parâmetros de crescimento e de processo nos diferentes sistema reaccionais.

Tabela 2.4. Parâmetros de crescimento e do processo de produção de biomassa de *Cynara cardunculus*.

Parâmetros	"Erlenmeyer"	Fermentador Descontínuo e Semi-contínuo	Fermentador Contínuo
Meio Nutriente	B ₅	B ₅	B ₅
Volume Total(ml)	500	2000	2500
Volume Útil(ml)	200	130	2000
Temperatura (°C)	25° ± 1°	25° ± 1°	25° ± 1°
pH inicial	5,5	5,5	5,5
Volume do inóculo de manutenção (%v/v)	50	—	—
Volume do inóculo dos ensaios de produção(%v/v)	25	15	15
Agitação (r.p.m.)	120	30; 60; 100	100
Arejamento (v.v.m.)	—	0,1; 0,2; 0,4	0,1
Sacarose (% p/v)	2	2	0,8

2.4.5. "Design" dos Biorreactores Utilizados no Crescimento da Suspensão Celular de *C. cardunculus*.

2.4.5.1. Sistema Descontínuo e Semi-descontínuo

Utilizaram-se 2 biorreactores de 2 l, respectivamente da marca Sétric Génie Industriel -série 2 CV e LH Fermentation -série 210, ambos munidos de agitação mecânica, sendo os vasos reaccionais e

2. Materiais e Métodos

respectivas turbinas idênticos. Foram equipados com eléctrodos de pH e de oxigénio esterilizáveis.

Características do vaso

Altura total	20,0 cm
Altura do líquido	13,0 cm
Diâmetro	12,0 cm

Características da turbina

Nº de pás	2
Inclinação das pás	45 ⁰
Largura das pás	1,9 cm
Comprimento das pás	7,0 cm
Diâmetro da turbina	6,0 cm

2.4.5.2. Sistema contínuo.

Utilizou-se um fermentador de 3 l, agitado mecânicamente (Applikon, Schiedam, The Netherlands), munido de 2 turbinas e modificado para cultura contínua de células vegetais por Van Gulik, (1990), de acordo com a Fig. 2.2. Este reactor foi igualmente testado em alguns ensaios em descontínuo.

Características do vaso

Altura total	25,0 cm
Altura do líquido	22,0 cm
Diâmetro	13,0 cm

Características da turbina

Nº de pás	2
Inclinação das pás	90 ⁰
Largura das pás	1,2 cm
Comprimento das pás	4,0 cm
Diâmetro da turbina	4,0 cm

2.5. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DA CULTURA CELULAR EM SUSPENSÃO DE *C. CARDUNCULUS*.

A avaliação do crescimento das culturas celulares em suspensão foi efectuada, tendo em conta os seguintes parâmetros:

- Peso Fresco
- Peso Seco
- N^o de células/ml
- Taxa respiratória
- Taxa específica de crescimento
- Rendimento de biomassa
- Produtividade de biomassa

O **peso fresco**, em gramas, foi obtido após centrifugação de 10 ml da suspensão celular a 4500 r.p.m. durante 10 minutos e remoção do sobrenadante e o **peso seco**, em gramas, foi determinado após a secagem das células sedimentadas, durante 48 h à temperatura de 80° C.

O **n^o de células** foi determinado pela contagem de células em amostra diluída, num hemacitómetro Moller D.M.Wedd. Foram lidas várias amostras e calculada uma média aritmética para cada diluição utilizada. As medições da absorvância foram realizadas após rápida homogeneização da suspensão. Realizaram-se 5-6 leituras para cada determinação da absorvância e foi calculada a respectiva média aritmética. A absorvância foi medida no comprimento de onda 578 nm e correlacionada por regressão linear simples com o n^o de células/ml em suspensão, o que permitiu obter a seguinte equação linear de uma recta:

$$\text{Abs } 578 = 7,36 \cdot 10^{-6} \text{ n}^{\circ} \text{ células/ml} + 0,052 \quad (r=0,996)$$

Tanaka *et al.* (1992) referem a absorvância como parâmetro de crescimento, tendo implementado um sistema de agitação magnética no interior da cuvete do espectrofotómetro, afim de otimizar a homogeneização da suspensão celular, enquanto decorre a leitura da densidade óptica.

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 do fermentador. Foi determinada pela variação rectilínea de oxigénio dissolvido na suspensão ao longo do tempo, após interrupção do arejamento durante 15-20 minutos. O declive da recta, que exprime a variação temporal da concentração percentual em oxigénio dissolvido na suspensão celular, indica o valor da taxa respiratória, e expressa-se em $\mu\text{MO}_2/\text{l.min}$. A taxa respiratória específica (TRE) indica o número de moles de oxigénio consumido por unidade de biomassa produzida e por unidade de tempo ($\mu\text{M O}_2/\text{g P.S. min}$). Os valores de oxigénio dissolvido foram quantificados por um eléctrodo de oxigénio Ingold, esterilizável, imerso no reactor.

A **taxa específica de crescimento** $-\mu_g-$ foi determinada no início da fase exponencial de crescimento, pela aplicação da expressão matemática 2.1:

$$\ln x - \ln x_0 = \mu_g t \quad (2.1.)$$

x_0 - concentração de biomassa inicial
no intervalo de tempo considerado.
 x - concentração de biomassa no tempo t .

em que é postulado, que a taxa específica de crescimento é uma constante, independente do tempo (2.2.), durante a fase exponencial de crescimento, tal como nos sistemas microbianos (Van Uden,1971) Esta constante, atinge um valor máximo $-\mu_{\text{MAX}}-$, desde que todos os nutrientes se encontrem em excesso, na presença de uma única fonte de carbono e de energia e, para as condições pré-estabelecidas de crescimento.

A equação matemática 2.1. é a solução logaritmizada da equação 2.2.

$$\frac{dx}{dt} = \mu_g x \quad (2.2.)$$

em que:

x- densidade populacional (biomassa/unidade de volume)
dx/dt- taxa instatânea de crescimento (unidade de biomassa /unidade de tempo)

μ_g - taxa específica de crescimento (unidade do inverso do tempo).

O tempo de duplicação da biomassa - t_d -, constitui outra forma numérica de exprimir a taxa específica de crescimento celular e relaciona-se matematicamente com aquele parâmetro, através da expressão 2.3. Foi deduzida a partir da equação 2.1., considerando $x = x_0$ e $t = t_d$.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_g} \quad (2.3.)$$

Outro parâmetro de quantificação indirecta da produção de biomassa é o **coeficiente aparente de rendimento de biomassa** - $Y_{x/i}$ -, que exprime a quantidade de biomassa produzida (x), por unidade de massa de nutriente consumido do meio extracelular (i) e é uma medida da eficiência da conversão do nutriente (i) em biomassa, que se traduz pela equação 2.4. É normalmente expresso em g peso seco/g nutriente consumido (g/g).

$$Y_{x/i} = \frac{X}{(C_{i,0} - C_i)} \quad (2.4.)$$

X- concentração de biomassa
C_{i,0}- concentração inicial do nutriente no meio de cultura
C_i- concentração do nutriente no ponto do ciclo de crescimento de maior concentração de biomassa em sistema descontínuo, ou concentração do nutriente existente na fase estacionária em sistema descontínuo.

No que concerne ao coeficiente de rendimento aparente de biomassa em função do substrato carbonado consumido, é comum representar a produção de biomassa (dx/dt) em função da taxa de consumo da fonte de carbono e de energia (dS/dt) pela equação 2.5.

$$\frac{dx}{dt} = -Y_{x/S} \frac{dS}{dt} \quad (2.5.)$$

$Y_{x/S}$ - Coeficiente de rendimento de biomassa em função do substrato consumido (g/g).

Esta expressão pode tomar a forma $\mu_g = Y_{x/S} q_s$, que relaciona a taxa específica de crescimento com a taxa específica de consumo de substrato (q_s) (Van Uden 1971; Pirt 1975) É igualmente aplicável à produção de metabolitos durante o crescimento.

A **produtividade de biomassa** traduz a quantidade de biomassa produzida por unidade de tempo e por unidade de volume útil do biorreactor. Foi determinada por regressão linear simples do incremento em peso seco/unidade de volume, obtido ao longo do ciclo de crescimento celular. Expressiu-se em g peso seco/l. h.

2.6. TRANSFERÊNCIA DE MASSA DE OXIGÉNIO

2.6.1. Método Dinâmico

O coeficiente de transferência de massa volumétrico do oxigénio, $-k_L a$, mede a resistência que a fase líquida contida no biorreactor oferece à dispersão das bolhas de ar e transferência do oxigénio para as células. Em sistema descontínuo, utilizou-se o **método dinâmico** ("gassing out") desenvolvido por Pirt (1975) para microrganismos e adaptado a cultura de células vegetais por Leckie e Scragg (1991). O método consiste essencialmente em 2 fases: uma primeira, de desoxigenação total do meio de cultura contido no

reactor através de um fluxo de azoto, seguindo-se uma 2ª fase, de arejamento contínuo do meio nutriente, em que foi registado, periodicamente ($\Delta t=2$ min), o incremento na concentração em oxigénio dissolvido no seio do líquido de cultura. Tal, permitiu estimar o coeficiente inicial de transferência volumétrico do oxigénio, por aplicação da equação matemática 2.5:

$$\frac{d C_L}{d t} = k_L a (C_E - C_L) \quad (2.5.)$$

em que:

- C_L - concentração de oxigénio dissolvido no meio celular (percentagem volumétrica)
- t - tempo expresso em horas
- C_E - concentração de oxigénio saturante, a temperatura e pressão constantes .

Em condições de oxigenação saturante (100%), a equação 2.5. adquiriu a seguinte forma:

$$\ln(100 - C_L) = - k_L a t \quad (2.6)$$

Pelo traçado do gráfico $\ln(100 - C_L)$ em função da variável tempo, obtém-se o declive da recta, que traduz o valor do coeficiente de transferência de massa volumétrico do oxigénio $-k_L a$ -, expresso em h^{-1} .

A limitação deste método reside na sua inaplicabilidade a sistemas biológicos *in vivo*, visto a fase de desoxigenação ser letal para os referidos sistemas. Todavia, constitui um método adequado para a determinação das condições iniciais de transferência de oxigénio em meio de cultura reaccional, previamente à inoculação. Este método é igualmente utilizado, quando se pretende estimar o $k_L a$ na fase final de processamento de uma fermentação.

2.6.2. Método Estático

Ao invés do método dinâmico, este método permite estimar o coeficiente de transferência de massa volumétrico $-k_{La}$ -, durante o crescimento celular em reactor sem interrupção do arejamento, mantendo inalteráveis as condições de crescimento. As limitações deste método são, antes, de carácter tecnológico, devido à necessidade de medição e registo contínuo do decréscimo de oxigénio, ou aumento do dióxido de carbono nos gases efluentes. A equação matemática 2.7. e sua integração permite calcular k_{La} (Atkinson e Mavituna, 1985).

$$\frac{dC}{dt} = k_{La} (C^* - C) \quad (2.7.)$$

em que:

- C*- concentração de oxigénio saturante
- C - concentração de oxigénio determinada pela diferença entre o teor em oxigénio constituinte do ar e o teor em oxigénio à saída do reactor.

Integrando, obtém-se a seguinte equação:

$$\ln \frac{C^* - C}{C^*} = -k_{La} \cdot t \quad (2.8)$$

O valor do coeficiente k_{La} é expresso pelo declive da recta representada pela equação 2.8.

2.7. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Utilizou-se o método de Larkin (1976) para estimar a viabilidade celular, utilizando o diacetato de fluoresceína. Este composto é hidrolisado pela enzima proteolítica esterase, presente nas células, ao nível da ligação química acetato-fluoresceína, libertando a

molécula de fluoresceína. Esta molécula apresenta uma cor verde brilhante fluorescente, que permite identificar as células, em que a enzima esterase se encontra activa.

Tabela 2.5. Equipamento e reagentes utilizados na determinação da viabilidade celular.

Equipamento	Reagente
- Microscópio de Fluorescência Leitz wetzlar	Diacetato de Fluoresceína dissolvido em acetona 0,5% (p/v)
- Filtro BG - 12	

Procedimento:

Colocou-se numa lâmina de microscópio uma gota da suspensão celular e adicionou-se uma gota da solução de diacetato da fluoresceína, 0,5% (p/v). Esta preparação foi observada ao microscópio, após 5 minutos de exposição à radiação ultra-violeta., realizando-se 5-6 leituras para cada amostra, afim de determinar a média da amostragem. A viabilidade é expressa em percentagem (razão entre o nº de células viáveis e o nº total de células presentes em cada retículo).

2.8. MÉTODOS ANALITICOS

2.8.1. Quantificação da Sacarose, Glucose e Frutose no Meio de Cultura.

A colheita de amostras da cultura celular em suspensão foi realizada periodicamente (em dias alternados) durante cada um dos ensaios de crescimento. Após centrifugação da suspensão celular durante 10 min. a 4500 r.p.m., o sobrenadante foi separado por

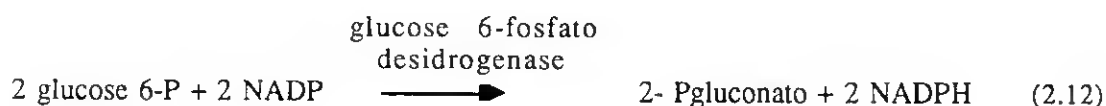
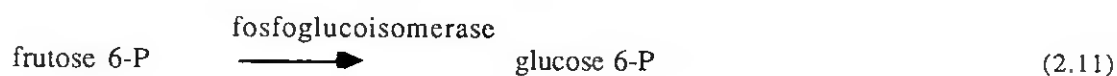
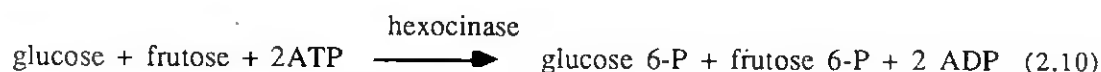
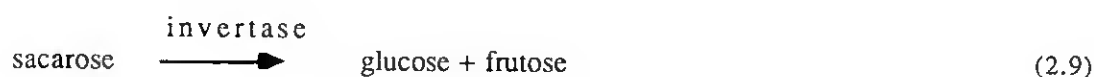
2. Materiais e Métodos

decantação e analisado por um método enzimático ou por um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

2.8.1.1. Análise de hidratos de carbono pelo método enzimático.

O método foi desenvolvido por Jones *et al.* (1977) com o objectivo de quantificar a sacarose existente em micro-quantidades (10^{-7} - 10^{-14} mM) em tecidos de plantas *in vivo*. No entanto, este método pode ser utilizado igualmente, na análise quantitativa de açúcares redutores, tais como a glucose e a frutose.

Baseia-se fundamentalmente, na hidrólise da sacarose pela enzima invertase (2.9.) e a subsequente redução da molécula de nicotinamida adenina dinucleótido fosfatada (NADP⁺) através de um conjunto de reacções acopladas (2.10,2.11,2.12) e catalisadas pelas seguintes enzimas: hexocinase (HK), glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), fósforo-glucosomerase (PGI). A libertação de nicotinamida adenina dinucleótido fosfatada na forma reduzida (NADPH), com a quantificação da sua absorção máxima no comprimento de onda 334 nm, permite determinar as concentrações de cada um dos açúcares presentes na amostra analisada, sabendo que, o valor do coeficiente de extinção molar da molécula de NADP tem um valor de 6,2 ml/ μ mole.



O cálculo do teor de cada um dos hidratos de carbono presentes na amostra a analisar foi efectuado com base na aplicação da expressão matemática (2.13), após medição da largura do papel do registador (Δh_T) e da altura máxima atingida pelo patamar da curva que traduz a libertação de NADPH para o meio reaccional.

$$\text{Teor em hidrato de carbono} = \frac{\Delta h \cdot V_T}{\Delta h_T \cdot \epsilon_{\text{NADP}} \cdot F_{\text{dil}}} \quad (2.13)$$

em que:

Δh - altura no papel correspondente ao valor máximo atingido pelo patamar da curva de libertação do NADPH.

h_T - largura total do papel do registador.

ϵ - coeficiente de extinção molar do NADP (6,2 ml/ μ mole)

V_T - volume total de líquido na cuvete.

F Diluição - factor de diluição da amostra adicionada.

REAGENTES:

* Tampão Imidazol 0.1 M a pH = 6.9 .

O acerto do valor do pH é feito por adição de ácido clorídrico.

* Preparação da solução da enzima **Glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)** e da enzima **hexocinase(HK)**: centrifugou-se 50 μ l de suspensão enzimática comercial de G6PDH em tubo Eppendorf, durante 2 min a 13000 r.p.m. Após remoção do sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento obtido em 50 μ l tampão imidazol 0,1M (1:1) e agitou-se em "vortex". Repetiu-se este procedimento na preparação da solução de hexocinase.

* A solução da enzima **Fosfosglucoisomerase (PGI)** preparou-se por centrifugação de 50 μ l da suspensão enzimática comercial seguida de separação do sobrenadante e ressuspensão em tampão imidazol 0,1M na proporção 1:3. A centrifugação da solução durou 2 min e foi realizada à velocidade de 13000 r.p.m.

* A enzima **invertase** preparou-se, pesando 2 mg e dissolvendo em 50 μ l de tampão imidazol 0,1 M.

* A solução de **NADP** em tampão imidazol, preparou-se com uma concentração de 1,2 % (p/v) e a solução de **ATP** em tampão imidazol na concentração de 2% (p/v).

2. Materiais e Métodos

* As soluções enzimáticas, de ATP e de NADP devem ser utilizadas imediatamente após preparação, ou armazenadas a -20° C. A enzima fosfoglucoisomerase dada a sua instabilidade, deve ser armazenada de preferência a -70° C (Jones *et al*, 1977). Durante o ensaio, as enzimas, o ATP e o NADP foram mantidos em gelo.

Procedimento:

As soluções, utilizadas nas reacções enzimáticas, são adicionadas na cuvete do espectrofotómetro na ordem indicada:

- 500 μ l de tampão imizadol
- 20 μ l de NADP
- 20 μ l de ATP
- 5 μ l de amostra a analisar
- 1 μ l de hexoquinase

Iniciou-se a reacção pela adição de 1 μ l da enzima G6PDH, aguardando-se que toda a glucose fosse transformada em gluconato e NADPH. Adicionou-se então 1 μ l da enzima fosfoglucoisomerase que permitiu a metabolização da frutose presente na amostra e subsequente quantificação. Por fim, a adição de 1 μ l de invertase possibilitou a determinação da concentração da sacarose, presente na amostra.

A evolução temporal da libertação do NADPH em cada uma das reacções referidas, foi seguida num registador acoplado ao espectrofotómetro. Cada uma dessas reacções foi considerada terminada, pela obtenção de um patamar estabilizado.

2.8.1.2. Análise dos Hidratos de Carbono por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Utilizou-se um sistema cromatográfico Waters Associate, B.V. munido com uma bomba -modelo 510- e com um auto injector 710B, ligado a um refractómetro (modelo R410) e a um integrador Chromjet da Spectra Physics.

O sistema foi equipado com uma coluna do tipo interação CHO-611 e com pré-coluna de troca iónica mista, mantida à temperatura de 80⁰ C. Utilizou-se como eluente, água desionizada (0,5 ml/ml) ultra-pura. O volume de amostra injectado foi de 20 µl.

2.8.2. **Quantificação de Proteína Total, Solúvel no Meio de Cultura.**

O método de Bradford (1976) foi modificado, afim de possibilitar o doseamento do teor proteico das células vegetais cultivadas em suspensão. O reagente Coomassie Blue G-250 utilizado, apresenta uma coloração vermelha, adquirindo a cor azul após reacção por complexação, com as proteínas. O complexo proteína-reagente apresenta a sua absorção máxima no comprimento de onda 595 nm e possui um coeficiente de extinção elevado, o que confere bastante sensibilidade na quantificação do teor proteico. O tempo de complexação é rápido, cerca de 2 minutos, e o produto final da reacção é estável, durante aproximadamente 1 hora. A concentração da proteína, presente na amostra, é proporcional ao aumento de absorvância, de acordo com a lei de Lambert-Beer.

Com a finalidade de proceder à libertação das proteínas para o meio de cultura, as células foram sonicadas com uma sonda emissora de ultra-sons com diferentes intensidades de sonicação (30w, 60w, 90w, 120w, 150w), para seleccionar a intensidade de vibração mais

2. Materiais e Métodos

eficaz (Anexo Fig. IA). A duração da sonicação (Anexo Fig. IB) assim como, a frequência da emissão ultrasónica (Anexo Fig. IC) foram igualmente optimizadas. O teor proteico foi quantificado, para cada uma das situações referidas, verificando-se que as condições óptimas de sonicação correspondem a um tempo de 1,5 min, potência de 120 w e 70% de frequência de emissão. Estes parâmetros foram seleccionados para todas as análises quantitativas de proteína solúvel efectuadas neste trabalho.

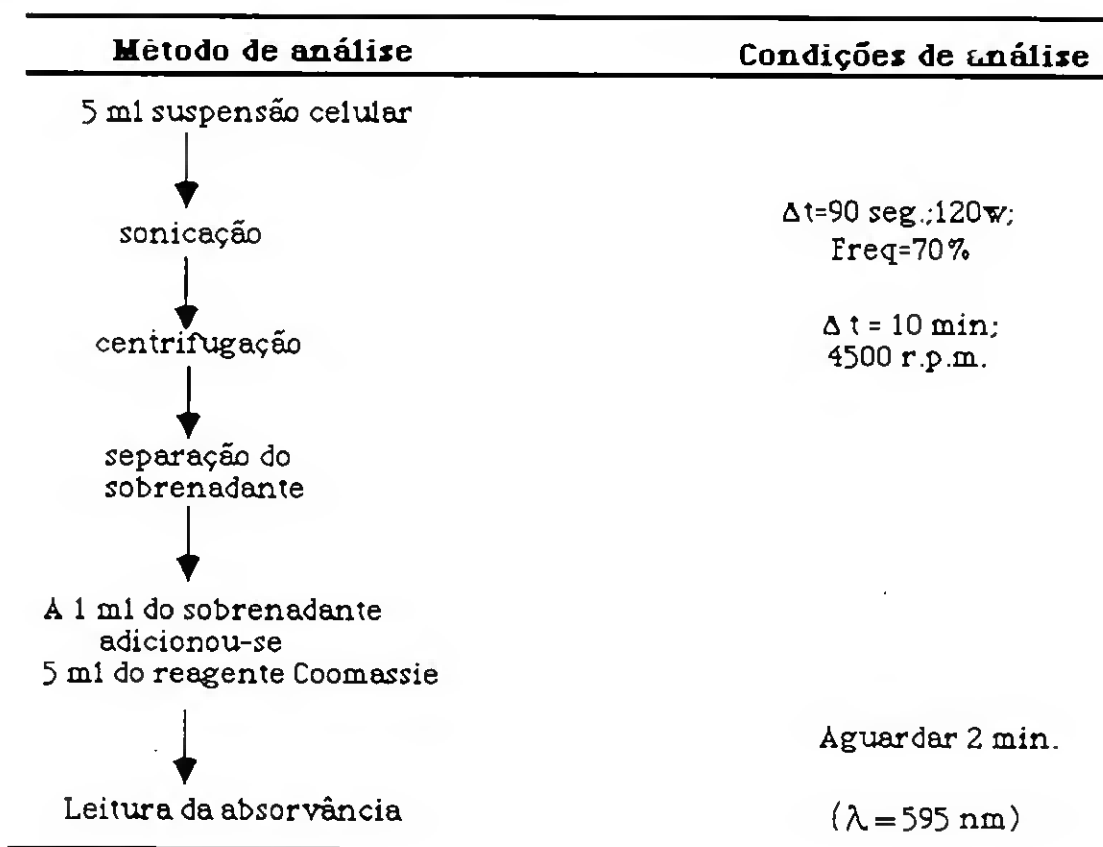


Fig. 2.4. Procedimento experimental utilizado para a quantificação da proteína total solúvel de células em suspensão de *Cynara cardunculus*.

Preparação do reagente Coomassie

- 1- 100 mg de reagente Coomassie foram dissolvidos em 500 ml de etanol a 95% (v/v)
- 2- A esta solução adicionou-se 100 ml de ácido fosfórico 88% (p/v) e fez-se o volume para 1 l com água pura e filtrou-se.

O reagente deve ser mantido às escuras a baixas temperaturas. Mantém-se estável durante cerca de 2 semanas, desde que sejam observadas as condições referidas.

O procedimento experimental utilizado na determinação do teor proteico solúvel da suspensão celular está esquematizado na fig. 2.4. O teste controlo deste método, foi preparado com 1 ml de meio nutriente B₅ e 5 ml de reagente Coomassie. A curva de calibração da proteína foi obtida a partir da correlação linear de concentrações crescentes de proteína-albumina bovina purificada (desde 0,1 mg/ml até 1 mg/ml), com a respectiva absorvância lida no comprimento de onda de 595 nm. A equação da recta obtida por regressão linear simples foi:

$$\text{Abs } 595 = 0,937 \text{ teor proteico (mg/ml)} - 0,034 \quad (r = 0,998)$$

2.8.3. Quantificação de Fenóis Excretados para o Meio de Cultura.

Com o objectivo de determinar o teor em fenóis excretados para o meio de cultura, utilizou-se um método espectrofotométrico directo (Anselmo *et al.* 1985), baseado na propriedade de absorção máxima a 270 nm (banda ultra-violeta do espectro de absorção), exibida pelos compostos aromáticos -fenóis- .

Após centrifugação de 10 ml da suspensão celular durante 10 min a 4500 r.p.m. e subsequente separação do sobrenadante, procedeu-se à leitura da absorvância do sobrenadante, no comprimento de onda referido, em cuvete de quartzo apropriada ao espectrofotómetro. O controlo foi efectuado por leitura da absorvância no mesmo comprimento de onda, do meio de cultura esterilizado. O conteúdo em fenóis presente no sobrenadante, foi determinado pela correlação linear entre diferentes diluições de fenol ($5 \cdot 10^{-3}$ - $50 \cdot 10^{-3}$ mg/ml) e respectivas absorvâncias, o que permitiu determinar a equação da recta padrão:

$$\text{Teor fenólico (mg/ml)} = 0,016 (\text{Abs } 270) + 0,02 \quad (r = 0,982)$$

Os valores apresentados representam o valor médio correspondente a medições efectuadas em duas ou três amostras independentes.

2.8.4. Determinação da Actividade Proteolítica da Suspensão Celular

A actividade proteolítica de suspensão celular foi determinada pelo método espectrofotométrico de Tomarelli *et al.* (1949), adaptado ao sistema de cultura de células vegetais cultivadas *in vitro*.

A azocaseína é uma proteína com uma composição molecular semelhante à estrutura da molécula da caseína do leite, possuindo um grupo cromóforo diazotado ligado, que lhe confere uma coloração alaranjada. Esta proteína, quando em presença de enzimas proteolíticas, é hidrolisada, originando peptídeos com o radical azo (-N=N-). Por sua vez, a componente proteica residual é precipitada por acção do ácido tricloroacético e sedimentada sob o efeito de ulterior centrifugação. Os peptídeos com radicais azo permanecem em solução e são neutralizados por acção de hidróxido de sódio 1M.

A actividade das proteases foi avaliada pela variação ao longo do tempo da absorvância, lida no comprimento de onda de 440 nm e a actividade proteolítica específica foi expressa em unidades enzimáticas (U) por grama de peso seco de biomassa (U/g P.S.) Uma unidade de actividade enzimática foi definida como o aumento de uma unidade de absorvância, lida no comprimento de onda de 440 nm, por hora de incubação, nas condições descritas.

REAGENTES

- Solução de azocaseína a 2%(p/v) preparada com tampão acetato de sódio 0.02 M (pH=5.1)
- Ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v)
- Hidróxido de sódio 1 M

O método utilizado para estimar a actividade proteolítica celular encontra-se esquematizado na Fig. 2.5 O ensaio controlo foi preparado por incubação de 10 ml de tampão acetato de sódio 0.02M com 5 ml de azocaseína 2% (p/v), nas condições referidas na Fig.2.7. Na realização deste teste testemunha, seguiram-se todos os passos indicados no esquema da Fig.2.5.

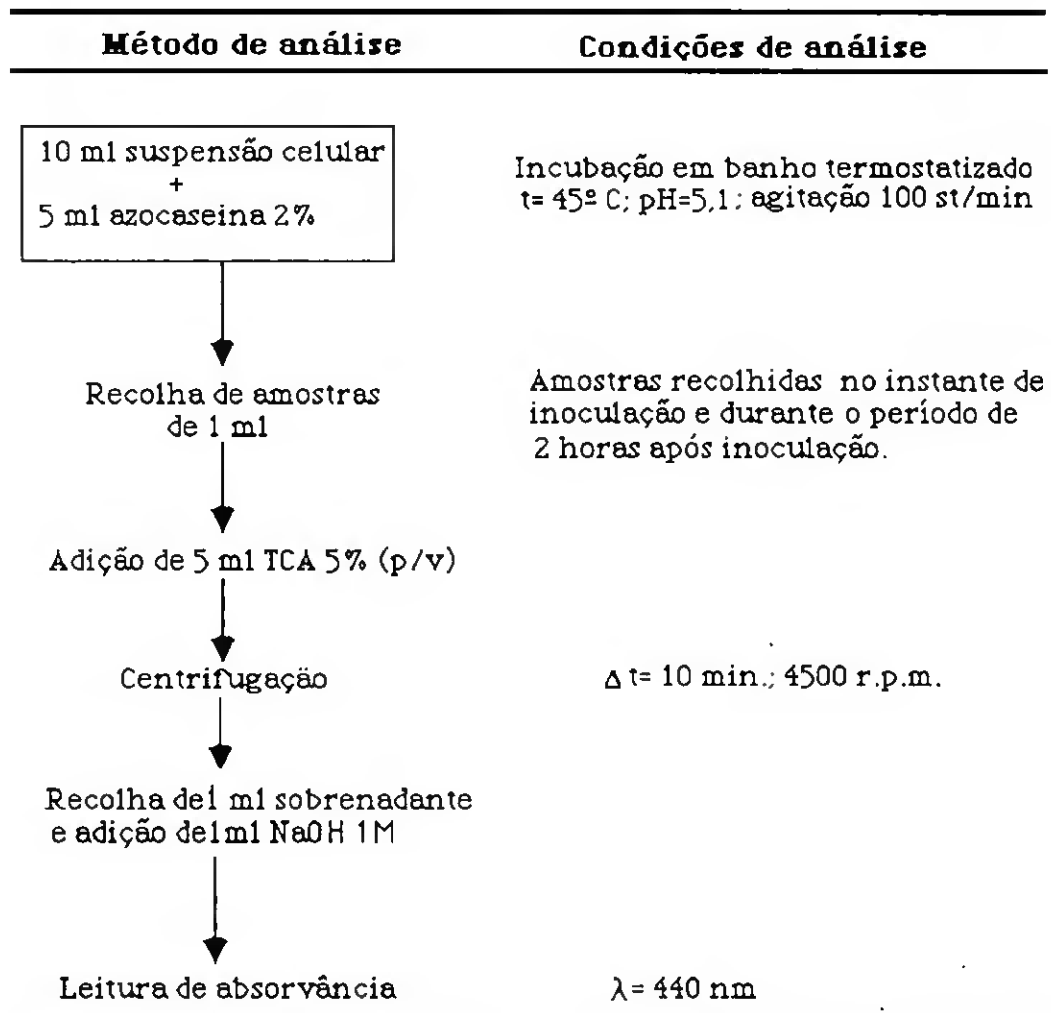


Fig. 2.5. Procedimento experimental para determinação da actividade proteolítica da suspensão celular de *Cynara cardunculus*.

2.8.5. Quantificação do Fósforo Inorgânico Total 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 e Shorr, 1953). O produto da reacção adquire coloração amarela e é quantificado espectrofotometricamente no comprimento de onda 375 nm.

REAGENTES:

- Molibdato de amónio 5% (p/v)
- Vanadato de amónio. Dissolve-se 2,5 g de amónia em 500 ml de água quente. Arrefece-se e adiciona-se 350 ml de ácido nítrico concentrado. Perfaz-se para 1 l com água ultra-pura, após a solução ter arrefecido.
- Solução Padrão: solução de fosfato de potássio di-hidrogenado na concentração de 100 p.p.m.
- Reagente misto. Mistura-se molibdato de amónio 5% e vanadato de amónio 0.25% na proporção 1:1.
Deve ser utilizado imediatamente após preparação.

O procedimento experimental encontra-se descrito na Fig.2.6. Com a finalidade de traçar a curva de calibração deste ensaio adicionou-se 12,5 ml do reagente misto a concentrações crescentes da solução padrão de fosfato de potássio di-hidrogenado (2-10 p.p.m.) e procedeu-se de acordo com o esquema da Fig.2.6. Estas concentrações foram correlacionadas com as respectivas absorvâncias lidas no comprimento de onda 375 nm, pela seguinte equação linear, optimizada por regressão linear simples:

$$\text{Teor em fósforo inorgânico(p.p.m.)} = 0,165.(\text{Abs } 375) - 0,0183 \quad (r= 0,998)$$

Método de análise	Condições de análise
5 ml da solução a analisar + 2 ml do reagente misto	agitação
↓	
Deixar em repouso	$\Delta t = 15 \text{ min}$
↓	
Perfazer o volume até 50 ml	
↓	
Leitura da absorvância	$\lambda = 375 \text{ nm}$

Fig.2.6. Procedimento experimental utilizado na determinação do teor em fósforo inorgânico, do meio de cultura de células em suspensão de *Cynara cardunculus*.

2.8.6. Quantificação do Catião Amónio no Meio de Cultura.

O doseamento do catião amónio no meio de cultura foi efectuado pelo método de Weatherburn (1967). O fenol na presença de uma solução de hipoclorito produz um indofenol, que é quantificado no comprimento de onda 625 nm. O nitroprussiato de sódio é utilizado como catalisador da reacção, possibilitando a determinação de microquantidades de amónio.

As amostras de suspensão celular colhidas periodicamente, foram centrifugadas a 4500 r.p.m durante 10 minutos, procedendo-se por decantação à separação e recolha do sobrenadante a analisar.

2. Materiais e Métodos

REAGENTES:

Solução A: Solução aquosa de fenol 1% (p/v) contendo nitroprussiato de sódio 0,005 % (p/v).

Solução B: Solução aquosa de hidróxido de sódio 0,5% (p/v) contendo 0,84% (v/v) de hipoclorito de sódio a 10%.

As soluções foram preparadas com água desmineralizada, imediatamente antes dos ensaios e protegidas da luz.

Método de análise	Condições de análise
1 ml de sobrenadante diluído (1:100) + 5 ml solução A + 5 ml solução B ↓	Agitar em "vortex"
Deixar em repouso ↓	$\Delta t = 40 \text{ min}$ Temp. ambiente
Leitura da absorvância	$\lambda = 625 \text{ nm}$

Fig.2.7. Procedimento experimental para determinar o teor em amónio de células em suspensão de *Cynara cardunculus*.

Na determinação da curva de calibração utilizou-se uma solução de nitrato de amónia em concentrações desde 0 mM-15 mM diluídas, tal como a amostra, de 1:1000. A curva padrão otimizada por regressão linear é expressa pela seguinte equação :

$$\text{Teor em amónia (mg/ml)} = 3.307 (\text{Abs}_{625}) + 0.0551 \quad (r = 0.987)$$

2.8.7. Quantificação do Ânion Nitrato no Meio de Cultura.

A determinação do ião nitrato contido no sobrenadante, foi efectuada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em sistema isocrático (Zurhake e Wander, 1985). O sobrenadante, o eluente e a amostra padrão foram purificados por microfiltração. Utilizou-se como padrão externo, uma solução 1,5 mM de nitrato de potássio. Utilizou-se água ultra-pura em todas as diluições.

Equipamento	Condições de Análise
Bomba Jasco (880-PU)	Fluxo do eluente: 1ml/min
Detector Jasco (875-UV)	$\lambda = 210$ nm
Injector	Volume de injeção da amostra: 2,5 μ l
Coluna polar de sílica aminada (Chrompack-Hypersil Aps-2)	Fase móvel : Tampão fosfato (10 g/l); pH = 3.0
Registador	Vel. papel: 2 min./cm Atenuação: 32

Fig.2.8. Equipamento e condições de análise para quantificar o teor em nitrato, em células em suspensão de *C. cardunculus*.

Filtros utilizados para purificação do eluente e amostras:

Eluente	Millipore	HVLP 047	0,45 μ M
Amostra e solução padrão	Millipore	HVLP 013	0,45 μ M

A determinação da concentração de nitrato presente na amostra de sobrenadante foi realizada de acordo com as condições expressas na fig. 2.8. O tempo de retenção - R_f - do nitrato, determinado para condições processuais estabilizadas, foi de 4 min.

CAPÍTULO 3

Influência do "stress" hidrodinâmico no crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* num sistema descontínuo, com agitação e arejamento forçado.

3.1. Metodologia e Objectivos

3.2. Aspectos Gerais

3.3. O "Stress" Hidrodinâmico

3.4. Transferência de Massa

3.5. Resultados e Discussão

- 3.5.1. • Transferência de massa e tempos constantes, característicos do processo de crescimento celular de *C. cardunculus* em suspensão.
 - 3.5.2. • Transferência de massa, "stress" hidrodinâmico e crescimento celular de *C. cardunculus* em suspensão.
 - 3.5.3. • "Stress hidrodinâmico" e consumo de oxigénio durante o crescimento da suspensão celular de *C. cardunculus*
-

3.1. METODOLOGIA e OBJECTIVOS

Estuda-se neste capítulo a influência de diferentes condições de transferência de oxigénio no metabolismo celular e suas implicações na produção de biomassa. Paralelamente, avalia-se o efeito condicionante do "stress" físico na dimensão e metabolismo celular, com a finalidade de verificar a adequação do "design" do fermentador utilizado em sistema descontínuo, à cultura de células vegetais em suspensão, em particular, à suspensão celular de *C. cardunculus*.

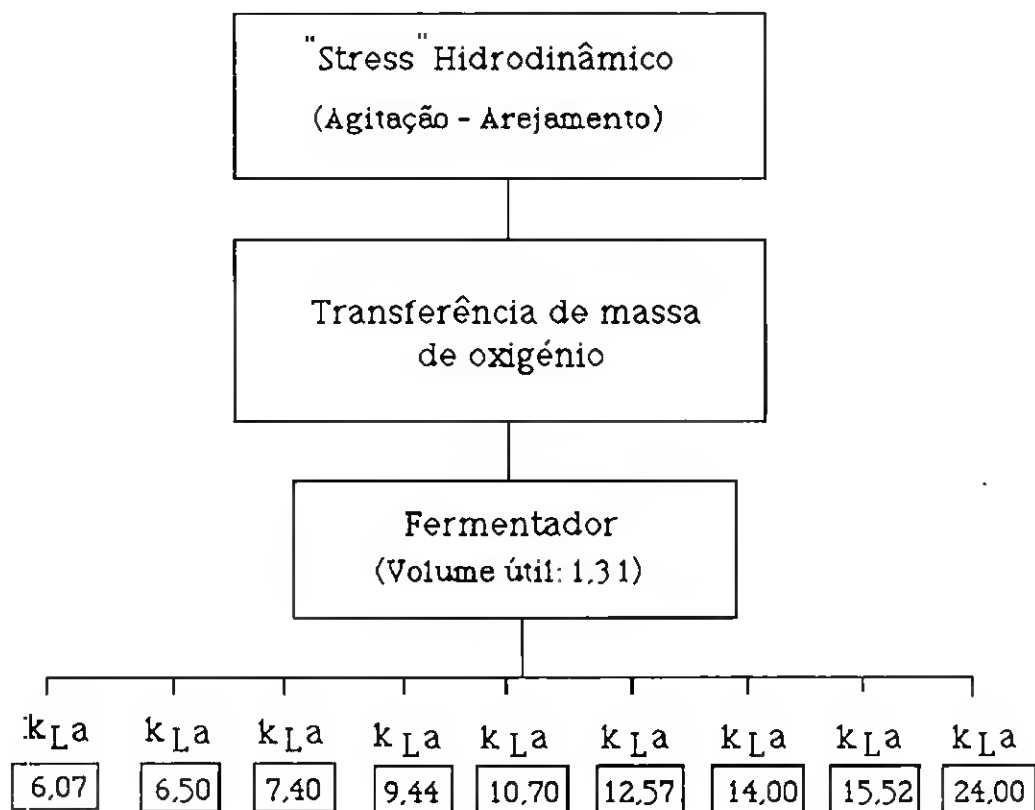


Fig.3.1. Esquema organizativo da experimentação do capítulo 3.

Assim, realizaram-se ensaios de crescimento de células de *Cynara cardunculus* num fermentador descontínuo de 2 l e para diferentes combinações de valores de agitação e arejamento (30, 60 e 100 r.p.m.; 0,077, 0,166 e 0,308 v.v.m.), expressas por diferentes

3. "Stress" Hidrodinâmico

coeficientes de transferência volumétrico de oxigénio $-k_{La}$ -, de acordo com o esquema representado na Fig. 3.1.

Os valores de k_{La} determinados para o meio nutriente B₅ (Gamborg, 1968) na ausência de células, constam da Tabela 3.1. e foram determinados em diferentes condições operacionais de arejamento e agitação, definidas para o processo de crescimento de células de *C. cardunculus* em biorreactor.

Tabela 3.1. Valores de k_{La} (h^{-1}) determinados pelo método dinâmico para diferentes condições operacionais de agitação e arejamento forçado estabelecidas em reactor de 2 l, na ausência de células.

Agitação (r.p.m.)	k_{La} (h^{-1})		
	Arejamento (v.v.m.)		
	0,077	0,166	0,308
30	6,07	9,440	14,00
60	6,50	10,70	15,50
100	7,40	12,57	24,00

O crescimento celular foi avaliado por determinação da taxa específica de crescimento $-\mu g$ -, incremento máximo em biomassa (n° células/ml, peso fresco, peso seco, taxa respiratória relativa ao consumo de oxigénio) e produtividades de biomassa. Foi igualmente determinado, o crescimento da cultura de células em suspensão com base na relação ponderal peso fresco/peso seco.

Complementarmente, foi calculado o rendimento de biomassa (peso seco) em função do oxigénio consumido (Y_{x/O_2}), para cada uma das

fermentações efectuadas para diferentes coeficientes de transferência de massa. Segundo Wilson (1987), a massa total de oxigénio consumido, por unidade de volume útil do reactor durante um período de não arejamento, pode ser calculada através de uma integração numérica trapezoidal, com base no balanço de massa referente ao oxigénio dissolvido na fase líquida contida no biorreactor. Este balanço pode ser descrito pela seguinte equação:

$$\frac{dc}{dt} = k_L a (C^* - C) - RX$$

C* - Concentração de saturação do oxigénio.
 (244 $\mu\text{MO}_2/\text{l}$, Dawson *et al.*, 1969).
 C - Concentração do oxigénio na fase líquida.
 RX - Taxa respiratória referente ao oxigénio
 total consumido pela biomassa presente
 no reactor.

(3.1.)

Na ausência de arejamento, pressupondo que $k_L a = 0$, a variação da concentração em oxigénio será dada por:

$$\frac{dc}{dt} = -RX$$

(3.2.)

O consumo global de oxigénio por unidade de volume útil do reactor foi calculado pela integração numérica expressa por:

$$M = \int_0^t RX dt$$

(3.3.)

O rendimento de biomassa em função do oxigénio consumido (Y_{x/O_2}), obtém-se pelo declive da recta da variação da concentração em biomassa em função do oxigénio total consumido por unidade de volume total da suspensão celular -M-.

Este método tem, contudo, algumas limitações que deverão ser consideradas na sua aplicação:

- 1 - A sua validade depende da razão constante entre a biomassa produzida e o oxigénio consumido.
- 2 - Na ausência de arejamento, o coeficiente de transferência de oxigénio não se anula completamente, devido à presença de bolhas de ar residuais e às trocas gasosas com a superfície de arejamento.

3 - Uma resposta lenta do eléctrodo de oxigénio pode introduzir uma não linearidade no processo de medição, particularmente, nas determinações iniciais que deverão ser desprezadas. Contudo, e de acordo com Turner e Howell (1984), os eléctrodos de oxigénio foram considerados, de uma maneira geral, de resposta rápida.

Os ensaios realizados em sistema descontínuo foram repetidos pelo menos duas vezes e os parâmetros de crescimento correspondem à média aritmética dos resultados experimentais. Amostras de 25 ml foram colhidas de dois em dois dias em condições assépticas.

3.2. ASPECTOS GERAIS

A cultura de células vegetais em biorreactor depende da dimensão, do tipo do reactor e da definição dos parâmetros processuais. O estudo da influência do inóculo inicial, do estágio fisiológico das células e da influência dos nutrientes no crescimento de culturas de células vegetais em suspensão têm sido efectuado, principalmente, em "erlenmeyer". Todavia, o estudo de parâmetros como a transferência de oxigénio, agitação, arejamento, reciclagem do ar, controlo do pH, pO_2 , pCO_2 , bem como a quantificação do caudal dos gases efluentes, apenas são possíveis em culturas em fermentador (Bader *et al.* 1987, Allan *et al.* 1988, Meijer *et al.* 1989). Tem sido reconhecido o interesse tecnológico do controlo destes parâmetros na produção de biomassa e na produção de metabolitos primários ou secundários.

Um dos principais problemas associados à cultura de células vegetais, reside numa adequada transferência de massa do oxigénio. Esta, é particularmente afectada pelo aumento da viscosidade do meio (Kato *et al.* 1978, Tanaka 1982, Leckie *et al.* 1991), que ocorre ao longo do ciclo de crescimento, especialmente para elevadas densidades

celulares e para reactores dimensionados à escala de produção. 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 geralmente conseguida pelo aumento da agitação e arejamento do reactor.

É actualmente aceite, que as culturas de células vegetais em suspensão são mais sensíveis ao "stress" hidrodinâmico gerado pela agitação e arejamento existente no seio dos reactores, do que as culturas microbianas. A sensibilidade da membrana celular vegetal à agitação é uma das limitações à utilização do biorreactor agitado mecânicamente na produção de biomassa e de metabolitos secundários (Fowler 1987, Scraag *et al.* 1988, Shuler 1988, Tanaka 1981, 1982).

Os reactores agitados mecânicamente apresentam importantes vantagens na produção de massa em grande escala e para elevadas concentrações celulares (Ulbrich *et al.* 1985, Tanaka 1981) e têm sido alvo de intensa investigação (Drapeau *et al.* 1986, Scragg *et al.* 1987, Leckie *et al.* 1991, Van Gulik *et al.* 1989, 1992, Meijer 1989). Estes fermentadores, agitados mecânicamente, têm igualmente sido utilizados na produção de metabolitos secundários (Hegarthy *et al.* 1986, Schalatmann 1993).

3.3. O "STRESS" HIDRODINÂMICO

Segundo Markl e Bromnenmeier (1986), estudos de "stress" hidrodinâmico têm sido realizados desde a década de 60, especialmente em células microbianas. É escassa, no entanto, a investigação realizada em cultura de células vegetais em suspensão (Tanaka 1987, Leckie e Scraag 1991, Meijer 1989, Ballica *et al.* 1992).

3. "Stress" Hidrodinâmico

Segundo Cherry e Papoutsakis (1986), o "stress" físico gerado num reactor agitado mecânicamente, distribui-se por 3 áreas de influência distintas no reactor: fluxo laminar, fluxo turbulento (zona da turbina) e fluxo nas camadas limítrofes dos objectos submersos no reactor, como sejam os eléctrodos, controlador da temperatura e outros sistemas de controlo. Este modelo teórico é apenas válido para suspensões diluídas (fluídos Newtonianos) e foi apenas testado numa cultura de células animais em reactor, com microtransportadores distribuídos no seu interior. Em conformidade com Meijer (1989), o modelo de Cherry e Papoutsakis aplica-se a células ou agregados vegetais em cultura líquida agitada mecânicamente, desde que a dimensão das células seja semelhante à dos microtransportadores e que a suspensão celular se encontre diluída.

O conceito tensão de corte ("shear stress") é ambíguo na literatura e é normalmente entendido como a maior ou menor agitação a que as células estão sujeitas num reactor. Define-se, fisicamente, como uma força por unidade de área, que actua paralelamente à superfície e resulta do gradiente de velocidades numa direcção perpendicular à direcção do fluxo. Este gradiente denomina-se taxa de agitação (γ) e relaciona-se matematicamente (equação 3.4.) com o "stress" de agitação (σ). Este factor $-\sigma$ é considerado o principal factor interveniente no "stress" hidrodinâmico.

$$\sigma = \beta \gamma \quad (3.4.)$$

Pressupondo que a cultura celular líquida se comporta fisicamente como um fluído Newtoniano, a constante β pode considerar-se igual à viscosidade do meio $-\mu-$, fazendo deste modo depender o "stress" provocado pela agitação mecânica, da viscosidade do meio de crescimento.

Todavia, são raros os estudos quantitativos do efeito da agitação na célula viva, em particular na célula vegetal (Tanaka 1981, Tanaka 1987, Tanaka 1988, Scragg *et al.* 1986, Scragg *et al.* 1988, Allan *et al.* 1988, Meijer *et al.* 1989).

O **arejamento forçado** tem sido abordado, igualmente, como fonte importante de "stress" celular em biorreactor. Este parâmetro, essencial na oxigenação das culturas de células vegetais ou microbianas, é analogamente importante na homogeneização da suspensão, de forma, a evitar a sedimentação das células. A lise celular e a formação de espuma são efeitos nefastos do arejamento excessivo.

Assim, e em conformidade com Meijer (1989), para o "stress" hidrodinâmico em cultura de células vegetais mantidas em reactor do tipo arejamento-agitação, podem contribuir quatro factores:

- forças laminares
- forças de turbulência
- colisões
- arejamento

A danificação celular devida ao "stress" físico pode ser avaliada através de alterações morfológicas celulares (lise celular, alteração das dimensões da célula e do agregado celular), alterações do metabolismo, dos rendimentos, das produtividades e perda da viabilidade celular. A estes efeitos negativos do "stress" hidrodinâmico, pode ser contraposto a influência positiva do "stress" físico na produção de metabolitos secundários (Leckie *et al* 1991, Schaltmann *et al.* 1992, Yamamoto 1989).

De entre as alterações morfológicas da célula, pode ser destacada, a diminuição da dimensão do agregado celular (Tanaka 1987, Scragg *et al.* 1988). Segundo Meijer (1989), a diminuição da taxa específica de crescimento, da taxa respiratória, a diminuição da viabilidade celular, e a libertação da proteína para o meio de cultura, constituem efeitos do "stress" em células em suspensão de *Tabernaemontana divaricata*.

A sensibilidade da parede celular ao "stress" hidrodinâmico é atribuída, em geral, à relativamente grande dimensão da célula vegetal, comparativamente com a da célula microbiana, à rigidez das paredes celulares de natureza celulósica e ao grande vacúolo intracelular (Meijer, 1989). Nas culturas de células vegetais

3. "Stress" Hidrodinâmico

consideradas sensíveis ao "stress" físico, podemos citar *Cudrania tricuspidata* (Tanaka, 1981), *Helianthus annuus* (Scragg *et al.* 1988), *Pinus malus* (Soule *et al.* 1987). Em contrapartida, foi referenciado, que células em suspensão de *Nicotiana tabacum* e de *C. roseus* desenvolveram uma parede e membrana celulares resistentes a agitação mecânica superior a 300 r.p.m. e 1000 r.p.m., respectivamente (Leckie e Scragg 1991, Meijer 1989, Meijer *et al.* 1993). É de notar, que células da mesma espécie, como por exemplo *C. roseus*, podem apresentar um comportamento atípico, relativamente à resistência ao "stress" hidrodinâmico. Segundo Wagner e Volgelmann (1977), Yokoi *et al.* (1993), estas células são extremamente sensíveis à agitação, enquanto que segundo Scragg *et al.* (1988), e van Gulik (1990), elas apresentam insensibilidade ao "stress" promovido pela agitação mecânica.

Resumindo, refira-se, que a sensibilidade das células vegetais à acção do "stress" hidrodinâmico decorre das características da parede celular (Meijer, 1989). Esta é uma estrutura flexível com propriedades viscoelásticas, possuindo a capacidade de se alongar durante o ciclo de crescimento celular. A elevada tensão superficial da parede da célula deve-se à configuração paralela das microfibrilhas de celulose, que existem na matriz dos polissacáridos. Durante o crescimento celular, a expansão plástica (irreversível) é dominante relativamente à expansão elástica (reversível), produzindo um aumento de pressão contra a parede celular. Na fase estacionária de crescimento, quer a plasticidade quer a elasticidade da parede celular decrescem, tornando-a rígida. Como consequência, aumenta a pressão exercida pelo fluído no interior da célula (Ballica *et al.* 1992). Nesta fase, as células são extremamente sensíveis à agitação (Ballica *et al.* 1992). Tanaka *et al.* (1988) observaram um aumento do teor de celulose e de hemi-celulose da parede celular de *C. roseus* em cultura líquida, aquando do aumento do "stress" hidrodinâmico, conferindo à parede da célula uma maior resistência à ruptura. A insensibilidade das células poderá estar, ainda, associada à incapacidade de estas repararem pequenas lesões na parede celular através da produção de um polissacárido, a calose (Meijer *et al.*

1993). A adição de polímeros ao meio nutriente confere protecção à parede celular, contra o efeito da agitação (Goldblum *et al.* 1990). Segundo Marx *et al.* (1991), o factor determinante da maior ou menor sensibilidade das células vegetais, ao "stress" hidrodinâmico da cultura, reside na natureza da cultura celular e nas condições de cultura. Os mesmos autores consideram, igualmente, a idade celular e a dimensão dos agregados celulares, como condicionantes da referida sensibilidade (células mais envelhecidas oferecem menor resistência à ruptura da parede celular; suspensões celulares finas evidenciam menor susceptibilidade ao "stress" hidrodinâmico).

Em resumo, verifica-se, que linhas de células vegetais *in vitro* apresentam diferentes comportamentos face ao "stress" hidrodinâmico. Umas, revelam resistência à ruptura celular mesmo quando sujeitas a forças de tensão elevadas, outras, são particularmente sensíveis ao "stress" promovido pela agitação mecânica ou ao arejamento forçado e, ainda, outras desenvolvem tolerância ao "stress", após diversas subculturas.

3.4. TRANSFERÊNCIA DE MASSA

Após a abordagem do "stress" hidrodinâmico na vertente dos parâmetros agitação-arejamento é necessário considerá-lo sob o ponto de vista da transferência de massa, conceitos interligados que muitas vezes, erroneamente, são considerados sinónimos.

A taxa de transferência dos substratos e dos produtos no seio da suspensão celular tem particular importância na produtividade do sistema, donde a necessidade da sua optimização para cada sistema biológico. Segundo Mavituna (1988), é importante distinguir entre sistemas homogéneos (culturas de protoplastos, suspensões celulares vegetais) e sistemas heterogéneos (*calli*, culturas de agregados

3. "Stress" Hidrodinâmico

celulares, culturas de órgãos ou cultura de células imobilizadas). Torna-se necessário identificar o sistema, antes de proceder ao estudo das condições de transferência de massa, adequadas ao projecto de um determinado biorreactor.

Em qualquer processo fermentativo, deve ser disponibilizado à célula viva em crescimento, quantidades adequadas de nutrientes existentes no meio de cultura e do oxigénio existente nas bolhas de ar. A transferência de massa, em particular da molécula de oxigénio, ocorre pela transposição da fase gasosa, da interface gás-líquido, da fase líquida e, finalmente, a transferência do oxigénio para o interior do organismo em crescimento. Este processo de transferência é causado pela diferença entre a concentração do oxigénio na fase gasosa e no interior do organismo. A velocidade de transferência de oxigénio, para baixas concentrações, considera-se proporcional à diferença entre os teores em oxigénio. Assim, para a interface gás-líquido, esta relação pode escrever-se:

$$\frac{dc}{dt} = k_L (C^* - C) \quad (3.5.)$$

C* - Concentração de saturação do oxigénio.
(244 $\mu\text{MO}_2/\text{l}$, Dawson *et al.*, 1969).
C - Concentração do oxigénio na fase líquida.
 k_L - Coeficiente de transferência de massa

Na situação de impossibilidade de determinar a área da interface, a equação (3.5.) escrever-se-à:

$$\frac{dc}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (3.6.)$$

$k_L a$ - Coeficiente de transferência de massa volumétrico.
a - Superfície de arejamento na interface/unidade de volume.

O coeficiente de transferência da massa volumétrico - $k_L a$ - depende das propriedades físico-químicas do meio nutriente (solubilidades, viscosidade, coeficientes difusionais, tensão superficial do meio líquido), dos produtos do metabolismo celular, dos materiais

presentes no meio de cultura, da forma e dimensão dos agregados celulares, do tipo e dos parâmetros processuais do biorreactor (em particular, as condições de homogeneização do meio líquido, o caudal do arejamento e a dimensão das bolhas gasosas).

Uma das formas de adequar este coeficiente às necessidades celulares, é através dos parâmetros de agitação-arejamento, o que permite otimizar as condições de operação do reactor, de molde a que o oxigénio não se encontre em concentração limitante do crescimento celular. Todavia, valores elevados de $k_L a$ podem significar elevado "stress" hidrodinâmico, o que pode levar à ruptura celular, como referimos anteriormente. Segundo Atkinson e Mavituna (1985), os valores típicos deste coeficiente, para culturas de células vegetais, podem variar entre 10-100 h^{-1} . Contudo, os valores mais comuns localizam-se entre 2-30 h^{-1} . Culturas microbianas apresentam, normalmente, valores de $k_L a$ entre os 100-1000 h^{-1} , o que evidencia uma diferença nítida entre as exigências destes dois sistemas celulares.

Essencialmente, distinguem-se dois tipos de métodos para quantificar o $k_L a$, o método dinâmico e o método estacionário. O primeiro baseia-se na taxa de variação da concentração de oxigénio dissolvido, medida após interrupção do arejamento e o segundo baseia-se no balanço de massa do oxigénio realizado em fase estacionária. Embora o método dinâmico seja o mais utilizado, não é o mais rigoroso e apresenta limitações. Segundo Merchuck *et al.* (1990), a validade do método depende do tempo de resposta do eléctrodo de oxigénio, não podendo este, ser menor do que $1/k_L a$. Boon *et al.* (1992) discutiram os 2 métodos, considerando o método estacionário mais reprodutível, embora mais moroso. Uma outra desvantagem deste método, reside na exigência em equipamento específico para quantificar os fluxos de oxigénio à entrada e à saída do reactor. Todavia, Sonsbeek *et al.* (1991) consideram os dois métodos equivalentes.

Kato *et al.* (1975) num primeiro estudo realizado em células em suspensão de *Nicotiana tabacum* observaram que, para $k_L a$ menor do

3. "Stress" Hidrodinâmico

que 10 h^{-1} , a concentração de biomassa diminuía. Neste caso, foi encontrada proporcionalidade entre o valor de k_{La} e a concentração de biomassa final. Para células de *C. roseus*, mantidas em sistema descontínuo limitado pela quantidade de oxigénio presente, foi, igualmente, referenciada uma linearidade entre o coeficiente de transferência de massa volumétrico do oxigénio e a concentração final de biomassa (Pareilleux e Vinas, 1983). Smart e Fowler (1981) observaram para valores de k_{La} superiores a 25 h^{-1} , uma diminuição da taxa específica de crescimento de células de *C. roseus* cultivadas em meio líquido, em fermentador descontínuo. Em contraste, Ducos e Pareilleux (1986) referem a não influência do arejamento, na taxa específica de crescimento em células de *C. roseus*, mantidas em reactor agitado mecânicamente. Hong *et al.* (1989) registaram a melhor produção de biomassa de células em suspensão de morango em "erlenmeyer", para $k_{La}=12,6 \text{ h}^{-1}$. Os mesmos autores referem uma menor produção em reactor agitado mecânicamente ($k_{La}=6,7 \text{ h}^{-1}$) do que em "erlenmeyer". Segundo Robertson *et al.* (1989), para $k_{La}=3,9 \text{ h}^{-1}$ o crescimento da suspensão celular de *Dioscorea deltoidea* é inferior ao observado para $k_{La}=17 \text{ h}^{-1}$, tendo, este último valor, sido considerado óptimo para a obtenção de biomassa e de metabolitos secundários.

Diferentes projectos de reactores têm sido concebidos, numa tentativa de compatibilizar um elevado teor em oxigénio dissolvido no meio líquido, com um reduzido "stress" físico. Soule *et al.* (1987) construíram um biorreactor constituído por dois cilindros rotativos com o mesmo eixo, com a finalidade de controlar o "stress" promovido por forças laminares. Este fermentador foi testado com uma cultura de células de maçã em suspensão, em que a melhor resposta ao crescimento celular, foi obtida na situação de forças laminares nulas.

Leckie e Scragg (1991) evidenciaram a dependência do coeficiente k_{La} , do tipo de difusor de ar utilizado no bioreactor. A capacidade de difusão de bolhas de ar e a dimensão das mesmas são fundamentais para a quantificação numérica do coeficiente de transferência de

massa. Os valores óptimos de k_{La} , para a produção de células de *C. roseus* (peso seco e peso fresco), situam-se entre 4,5 e 12,5 h^{-1} . Em contrapartida, para $k_{La} > 20 h^{-1}$ foi referida uma maior produção de alcalóides -serpentina- o que, de acordo com Leckie e Scragg (1991), pode ser atribuído ao aumento do "stress" físico, que induziria uma alteração na regulação das enzimas envolvidas na biossíntese dos metabolitos secundários.

A influência da posição do difusor do ar no coeficiente de transferência de massa volumétrico - k_{La} - foi investigada por Martinez *et al.* (1989), tendo sido observado a diminuição do coeficiente k_{La} com o aumento da distância entre o difusor e a turbina.

Kim *et al.* (1991) conceberam um reactor com características simultâneas de "air-lift" e com agitação mecânica para culturas de células vegetais de elevada concentração.

Para suspensões celulares vegetais, Yokoi *et al.* (1993) desenvolveram um fermentador do tipo arejamento-agitação, em que a turbina é constituída por quatro pás sob a forma de grelha e o difusor é uma espiral. Os valores de k_{La} referidos por aqueles autores, são mais elevados do que num reactor tradicional, mas o "stress" hidrodinâmico tem uma menor incidência negativa nas células. A biomassa (peso seco), de células em suspensão de *C. roseus* atingiu cerca de 2 vezes a biomassa obtida, nas mesmas condições, em fermentador tradicional com agitação mecânica (Yokoi *et al.* 1993).

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Transferência de massa e tempos constantes característicos do processo de crescimento celular de *C. cardunculus* em suspensão.

Para projectar um biorreactor é necessário determinar o nível de transferência de massa suficiente, de molde a que o oxigénio e outros nutrientes não se encontrem em concentrações limitantes do crescimento e estejam sujeitos a uma acção de homogeneização adequada. Para tal, foi estimado o coeficiente de transferência volumétrico de oxigénio para diferentes condições de arejamento-agitação em reactor e a sua influência no metabolismo celular de *C. cardunculus*. Torna-se, igualmente, premente, a análise do regime dos mecanismos envolvidos no processo, o que nos permitirá definir quais os mecanismos limitantes desse processo, pela determinação dos tempos constantes.

É, geralmente, aceite o conceito de **tempo constante**, como uma medida da velocidade de um processo físico ou biológico, definindo-se, genericamente, como a razão entre uma capacidade e um fluxo (Meijer,1989).

O coeficiente de transferência volumétrico de oxigénio - $k_L a$ -, determinado na ausência de células em biorreactor de 2l agitado mecânicamente, varia linearmente em função do aumento dos parâmetros de agitação e arejamento (Fig.3.2.). Este facto permitiu exprimir quantitativamente o "stress" hidrodinâmico pelo coeficiente $k_L a$. Linearidade idêntica foi referida para o parâmetro arejamento, por Leckie *et al.* (1991), num reactor com turbina de 6 pás e para um sistema "air-lift" por Hong *et al.* (1989). Esta proporcionalidade directa entre arejamento e o $k_L a$ tinha sido anteriormente verificada

por Kato *et al.* (1975) em fermentador de 15 l, do tipo arejamento-agitação e em fermentador de 65 l, do tipo "air-lift".

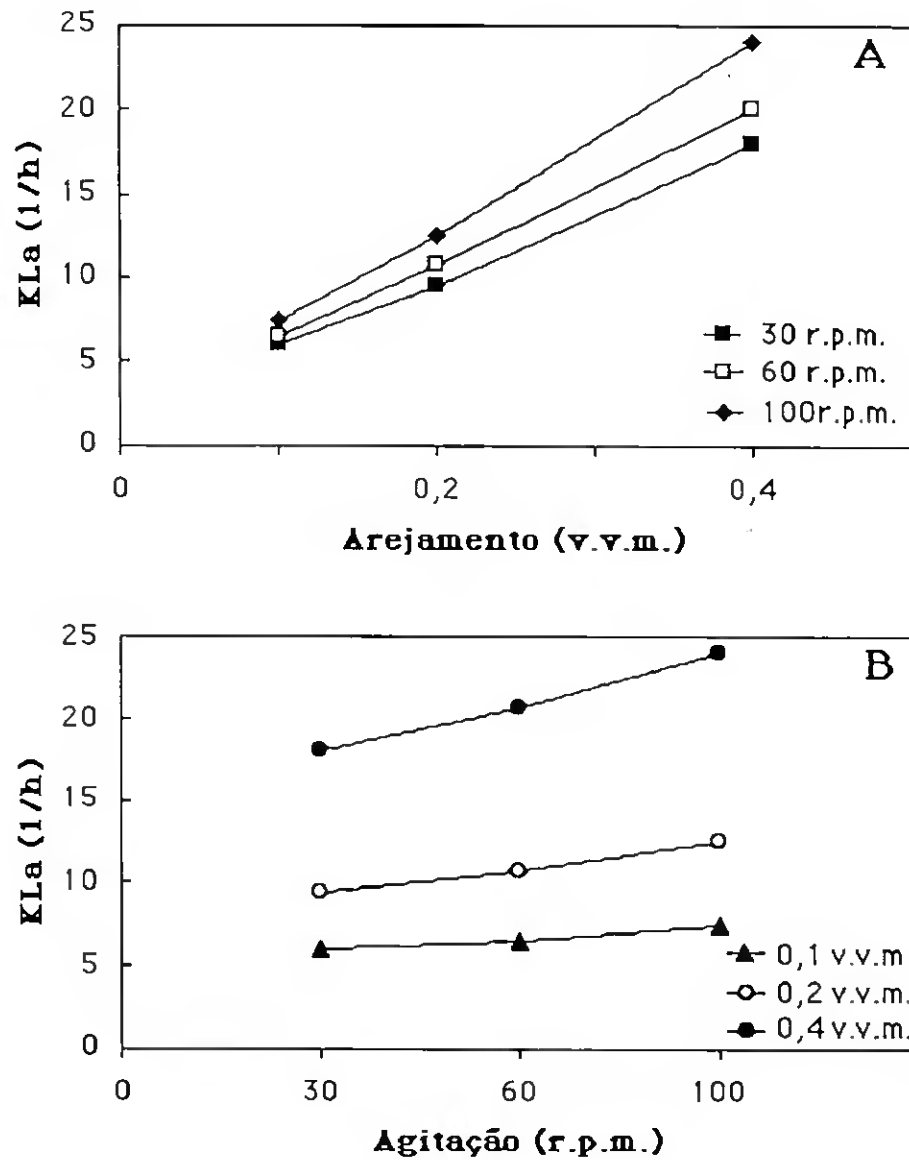


Fig.3.2. Valores do coeficiente de transferência de massa volumétrico do oxigênio $k_L a$, determinados em biorreactor de 2 l, para diferentes caudais de arejamento (A) e para diferentes velocidades de agitação (B), na ausência de células.

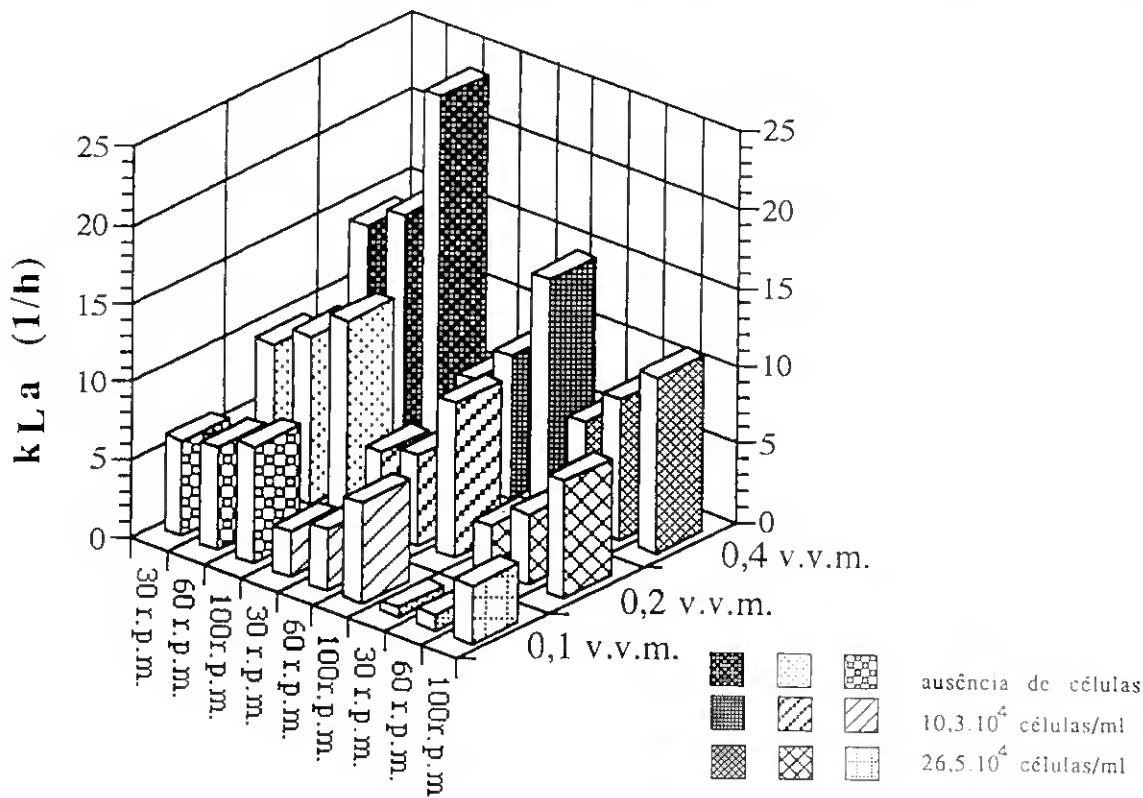


Fig.3.3. Influência da densidade da suspensão de *C. cardunculus* no coeficiente de transferência volumétrico do oxigénio, determinado para diferentes condições de agitação e arejamento.

Analisando a Fig.3.3., verifica-se que o k_{La} decresce com o aumento da densidade celular, o que pode estar relacionado com o crescimento da viscosidade do meio durante o ciclo de crescimento. Nestas condições, os menores valores estimados para o coeficiente de transferência de oxigénio ($0,59 \text{ h}^{-1}$), foram obtidos no final da fase estacionária de crescimento (15 dias), para a concentração de biomassa mais elevada ($26,5 \cdot 10^4$ células/ml) e para os menores valores de agitação e arejamento do reactor (30 r.p.m.; 0,1 v.v.m.). O maior valor de k_{La} correspondeu ao coeficiente de transferência não biológico, determinado para os valores máximos de agitação e arejamento estabelecidos no reactor (100 r.p.m.; 0,4 v.v.m.).

De facto, o crescimento das células em suspensão de cardo foi acompanhado por uma variação na viscosidade da suspensão celular, verificada, no intervalo entre 1cp e 16cp, valores estes determinados

respectivamente na fase de latência e estacionária de crescimento. Segundo Kato *et al.* (1978), a cultura de células em suspensão de tabaco apresentou uma viscosidade de 1,2 cp no momento da inoculação, aumentando para 33 cp após um período de 74 h. Segundo aqueles autores, a viscosidade resultaria da natureza do material celular em suspensão, da forma desse material, da quantidade de metabolitos excretados e da natureza química dos nutrientes. A variação da viscosidade na suspensão celular ao longo do crescimento, foi, igualmente, relacionada com a capacidade de transferência de oxigênio ($k_L a$) em células em suspensão de *Catharanthus roseus* (Leckie *et al.* 1991) e numa cultura celular de *Aerobacter aerogenes* (Rols e Goma, 1991).

Na tabela 3.2. são apresentados os valores dos tempos constantes, característicos dos processos metabólicos e dos mecanismos físicos, necessários à manutenção do processo de crescimento das células de cardo. A análise comparativa dos diferentes tempos característicos permite definir quais os processos ou mecanismos limitativos da prossecução de um processo fermentativo.

Os tempos constantes relativos ao processo de crescimento (t_x) e à taxa de proteólise (t_p) são pelo menos 2 vezes superiores, do que os tempos característicos dos processos físicos envolvidos no crescimento celular (t_{ci} , t_m , t_{ot} , t_{oc} , θ_g), o que pode indicar a não existência de uma fase estacionária de equilíbrio entre processos e mecanismos físicos, tal como referido por Meijer (1989), numa proposta de modelo teórico de células vegetais mantidas em fermentor agitado mecânicamente e com arejamento forçado. A comparação entre o tempo de transferência inicial do oxigênio (t_{oi}) com o tempo de consumo deste gás (t_{oc}), para qualquer das condições de agitação ensaiadas, sugere, que o oxigênio não é limitante do crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus*, visto o tempo necessário para o consumo do oxigênio ser bastante mais elevado do que o tempo de transferência deste gás.

3. "Stress" Hidrodinâmico

Tabela 3.2. Tempos constantes, característicos do processo de crescimento de células em suspensão de *C. Cardunculus* e seus mecanismos físicos para diferentes velocidades de agitação e arejamento constante (100 cm³/min) em biorreactor.

Tempo Característico (s)	Agitação (r.p.m.)		
	30	60	100
$t_{ci} = 0,5 v_{ic}/\phi_p$	0,3200	0,1600	0,0098
$t_m = 4 t_{ci}$	1,2800	0,6400	0,3920
$t_{ot} = 1/K_{La}$	593,10	553,80	486,50
$t'_{ot} = 1/K'_{La}$	6101,7	3600,0	962,60
$t_{oc} = C^*/r_{max}$	1923,1	1851,10	1785,60
$\Theta_G = V_L/Q$	600,00	600,00	600,00
$t_x = 1/\mu_g$	$1,46 \cdot 10^5$	$2,06 \cdot 10^5$	$8,8 \cdot 10^4$
$t_p = C_p^{max}/r_p$	$40,9 \cdot 10^7$	-----	-----

t_{ci} - tempo constante de circulação (gás no seio do líquido); v_{ic} - volume do compartimento da turbina ($= 0,08\pi D_v H_L$); D_v - diâmetro do vaso; H_L - altura do líquido; ϕ_p -capacidade de circulação da turbina ($0,75ND_i^3$); N - velocidade de agitação; D_i - diâmetro da turbina; t_m - tempo constante de mistura; t_{ot} - tempo constante para a transferência do oxigénio calculado nas condições iniciais da operação; t_x - tempo constante de crescimento; t_{oc} - tempo constante para o consumo de oxigénio calculado nas condições iniciais da operação; C^* - concentração de saturação do oxigénio; r^{max} - taxa respiratória máxima; Θ_G - tempo de residência das bolhas de gás; V_L - volume do líquido; Q - caudal gasoso; t'_{ot} - tempo constante de transferência de oxigénio calculado para elevada concentração de biomassa ($26,5 \times 10^4$ células/ml); t_p - tempo constante para a formação do produto; C_p^{max} -Concentração máxima do produto ; r_p - taxa de formação do produto.

Todavia, para elevadas concentrações de biomassa ($26,5 \cdot 10^4$ células/ml), o consumo de oxigénio é mais rápido do que a transferência de oxigénio (t_{ot}), excepto para a agitação de 100 r.p.m., o que exige alteração das condições processuais ou do "design" do fermentador, de molde a que o oxigénio não se torne um nutriente limitante do crescimento celular. Segundo Tanaka (1987), uma das questões críticas do projecto de um biorreactor para cultura de células vegetais com elevada densidade celular, reside, exactamente, na definição das condições de oxigenação vitais para as células, em

que os efeitos negativos do "stress" hidrodinâmico tenham sido minimizados.

Como o tempo de mistura gás-líquido t_m apresenta valores bastantes reduzidos comparados com o t_{OC} , é bastante improvável a ocorrência de insuficiente oxigenação nas zonas do reactor de menor arejamento, traduzindo um índice de elevada eficácia do caudal de arejamento utilizado neste reactor.

O menor tempo de dispersão das bolhas gasosas no seio do líquido ($t_m=0,392$) corresponde à maior velocidade de agitação e ao menor tempo de transferência das bolhas gasosas, como seria de prever. Igualmente, foi observado um menor tempo de consumo de oxigénio para a agitação de 100 r.p.m., o que pode estar relacionado com a maior taxa de crescimento obtida nestas condições ($k_La=7,4 \text{ h}^{-1}$), para a suspensão celular de *C. cardunculus* (Tabela 3.3.).

O facto do tempo de residência das bolhas de gás no seio do reactor (θ_g) ser idêntico em todas as situações ensaiadas (30, 60 e 100 r.p.m.), sugere que este parâmetro é independente da agitação existente no reactor, sendo apenas função do arejamento utilizado. Este resultado é corroborado pelo facto dos tempos de residência calculados para as células de cardo em suspensão, serem muito superiores aos tempos de residência determinados por Meijer (1989) para células de *C. roseus* cultivadas num reactor de 5 l com arejamento de $3,3 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}$, (cerca de 20 vezes mais elevado do que o caudal utilizado na produção de biomassa de *C. cardunculus* em fermentador).

Esta análise de fluxos permite avaliar a eficiência relativa de cada um dos mecanismos considerados, assim como a validade da utilização do biorreactor proposto na cultura de células vegetais. Refira-se, a propósito, que desde a década de 70, com particular referência para um importante estudo comparativo de biorreactores elaborado por Wagner e Vogelmann (1977), reactores do tipo "air-lift" foram considerados excelentes para a cultura de células vegetais porque

associavam uma elevada oxigenação com um reduzido "stress" provocado pela agitação. Contudo, Wilson e Marron (1978) e mais tarde Tanaka (1981, 1987) questionaram a utilização do biorreactor "air-lift" para elevadas concentrações celulares, devido à insuficiente homogeneização da cultura. Actualmente é aceite, a utilização generalizada de fermentadores do tipo agitação-arejamento para culturas de tecidos vegetais. Diversos autores referem a influência do "design" deste tipo de reactor (Leckie *et al.* 1991; Yokoi *et al.* 1993; Kim *et al.* 1991), assim como a selecção dos parâmetros processuais de agitação e arejamento (Meijer *et al.* 1993) na produção de biomassa ou de metabolitos a partir de suspensões celulares vegetais.

É de sublinhar, que, para realizar um estudo em larga escala de produção, nos parece imprescindível uma análise dos tempos característicos dos processos, que, nos permita conhecer, se a transferência de massa é um passo limitativo do processo. Se for este o caso, tal facto poderá ser evitado pela escolha criteriosa do biorreactor e dos parâmetros processuais.

3.5.2. Transferência de massa, "stress" hidrodinâmico e crescimento celular de *C. cardunculus* em suspensão.

Os principais parâmetros de crescimento de células de *C. cardunculus*, referentes a diferentes condições de agitação-arejamento, expressas pelo coeficiente de transferência volumétrico de massa - $k_L a$ -, são apresentados na Tabela 3.3. A melhor produção de biomassa foi obtida para valores de $k_L a$ entre 6,07 e 7,40 h^{-1} , para os quais se obtiveram taxas específicas de crescimento de 0,59 dia^{-1} e 0,98 dia^{-1} , respectivamente. A produtividade mais elevada foi, analogamente observada para $k_L a=6,07 h^{-1}$. Em concordância com estes resultados, Pareilleux e Chaubet (1980) referiram que a maior produção de células em suspensão de maçã, cultivadas em

fermentador de 4l agitado mecanicamente, foi obtida para um coeficiente de transferência volumétrica de oxigênio de 7 h^{-1} . Em células em suspensão de tabaco cultivadas em fermentador de 15 l com agitação mecânica, foi obtido um crescimento ótimo para $k_{La}=10 \text{ h}^{-1}$ (Kato *et al.* 1975).

Tabela 3.3. Parâmetros de crescimento da cultura celular de *C. Cardunculus* em fermentador descontínuo, para diferentes k_{La} iniciais (determinados para o meio de cultura, na ausência de células)

k_{La} (h^{-1})	Concentração celular inicial ($\text{n}^\circ \text{ cel.} \cdot 10^4/\text{ml}$)	μg (dia^{-1})	t_d (h)	Produtividade de Biomassa (g.p.s./l. dia)	Taxa Respiratória Máxima ($\mu \text{M O}_2/\text{l. min}$)	P.F/P.S. Inicial	Final
6,07	7,12	0,590	28,20	0,496	7,9	35,4	42,6
6,50	4,71	0,420	39,60	0,319	8,7	37,3	44,2
7,40	4,82	0,980	17,00	0,343	8,3	34,6	44,2
9,44	7,58	0,340	48,90	0,318	10,4	33,9	42,9
10,70	9,58	0,259	64,20	0,320	10,0	37,3	44,2
12,57	7,68	0,100	166,4	0,096	10,1	34,7	32,5
14,00	13,37	0,000	—	0,000	—	51,7	35,6
15,52	12,47	< 0,000	—	—	—	30,9	29,2
24,00	10,11	< 0,000	—	—	—	36,3	35,9

Para valores de k_{La} superiores ou iguais a 14 h^{-1} , a taxa específica de crescimento é nula ou negativa e a produção de biomassa não foi mensurável.

A produtividade de biomassa, calculada para *C. cardunculus* para $k_{La}=6,07 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 3.3.), é similar à referida por Robertson *et al.* (1989) para uma cultura celular de *Dioscorea deltoidea* para $k_{La} = 3,9 \text{ h}^{-1}$ em sistema "air-lift" (0,41 g/l.dia). No entanto, para

3. "Stress" Hidrodinâmico

coeficientes de transferência de oxigênio mais elevados ($17,1 \text{ h}^{-1}$), foi referida uma maior produtividade ($0,66 \text{ g p.s./l.dia}$), contrariamente aos resultados obtidos com células de cardo. Este facto pode ser atribuído ao menor "stress" hidrodinâmico exercido nos sistemas biológicos pelos sistemas "air-lift", o que possibilita a utilização de elevados coeficientes de transferência de massa sem afectar a integridade celular.

Com o intuito de evidenciar o efeito negativo do k_{La} , na produção de biomassa e na respiração celular da suspensão de células de cardo, apresenta-se na Fig. 3.4., a relação percentual relativa a cada um dos parâmetros de biomassa para valores distintos de k_{La} . Assinale-se mais uma vez, a acção inibitória de elevados coeficientes de transferência de massa ($14-24 \text{ h}^{-1}$) no crescimento celular.

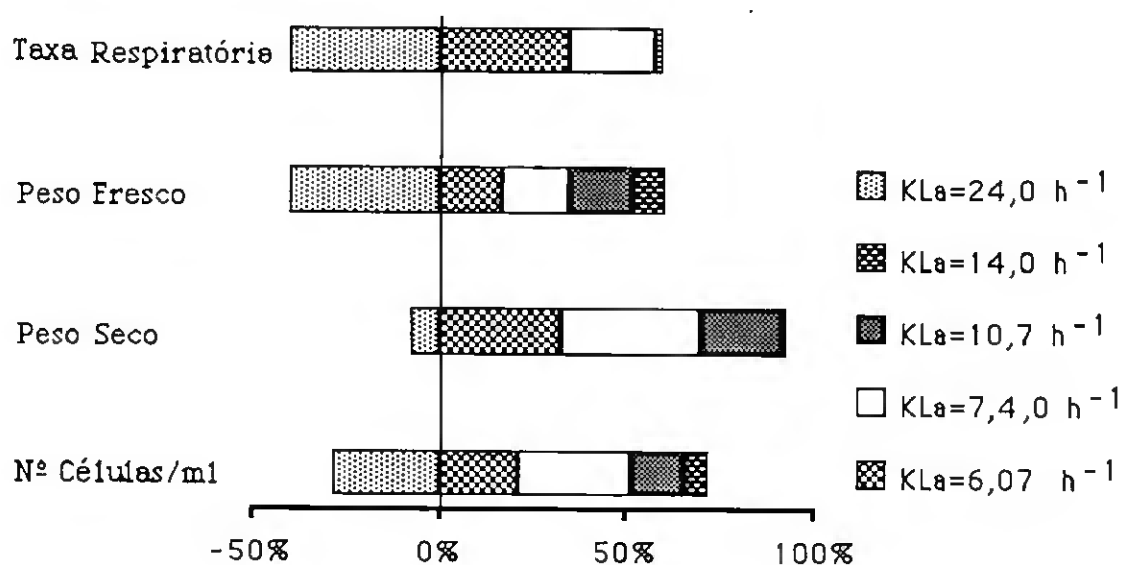


Fig.3.4. Variação do incremento máximo dos parâmetros de crescimento ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* para diferentes coeficientes de transferência de massa volumétrica de oxigênio.

Células em suspensão de *Catharanthus roseus* mantidas em fermentador agitado mecânicamente, apresentaram a maior

acumulação de biomassa expressa em peso seco, para coeficientes de transferência de massa entre $6,0 \text{ h}^{-1}$ e $12,5 \text{ h}^{-1}$, (Leckie e Scragg, 1991). O maior incremento em peso fresco ocorreu, no entanto, para $k_{La}=12,5 \text{ h}^{-1}$. Para um coeficiente de transferência $k_{La}=20 \text{ h}^{-1}$, os mesmos autores referem um acréscimo inferior na biomassa, o que revela um efeito nocivo, em concordância com o verificado para células de *C. cardunculus*. Num outro estudo, também elaborado em células em suspensão de *C. roseus* ID₁, Leckie *et al.* (1991) obtiveram crescimento celular, em reactor agitado com uma velocidade de 1000 r.p.m., o que corresponde a um elevado "stress" hidrodinâmico. Segundo estes autores, a utilização de turbinas com pás com uma inclinação de 60° relativamente ao eixo rotativo, é favorável à diminuição do "stress" físico, comparativamente com as turbinas munidas de pás paralelas ao eixo. Recorde-se, que a sensibilidade das células vegetais em suspensão pode variar dentro da mesma espécie e para diferentes condições de cultura. Os valores de k_{La} citados, foram determinados pelo método dinâmico e portanto comparáveis.

A análise comparativa da razão ponderal peso fresco (P.F.)/peso seco (P.S.) na fase inicial e final de crescimento de células de *C. cardunculus* para diferentes k_{La} iniciais (Tabela 3.3.) revela dois tipos de comportamentos. Para valores de coeficientes de transferência massa inferiores a $10,7 \text{ h}^{-1}$ verificou-se um incremento na razão P.F./P.S. ao longo do ciclo de crescimento, o que sugere um aumento do conteúdo celular em água durante o período de crescimento de células viáveis. Para valores de k_{La} superiores a $10,70 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 3.3.), a razão entre o peso fresco e o peso seco diminui, o que pode ser atribuído à perda de água vacuolar que ocorre ao longo do ciclo de crescimento, com a consequente redução da dimensão da célula, em situação de "stress" ambiental. Os nossos resultados são concordantes com os de Kim *et al.* (1991), segundo os quais, se verifica um rápido aumento da razão P.F./P.S., particularmente na fase estacionária de crescimento, numa cultura celular de *Thalictrum rugosum*, quando esta se encontra em condições adequadas ao crescimento celular.

3. "Stress" Hidrodinâmico

Com a finalidade de averiguar a influência da velocidade de agitação mecânica na razão entre o peso fresco e o peso seco durante o crescimento, efectuou-se uma fermentação em que se fez variar a agitação entre 30 r.p.m. e 100 r.p.m., mantendo constante o arejamento (0,1 v.v.m.) (Fig. 3.5.).

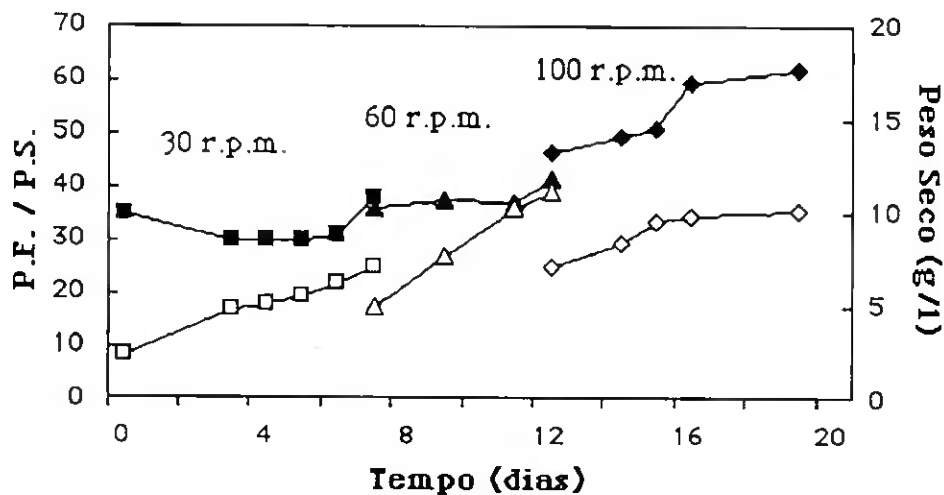


Fig.3.5. Perfil da variação da razão peso fresco/peso seco de células em suspensão de *C. cardunculus*, para diferentes velocidades de agitação em fermentador de 2 l. Os símbolos a cheio representam a razão P.F./P.S. e os símbolos abertos representam a biomassa expressa em peso seco.

Para $k_L a$ entre $6,0-7,4 \text{ h}^{-1}$, considerados ótimos para o crescimento celular de *C. cardunculus*, a variação positiva da razão peso fresco/peso seco, associada a um aumento de biomassa com o aumento da agitação (Fig.3.5.) denota, uma vez mais, uma relação estreita entre a dimensão da célula, o ambiente hidrodinâmico da operação e a produção de biomassa. Snape *et al.* (1989) descrevem para uma cultura de células de *C. roseus* em "erlenmeyer", um aumento da relação ponderal P.F./P.S. em função da velocidade de agitação da incubadora no intervalo 50-140 r.p.m. Segundo Leckie *et al.* (1991), para células de *C. roseus* mantidas em fermentador de 12 l, agitado mecânicamente, o aumento da velocidade da turbina de 100 para 300 r.p.m. produziu um aumento no índice de expansão

celular (P.F./P.S.). De acordo com os mesmos autores, o decréscimo no índice de expansão observado em reactor com quatro pás verticais laterais, pode ser devido a um maior "stress" físico imposto por este tipo de turbina ao crescimento celular de *C. roseus*, tal como proposto pelos autores.

A análise comparativa entre o intervalo de variação das razões ponderais P.F./P.S. apresentado pelas células em suspensão de cardo (30-60) (Fig.3.5; Tabela 3.3), com a variação dos quocientes P.F./P.S. de células em suspensão de *T. rugosum* (8-15) (Kim *et al.*, 1991) e com as razões P.F./P.S. relativas a culturas de *C. roseus* (5-25) (Snape e Thomas, 1989; Leckie *et al.*, 1991) sugere, que as células de cardo em cultura líquida são bastante mais volumosas do que as células das outras culturas, supra citadas. Drapeau *et al.* (1986) referiram uma variação do quociente do peso fresco e o peso seco ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de *C. roseus* (25-50) semelhante à determinada para *C. cardunculus*.

Parece-nos, e em concordância com o exposto, que as células de cardo em suspensão, quando sujeitas a elevado "stress" hidrodinâmico, tendem a reduzir a sua capacidade de expansão quer plástica, quer elástica, adquirindo uma dimensão mais reduzida e uma maior rigidez, conforme referenciado em 3.3 para outras linhas de células vegetais.

Da análise da Tabela 3.3. e da Figura 3.6, constata-se mais uma vez, que em fermentações de suspensões celulares de *C. cardunculus*., realizadas para um $k_L a$ inicial de 24 h^{-1} não se observa crescimento celular e que a produtividade de biomassa, a taxa específica de crescimento e o incremento de biomassa são nulos ou apresentam taxas negativas. Após 6 dias de fermentação, somente 24% da concentração celular inicial apresentava viabilidade, tendo-se observado concomitantemente, acentuada produção fenólica (Fig. 3.6), o que pode indicar a activação do metabolismo secundário durante este período. O perfil de acumulação de fenóis extracelulares ao longo do crescimento celular, encontra-se normalmente associado

3. "Stress" Hidrodinâmico

a uma situação de "stress" ambiental. Em cultura de células em suspensão de células de rosa foi registado um nítido aumento fenólico aquando do início da fase estacionária (Shuler, 1986), fase, em que as células se encontram normalmente em "stress" nutricional. Segundo Schmidt *et al.* (1989), o aumento da concentração fenólica é uma consequência da perda de viabilidade celular.

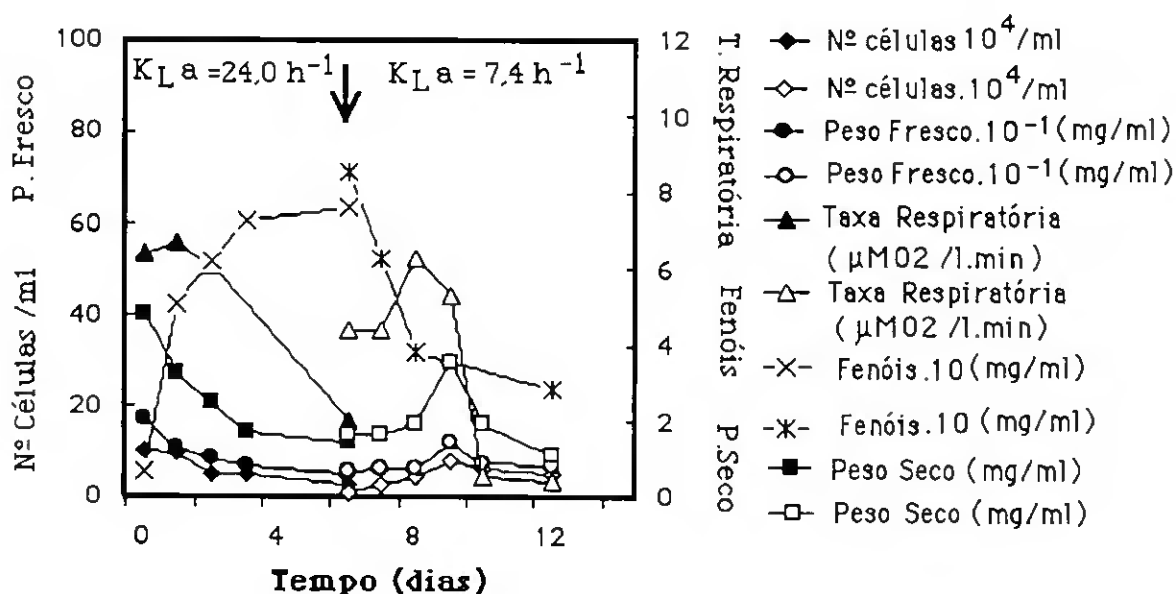


Fig. 3.6. Crescimento da suspensão celular de *C. cardunculus* num fermentador descontínuo iniciado para $K_L a = 24,0 \text{ h}^{-1}$. A seta indica alteração das condições de transferência de massa volumétrica do oxigénio para $k_L a = 7,4 \text{ h}^{-1}$.

Ao 6º dia da fermentação iniciada para $k_L a = 24 \text{ h}^{-1}$, o caudal do arejamento do reactor foi alterado de 0,308 v.v.m. para 0,077 v.v.m., e a agitação mantida em 100 r.p.m. Nestas condições, observou-se uma rápida recuperação do crescimento celular (Fig. 3.6.) com uma elevada taxa específica de crescimento ($0,93 \text{ dia}^{-1}$) e aumento da viabilidade celular (75%).

Estes resultados foram confirmados com a realização de uma outra fermentação iniciada para um menor coeficiente de transferência de massa ($k_L a = 14 \text{ h}^{-1}$) (30 r.p.m.; 0,308 v.v.m.) (Fig. 3.7). Embora se

tenha observado um ligeiro crescimento celular inicial até 6º dia de fermentação, a taxa específica de crescimento apresentou valores próximos de zero.

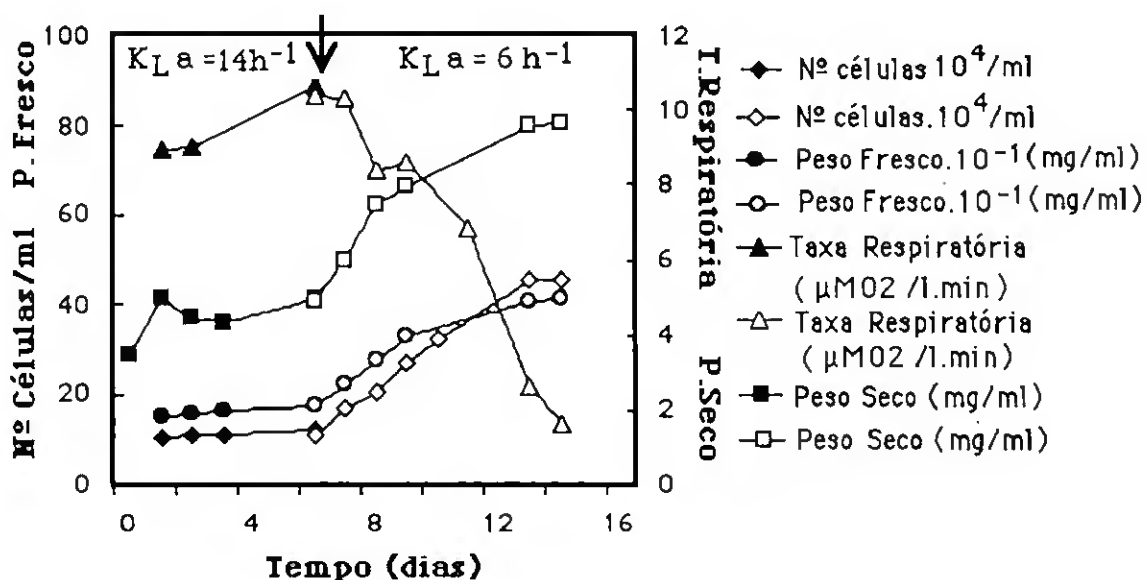


Fig.3.7. Crescimento da suspensão celular de *C. cardunculus* num fermentador descontínuo iniciado para $k_{La} = 14,0 \text{ h}^{-1}$. A seta indica alteração das condições de transferência de massa volumétrica do oxigênio para $k_{La} = 6,07 \text{ h}^{-1}$.

Com a diminuição do caudal do arejamento de 0,308 para 0,077 v.v.m., no 6º dia do ciclo de crescimento, as células readquiriram a capacidade de divisão e aumentaram o volume, atingindo uma viabilidade de 80% no 14º dia, para uma taxa específica de crescimento de $0,98 \text{ dia}^{-1}$. O acentuado crescimento celular foi acompanhado por drástico declínio na taxa respiratória e menor disponibilidade de O_2 dissolvido no meio de cultura dentro do reactor (<20%), o que reflecte a menor capacidade de transferência de oxigênio, possivelmente associada à maior viscosidade do meio (13 cp.), como discutido em 3.5.1. De facto, o tempo de transferência de oxigênio em situação de elevada densidade celular ($26,5 \cdot 10^4$ células/ml), é da ordem de grandeza dos 6000 s (Tabela 3.2.) e é superior ao tempo de consumo do oxigênio (t_{oc}) calculado no 10º dia

3. "Stress" Hidrodinâmico

desta fermentação (1315,8 s) (Fig. 3.7). Estes resultados suportam a hipótese, de, nesta fase do crescimento celular, se verificar uma limitação pelo nutriente oxigénio, que não será suficiente para as necessidades metabólicas da célula. Tanaka *et al.* (1981) verificaram igualmente, um decréscimo na produção de biomassa de *Cudrania tricuspidata* em suspensão líquida mantidas em fermentador, com um elevado $k_L a$ (30 h^{-1}). Contrariamente, segundo Kato *et al.* (1975), a concentração final de células de tabaco não era afectada para $k_L a$ entre 10 e 25 h^{-1} . Para $k_L a < 10 \text{ h}^{-1}$, estes autores observaram uma variação linear entre a concentração de biomassa e o $k_L a$.

Os ensaios realizados em culturas celulares de cardo sugerem que a inibição do crescimento que ocorre para elevados $k_L a$ ($14,0$, $15,5$ e $24,0 \text{ h}^{-1}$), possa ser atribuída ao elevado "stress" hidrodinâmico, ao excesso de oxigenação ou ainda à deficiência em dióxido de carbono. Segundo Pareilleux e Chaubet (1981), a inibição do crescimento para valores de arejamento da ordem dos 0,3 v.v.m. deve-se, à diminuição da concentração de dióxido de carbono na atmosfera do reactor.

Com a finalidade de testar estas hipóteses, foram realizados ensaios, em que se tentou manter o valor de $k_L a = 14 \text{ h}^{-1}$ durante toda a operação de crescimento celular, alterando, no entanto, as condições de arejamento e agitação de 30 r.p.m. e 0,308 v.v.m. para 135 r.p.m. e 0,166 v.v.m. no 6º dia de fermentação. Apesar da diminuição do arejamento e o subsequente aumento da concentração em dióxido de carbono, não foi observado crescimento celular durante todo o período fermentativo, o que sugere, que o "stress" hidrodinâmico é a causa preponderante da inibição do crescimento. No entanto, a hipótese da influência do dióxido de carbono no crescimento celular carece de ser investigada em células em suspensão de *C. cardunculus*.

A fermentação de células em suspensão de cardo, representada na Fig. 3.8., foi iniciada para $k_L a = 6,07 \text{ h}^{-1}$, tendo-se aumentado a agitação mecânica no reactor de 30 para 100 r.p.m. ($k_L a = 7,40 \text{ h}^{-1}$) no 7º dia de crescimento. Nestas condições, e mantendo inalterável o

arejamento ($100 \text{ cm}^3/\text{min}$), registou-se um aumento na acumulação de biomassa e um aumento da taxa específica de crescimento inicial de $0,40 \text{ dia}^{-1}$ para $0,83 \text{ dia}^{-1}$.

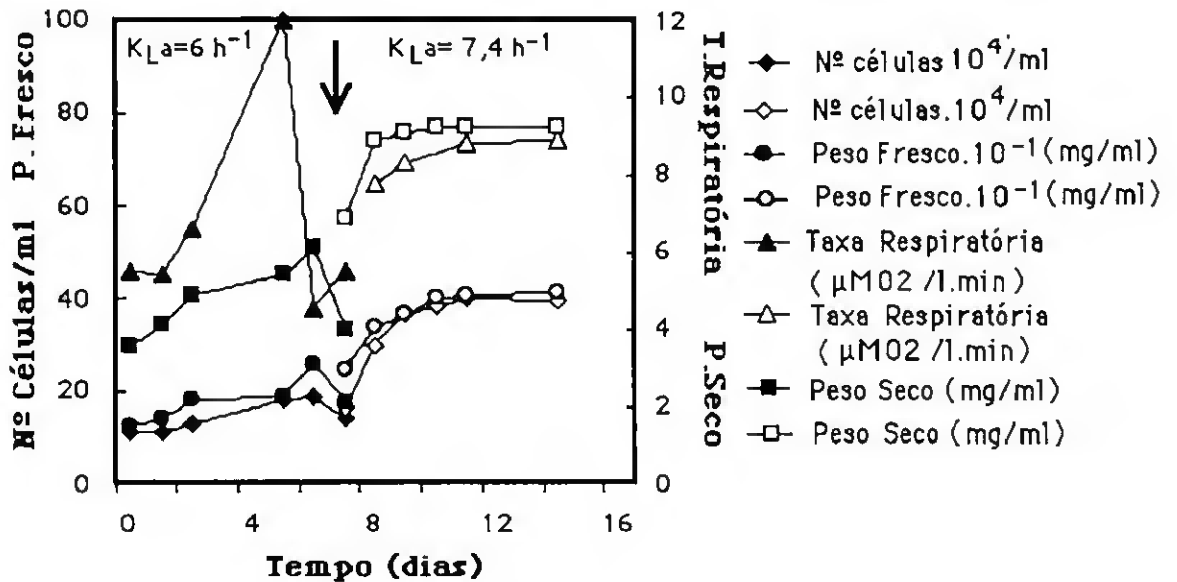


Fig.3.8. Crescimento da suspensão celular de *C. cardunculus* num fermentador descontínuo iniciado para $k_{La} = 6,07 \text{ h}^{-1}$. A seta indica alteração das condições de transferência de massa volumétrica do oxigênio para $k_{La} = 7,40 \text{ h}^{-1}$.

A partir do 5º dia do ciclo observou-se uma diminuição acentuada da taxa respiratória, em paralelo com uma diminuição dos valores de oxigênio dissolvido ($< 30\%$), tal como foi constatado no ensaio representado na Fig. 3.7. A diminuição da biomassa (peso fresco, peso seco, nº de células), associada temporalmente ao declínio na taxa respiratória nesta fase de crescimento, pode ser interpretada como uma consequência da degradação celular por esgotamento nutricional (oxigênio). O ulterior aumento da capacidade de transferência de oxigênio ($k_{La} = 7,4 \text{ h}^{-1}$) na suspensão celular, parece ter permitido a revitalização das células viáveis ainda presentes naquela fase de degenerescência celular, tal como ocorreu nos ensaios representados nas Figs. 3.6 e 3.7.

Torna-se, assim, necessário proceder à otimização das condições de transferência de massa iniciais, para um dado reactor biológico e ao ajustamento ao longo do ciclo de crescimento celular destes parâmetros, para cada tipo de culturas celulares *in vitro*, quer numa perspectiva de produção de biomassa, quer de produção de metabolitos secundários.

3.5.3. "Stress" hidrodinâmico e consumo de oxigénio durante o crescimento da suspensão celular de *Cynara cardunculus*.

Os perfis de variação temporal das taxas respiratórias (TR) e das taxas respiratórias específicas (TRE) relativas ao oxigénio em células em suspensão de cardo, para diferentes valores de k_{La} (6,07, 7,40, 9,44, 10,74 e 12,57 h^{-1}), estão representados na Fig.3.9. O padrão de variação de ambas as taxas é idêntico para valores de k_{La} entre 6 e 12 h^{-1} . No entanto, para k_{La} superiores a 12 h^{-1} verificam-se algumas disparidades. De igual modo, os valores máximos das taxas respiratórias não mostram variação significativa (Tabela 3.3.) para os valores mais baixos do coeficiente de transferência volumétrica de oxigénio. Para valores de k_{La} entre 9 e 12 h^{-1} , a taxa respiratória máxima sofreu um ligeiro acréscimo relativamente aos valores determinados para menores k_{La} , sem repercussões observáveis no crescimento da suspensão celular de cardo (Tabela 3.3.).

É particularmente relevante, a existência de um patamar nos perfis da taxa respiratória específica de células de *C. cardunculus* para $6 < k_{La} < 12 h^{-1}$, a partir do 4º dia de crescimento (Fig. 3.9,C), o que nos leva a supôr que as necessidades respiratórias são semelhantes, independentemente da maior disponibilidade em oxigénio existente no biorreactor e do crescimento celular apresentar taxas distintas

(Tabela 3.3.). Diversos autores propõem a existência de consumo de oxigênio direcionado para a manutenção celular (Kato e Nagai 1979, Drapeau *et al.* 1986, Taticek *et al.* 1990), o que significa consumos de oxigênio não canalizados para a produção de biomassa celular.

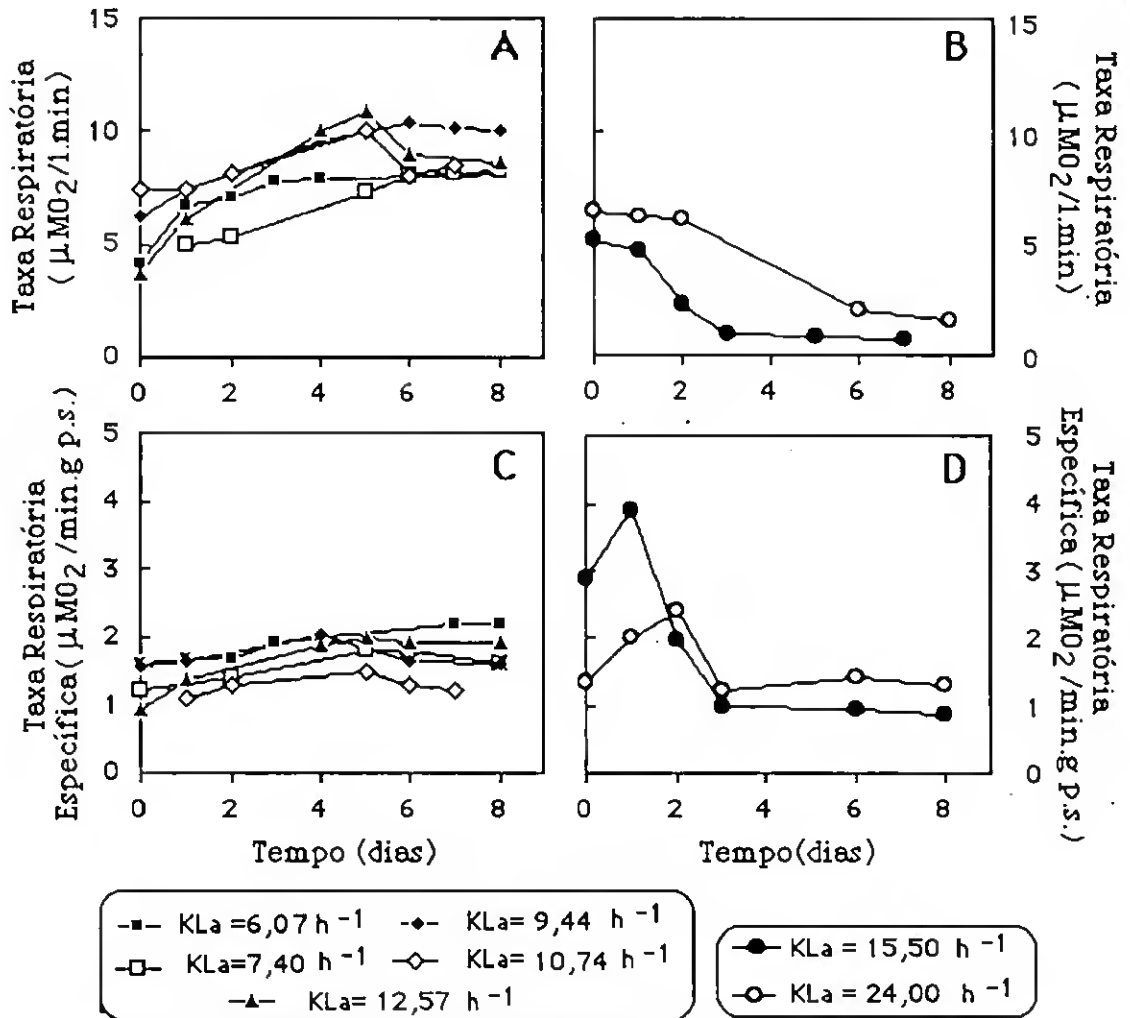


Fig.3.9. Perfil da variação da taxa respiratória (A,B) e da taxa respiratória específica (C,D) ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* para diferentes coeficientes iniciais de transferência de massa volumétrico de oxigênio $-k_L a-$.

Concomitantemente, não foi observado uma limitação na concentração em oxigênio dissolvido nas fermentações de culturas celulares de *C. cardunculus*, realizadas para $6 < K_L a < 12$, que manteve uma concentração acima dos 40% ao longo dos ciclos de crescimento.

Estes resultados são discordantes dos de Leckie e Scragg (1991), segundo os quais, o oxigênio em excesso estimularia o ciclo metabólico do ácido cítrico, conduzindo a um maior consumo em oxigênio. Estes autores fundamentaram-se em ensaios realizados com células em suspensão de *C. roseus*, em que obtiveram um maior consumo de oxigênio para fermentações efectuadas para $k_{La}=20 \text{ h}^{-1}$ do que em ensaios com $k_{La} = 2,5 \text{ h}^{-1}$. É de supôr no entanto, que para um tão reduzido coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio, o crescimento celular de *C. roseus* tenha sido limitado por uma deficiente oxigenação.

Tal como observado, em células em suspensão de *C. cardunculus*, o perfil da variação temporal da T.R. das células em suspensão de *Eschscholtzia californica* (Taticek *et al.* 1990) apresenta um patamar de valores a partir do 4º dia de fermentação. Pelo contrário, a mesma cultura celular mantida em "erlenmeyer", apresenta um declínio acentuado, a partir do 8º dia do ciclo de crescimento. Culturas em suspensão de células de *D. Deltoidea* e de *C. roseus* em fermentador de 30 l apresentaram uma taxa específica de consumo de oxigênio negativa durante todo o ciclo de crescimento (Drapeau *et al.* 1986). Células de *C. roseus*, cultivadas em "erlenmeyer", revelaram um aumento no consumo de oxigênio global ou específico, durante os primeiros 5 dias de crescimento, seguido de um acentuado decréscimo durante todo o restante período do ciclo de crescimento (Snape e Thomas, 1989). Em contrapartida, a cultura de células de morango em suspensão mantém uma taxa de consumo positiva ao longo de todo o crescimento (Hong *et al.* 1989).

A diversidade de comportamentos para as taxas respiratórias de culturas de células vegetais, não permite formular hipóteses explicativas, ficando de certo modo patente, a dependência existente entre a respiração, a espécie vegetal em causa e as condições de cultura.

No que concerne a crescimentos celulares de cardo estabelecidos para elevados k_{La} (15,5 e 24,0 h^{-1}), observou-se uma quebra acentuada

em ambas as taxas respiratórias, à exceção da taxa respiratória específica (Fig. 3.8.D), em que ocorreu um aumento no consumo de oxigênio durante os primeiros 2 dias, tal como referenciado para células de *C. roseus* em suspensão, cultivadas para $k_L a = 2,5 \text{ h}^{-1}$ e 20 h^{-1} (Leckie e Scragg, 1991). Paralelamente, a taxa específica de crescimento de células de *C. cardunculus* determinada para elevados coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio (12 h^{-1} - 24 h^{-1}) apresenta valores nulos ou negativos (Tabela 3.3).

Tabela 3.4. Comparação dos parâmetros respiratórios de células de *C. cardunculus*, com parâmetros publicados na literatura.

Espécie Vegetal	Biorreactor	Taxa Respiratória Máxima ($\mu\text{M O}_2/\text{min. l.}$)	Taxa Respiratória Específica Máxima ($\mu\text{M O}_2/\text{g P.S. min}$)	Referência
<i>C. cardunculus</i>	2 l Ferm.	10,0	2,00	Este trabalho
<i>N. tabacum</i>	30 l Ferm.	—	15,0	Kato e Nagai (1979)
<i>C. roseus</i>	33 l "Air-lift"	45,0	7,50	Bond <i>et al.</i> , (1988)
<i>C. roseus</i>	250ml Erlenm.	41,6	8,00	Snape e Thomas(1989)
<i>C. roseus</i>	4 l Ferm.	46,8	—	Pareilleux e Vinas (1983)
<i>F. vesca</i>	250 ml Erlenm.	22,0	2,80	Hong <i>et al.</i> , (1989)
<i>E. californica</i>	1 l "Air-lift"	46,7	9,30	Taticek <i>et al.</i> , (1990)
<i>E. californica</i>	250 ml Erlenm.	66,6	9,30	Taticek <i>et al.</i> , (1990)

Na Tabela 3.4., em que são comparados os parâmetros respiratórios máximos de diferentes espécies vegetais, as células em suspensão de *C. cardunculus* evidenciam a menor taxa respiratória global. O seu intervalo de variação ($4-10 \mu\text{M O}_2/\text{l.min}$) encontra-se contido no intervalo registado por Hong *et al.* (1989) para células de *Fragaria vesca* ($6,2-22 \mu\text{M O}_2/\text{l.min}$). De igual modo, a taxa respiratória específica relativa à suspensão celular de cardo apresenta o menor valor relativamente às outras espécies. É no entanto, semelhante, ao consumo de oxigênio por unidade de biomassa registado, para uma

3. "Stress" Hidrodinâmico

cultura *in vitro* de células de morango (Hong *et al.* 1989). Este comportamento reflecte a menor necessidade respiratória das células em suspensão de cardo, relativamente às outras espécies, o que pode estar associado ao crescimento obtido, para um baixo arejamento inicial (0.1 v.v.m.).

De uma maneira geral, é reconhecido que as condições de crescimento de células vegetais em biorreactor, decorrem do equilíbrio estabelecido entre um menor "stress" hidrodinâmico e uma oxigenação adequada. Neste contexto, torna-se necessário verificar a sensibilidade das células ao "stress" físico e as suas necessidades em oxigénio. No caso de *C. cardunculus*, a resposta negativa ao aumento de valores de $k_L a$ ($15,5 \text{ h}^{-1}$ - $24,0 \text{ h}^{-1}$) e a baixa taxa de consumo de oxigénio conduziram à selecção de parâmetros de agitação entre 30-100 r.p.m. e de arejamento igual a $100 \text{ cm}^3/\text{min}$. Curiosamente, células em suspensão de *C. roseus*, cultivadas em diferentes ambientes hidrodinâmicos, mostraram necessidades de consumo de oxigénio semelhantes entre si (Tabela 3.4.), evidenciando mais uma vez, um comportamento atípico.

Até à publicação dos trabalhos de Meijer (1989) e de Leckie *et al.* (1991), as células vegetais *in vitro* eram consideradas extremamente sensíveis à agitação. Segundo Pareilleux e Vinas (1983), 80 r.p.m. é a agitação adequada ao crescimento, Drapeau *et al.* (1986) utilizam uma velocidade entre 80-100 r.p.m. para células de *D. Deltoidea*, enquanto que para células de *Nicotiana tabacum* foi referido 150 r.p.m. (Kato *et al.* 1975).

Segundo Leckie *et al.* (1991), células de *C. roseus* desenvolveram paredes celulares resistentes ao "stress" hidrodinâmico, produzido por uma elevada agitação (150-300 r.p.m.) e um arejamento da ordem dos $1500\text{-}4000 \text{ cm}^3/\text{min}$. De igual modo, células em suspensão de *Nicotiana tabacum* mostraram-se insensíveis a elevado "stress" hidrodinâmico (Meijer, 1989), enquanto que células de *Chinchona robusta* e *Tabernaemontana divaricata* evidenciaram sensibilidade ao "stress" hidrodinâmico.

Com a finalidade, de complementar as observações relativas às taxas respiratórias e de crescimento, determinaram-se os rendimentos de biomassa em função do oxigênio consumido, para condições distintas de transferência de oxigênio na cultura celular de *C. cardunculus*.

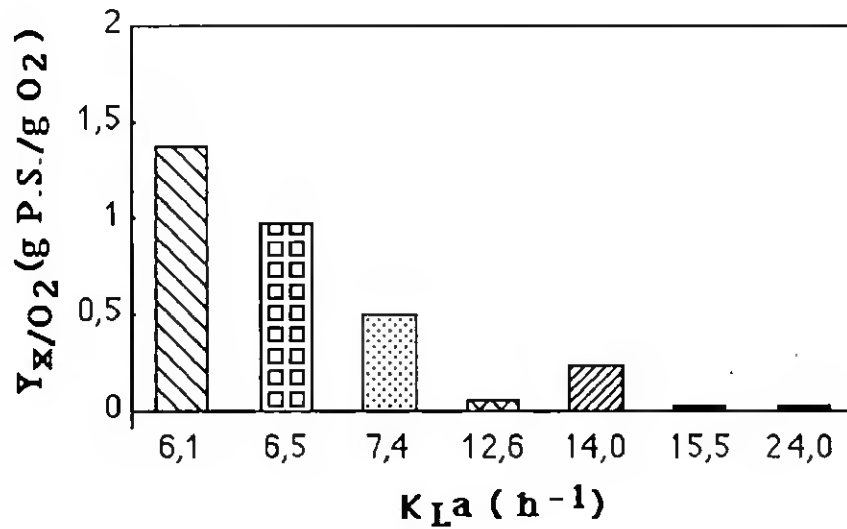


Fig. 3.10. Influência da transferência de massa volumétrica do oxigênio no rendimento de biomassa, determinado em função do oxigênio consumido em células em suspensão de *C. cardunculus*.

Constatou-se uma diminuição acentuada do rendimento de biomassa com o aumento de $k_L a$, para fermentações distintas de células de *C. cardunculus* (Fig. 3.10.), tornando-se nulo para $k_L a = 15 h^{-1}$ e $k_L a = 24 h^{-1}$. O valor mais elevado do rendimento obtido (1,37 gp.s./g O_2) coincide com a maior produtividade de biomassa em fermentador descontínuo (Tabela 3.3.). Tal rendimento de biomassa sugere, que a fonte de carbono foi usada primordialmente no crescimento celular e, em menor proporção, nos mecanismos de manutenção. Em células de *Daucus carota* foi referido um menor rendimento (0,84 gp.s./g O_2) para uma taxa específica de 0,28 dia $^{-1}$ (Wilson, 1987). Este autor não refere os valores dos parâmetros de transferência de massa utilizadas no ensaio. Contrariamente, Kato e Nagai (1979) calcularam

3. "Stress" Hidrodinâmico

em células de *Nicotiana tabacum* em suspensão, um rendimento de biomassa mais elevado (3,81 g/gO₂).

A comparação dos rendimentos de biomassa com as taxas respiratórias sugere, que as células em suspensão de *C. cardunculus*, sujeitas a elevado "stress" físico ($K_{La} > 14h^{-1}$), diminuem ou perdem, mesmo, a capacidade de respirarem, o que justifica a obtenção de uma taxa de crescimento nula ou negativa.

A influência da transferência de massa volumétrica do oxigénio sobre a diminuição no rendimento de biomassa em função de oxigénio, revela uma relação estreita entre o consumo de oxigénio total e o aumento de biomassa, como é proposto por Wilson *et al.* (1987). Assim, a medida do oxigénio consumido ou do dióxido de carbono produzido, poderão ser usados como uma estimativa do incremento em biomassa, com a vantagem de rigor, facilidade e rapidez na medição. No entanto, as restrições à aplicação deste método, enunciadas em 3.2., têm que ser avaliadas, pois podem falsear a relação linear entre produção de biomassa e o consumo global de oxigénio.

CAPÍTULO 4

Crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* em sistema descontínuo.

4.1. Metodologia e Objectivos

4.2. O Fósforo inorgânico e sua Função na Célula Vegetal

4.3. O Azoto e sua Função na Célula Vegetal

4.4. Resultados e Discussão

- 4.4.1. • Influência do fósforo inorgânico no crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* em "erlenmeyer".
 - 4.4.2. • Influência do fósforo inorgânico no crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* em fermentador descontínuo.
 - 4.4.3. • Influência do azoto inorgânico no crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* em "erlenmeyer".
 - 4.4.4. • Influência do azoto inorgânico no crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* em fermentador descontínuo.
 - 4.4.5. • Actividade proteolítica e produção fenólica, em fermentador descontínuo e em "erlenmeyer", de células em suspensão *C. cardunculus*.
-

4.1. METODOLOGIA e OBJECTIVOS

Foram realizados dois tipos de experiências em sistema descontínuo: balão "erlenmeyer" de 500 ml e fermentador de 2 l, com a finalidade de estudar a influência de nutrientes vitais ao crescimento celular e na actividade proteolítica de acordo com o diagrama representado na Figura 4.1.

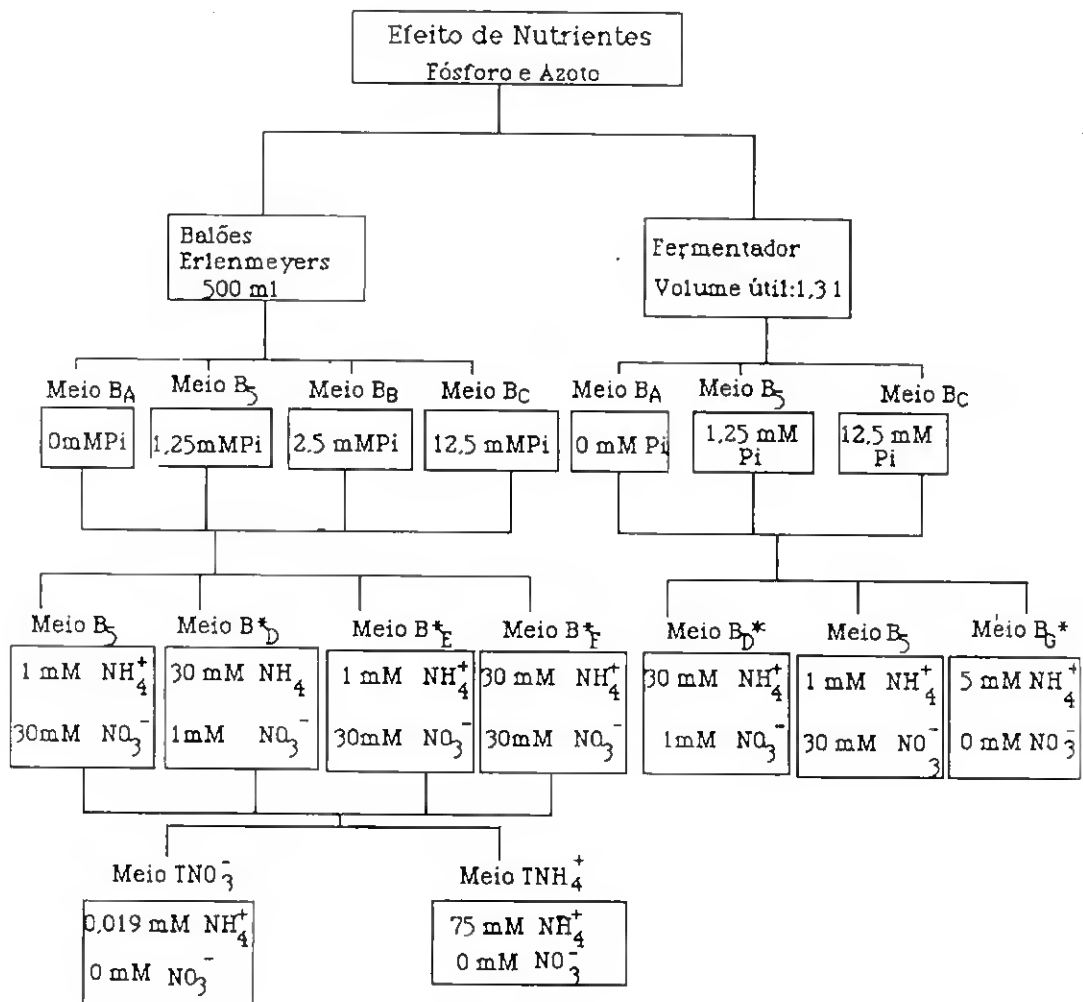


Fig 4.1. Esquema organizativo da experimentação. Meio B5 (Gamborg, 1968); Meio nutriente TNO_3^- (Behrend e Mateles, 1975); * Meio basal B5; ** Meio basal TNO_3^-

4. Crescimento em descontínuo

Foram testadas, em balão "erlenmeyer", quatro concentrações diferentes do macronutriente fosfato (0mM; 1,25mM; 2,50mM e 12,50mM P_i), quatro combinações de concentrações dos compostos azotados, tendo como base a constituição do meio Gamborg B₅ (Gamborg, 1968), de acordo com a Fig.4.1. Foram, igualmente, ensaiadas, duas variações da razão ponderal NO_3^-/NH_4^+ tendo como base o meio nutriente de Behrend e Mateles, 1975 (Fig. 4.1.). Para cada uma das situações referidas, o crescimento celular foi avaliado pelo incremento máximo em biomassa (n° células/ml, peso fresco, peso seco, proteína), pela taxa específica de crescimento $-\mu_g-$, produtividade e coeficientes de rendimento de biomassa. A razão ponderal peso fresco/peso seco, determinada ao longo do ciclo de crescimento, permitiu relacionar a volumetria celular com a fase de crescimento e com as condições nutricionais, designadamente em fósforo inorgânico e em azoto. Foram quantificadas a produção de fenóis, as actividades azocaseinolíticas e os consumos de fosfato, de nitrato e de amónio.

Em fermentador descontínuo, testou-se igualmente a influência da alteração da concentração em fósforo inorgânico e o efeito da variação da razão ponderal nitrato/amónio (Fig.4.1.). Para além dos parâmetros quantificados em "erlenmeyer", foram também estimados ao longo do ciclo de crescimento, a taxa respiratória e o pH.

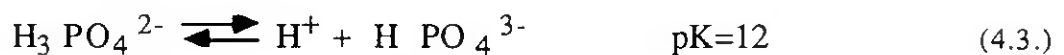
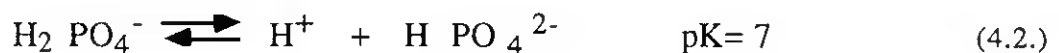
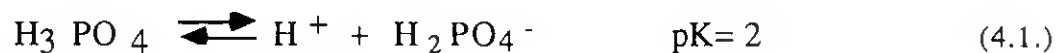
Os estudos realizados em "erlenmeyer" apresentam a vantagem da multiplicidade e rapidez na obtenção de informação experimental. No entanto, apenas os ensaios realizados em fermentador permitem controlar e quantificar a transferência de oxigénio para as células, medir *in loco* o consumo de oxigénio das células, otimizar o pH e a temperatura processuais.

Os ensaios em "erlenmeyer" foram realizados em triplicado e utilizou-se um inóculo homogéneo. As fermentações foram repetidas pelo menos duas vezes e os parâmetros de crescimento foram obtidos através de médias aritméticas dos diferentes resultados

experimentais, como descrito em 3.1. A colheita das amostras da suspensão celular foi realizada de 2 em 2 dias, em condições assépticas, quer em "erlenmeyer" quer em fermentador.

4.2. O FÓSFORO INORGÂNICO E SUA FUNÇÃO NA CÉLULA VEGETAL

A espécie química fosfato (PO_4^{3-}) existe em equilíbrio químico com os aniões fosfatados mono e di-hidrogenados, de acordo com os seguintes equilíbrios químicos:



Como na célula viva o pH se localiza próximo de 7,0 (pH fisiológico), apenas poderá ter existência biológica o segundo equilíbrio, mistura das espécies químicas: H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} , que referiremos ao longo deste estudo como fósforo inorgânico -Pi -.

O fósforo inorgânico é um dos nutrientes que mais influencia o crescimento e o metabolismo das plantas. Sob a forma de fosfato, constitui uma das principais fontes de fósforo para o metabolismo vegetal, tendo sido largamente investigada a sua função na planta "*in vivo*". A sua abordagem através do modelo da célula vegetal cultivada "*in vitro*", permite a diminuição das variáveis equacionadas pelo metabolismo e ambiente celular.

É um constituinte essencial de numerosas moléculas biológicas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, glúcidos fosfatados, proteínas e

4. Crescimento em descontínuo

nucleótidos. Actua como regulador da glicólise, respiração, fotossíntese e metabolismo do amido. No entanto, a sua principal função é desempenhada na transferência energética no ciclo $ATP \rightleftharpoons ADP$ (Fig.4.2.).

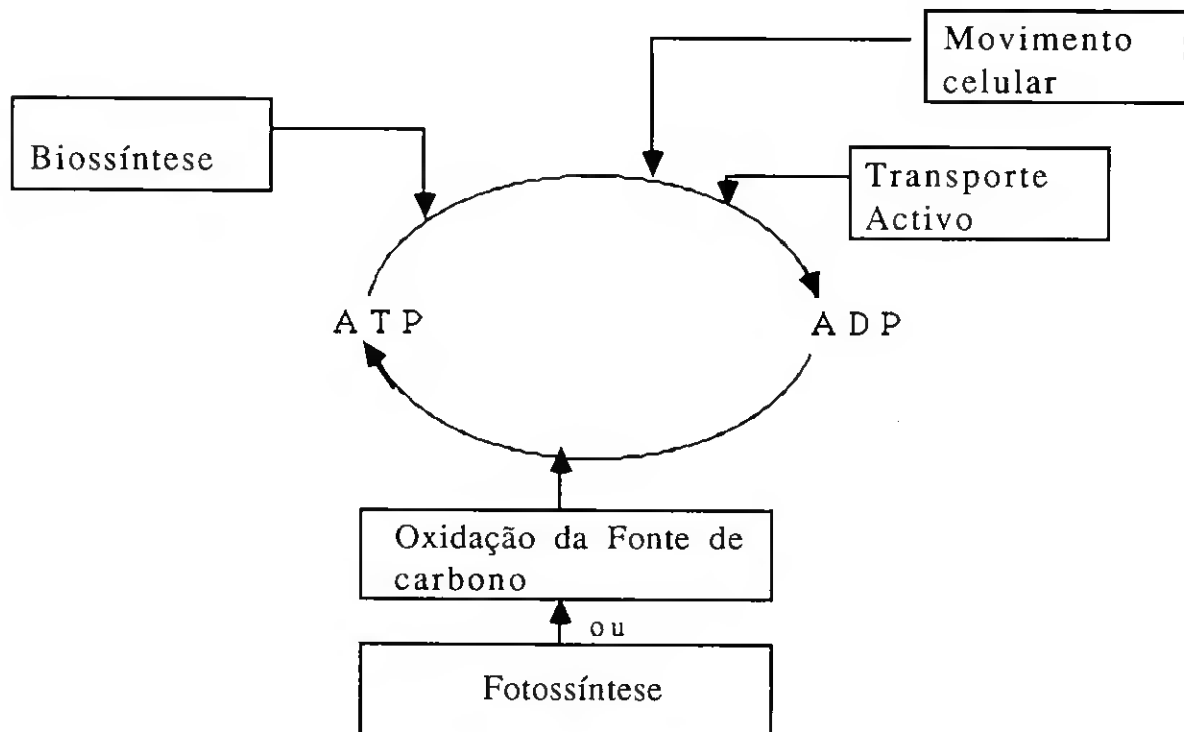
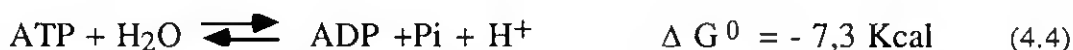


Fig.4.2. Ciclo metabólico do fósforo inorgânico na célula vegetal.

Ashihara e Tokoro (1984) evidenciaram em células em suspensão de *Catharanthus roseus*, que 45% do fósforo assimilado é incorporado em moléculas de ácidos nucleicos, 30% em fosfolípidos, 5-10% em nucleólidos e menos do que 3% em glúcidos fosfatados e proteínas. Segundo Bielecki e Ferguson (1983), o fósforo localiza-se em vacúolos (85-95%) ou no citoplasma e seus organelos (5-10%). Em meio nutriente fosfatado, a concentração em fósforo no citoplasma atinge um patamar ao fim de algumas horas, aumentando constantemente no interior do vacúolo. Num meio de crescimento deficiente em fósforo, verifica-se que a concentração de

Pi no citoplasma se mantém regularmente constante, enquanto que o nível do fósforo vacuolar diminui (Rebeille *et al.* 1982). O vacúolo funciona assim, como uma reserva celular em fósforo.

O transporte do fósforo inorgânico para o citoplasma é realizado por gradientes protônicos através do plasmalema (Sakano, 1990). Em células em suspensão de *C. roseus* a estequiometria do gradiente é de quatro prótons para um íon monofosfatado H_2PO_4^- (Sakano, 1990). Este, é rapidamente estereificado no citoplasma, originando o nucleótido adenosina trifosfato (ATP). A sua importante **função metabólica** de transferência de energia nas células vivas é cumprida através da hidrólise da molécula de ATP, de acordo com as equações químicas (4.4) e (4.5). Após a quebra da ligação fosfatada e formação da molécula de adenosina difosfato (ADP) ou de adenosina monofosfato (AMP), o fósforo inorgânico é armazenado no vacúolo.



A **função estrutural** do fósforo tem lugar na biossíntese dos fosfolípidos, dos ácidos nucleicos e dos glúcidos fosfatados.

Neste breve sinopse do fósforo inorgânico e sua função na célula vegetal cultivada *in vitro*, consideraremos também a sua **função supressora** do metabolismo secundário. É um dos aspectos que mais tem sido investigado em células vegetais em suspensão, quer por razões de produção de metabolitos secundários, quer como modelo cinético. Knockblock e Berlin (1983) observaram uma rápida acumulação de alcalóides indólicos, de triptamina e de fenóis, em células em suspensão de *Catharanthus roseus* transferidas para meio nutriente sem fosfato. Balagué e Wilson (1982) referiram, também, a síntese de alcalóides em células de *C. roseus*, quando a concentração do meio nutriente se tornava limitante em fósforo. Em células em suspensão de *Coffea arabica*, a produção de cafeína

diminui para elevadas concentrações de fosfato no meio nutriente (Bramble e Graves, 1991).

4.3. O AZOTO E SUA FUNÇÃO NA CÉLULA VEGETAL

A cultura de células vegetais *in vitro* processa-se geralmente, em meio nutriente contendo nitrato ou uma mistura balanceada de amónia e nitrato, como fonte de azoto.

Desde os trabalhos realizados por Tulecke e Nickell (1956) e por Street (1966), que foi evidenciado a não viabilidade das culturas de células vegetais em meio nutriente com sais de amónia como única fonte de azoto. Nestas condições, a cultura apenas é possível se o meio tiver sido suplementado com nitrato ou glutamina (Gamborg *et al.* 1966). Este efeito inibitório da amónia, foi também referido no crescimento de células em suspensão de rosa (Jordan e Fletcher, 1980). Todavia, o crescimento da cultura de células da rosa Paul's Scarlet em meio nutriente com nitrato, foi estimulado pela presença de amónia em pequenas concentrações, na proporção nitrato/amónio igual a 26,4. Neste caso, a concentração proteica era duas vezes mais elevada, do que a das células cultivadas em meio contendo apenas nitrato (Mohanty e Fletcher 1978, 1980).

A cultura de células em suspensão de soja foi obtida, com sucesso, em meio com sais de amónia, como única fonte de azoto, quando em presença de ácidos orgânicos constituintes do ciclo de Krebs -citrato, malato, succinato- (Gamborg, 1970). Rose e Martin (1975) referiram igualmente a influência da natureza da fonte de azoto no crescimento de células de *Ipomea sp.* mantidas em meio com iões nitrato e amónio na proporção de 3,97. Segundo estes autores, o fornecimento contínuo de amónio ao meio nutriente aumenta o período de crescimento exponencial e o incremento das espécies

químicas azotadas no interior das células, desde que a fonte de carbono não se encontre em concentrações limitantes. Se o cátion amônio decresce até um nível de concentração limitante para o crescimento celular, obtém-se uma diminuição dos compostos azotados acumulados, mesmo na presença do ião nitrato no meio nutriente.

Estudos em células em suspensão de *Atropa belladonna*, cultivadas em meio nutriente com nitrato e amônia na proporção de 3:1, revelaram que a amônia é preferencialmente transportada para o interior da célula (Salonen e Simola, 1989).

A adição de amônia ou de amino-ácidos (prolina e ornitina) ao meio de crescimento com nitrato, favoreceu a actividade da enzima nitrato redutase assim como o crescimento celular (Salonen e Simola, 1989). Contudo, o crescimento celular é inibido, se a fonte de azoto for apenas constituída por amino-ácidos (Salonen e Simola, 1989). Behrend e Mateles (1975) verificaram um efeito inibitório de amino-ácidos no crescimento de células de *Nicotiana tabacum*, mantidas em meio nutriente suplementado com nitrato ou com ureia. O amino-ácido treonina é o que apresenta maior acção inibitória, enquanto que a arginina suprime qualquer inibição causada por outros amino-ácidos.

Células em suspensão de *Acer pseudoplatanus* cultivadas em sistema contínuo (King, 1976), quando em presença de ureia, como única fonte de azoto, revelaram maior eficiência na síntese proteica.

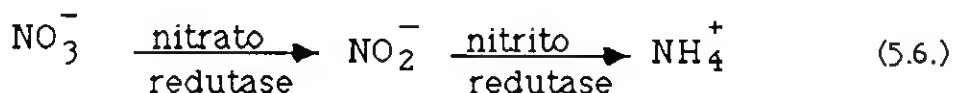
Os meios nutrientes contendo apenas azoto inorgânico apresentam uma baixa capacidade tamponizadora, o que, segundo Veliky e Rose (1973), poderá sobrepôr-se ao efeito da razão ponderal $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ existente no meio nutriente. O ião nitrato adicionado ao meio em baixa concentração (8,8 mM) produz variações de pH entre 3,8 e 4,5 durante o crescimento celular. Se o nitrato for adicionado ao meio em elevada concentração (88 mM) originará durante o crescimento, valores próximos de pH=7. Utilizando uma mistura de nitrato e

4. Crescimento em descontínuo

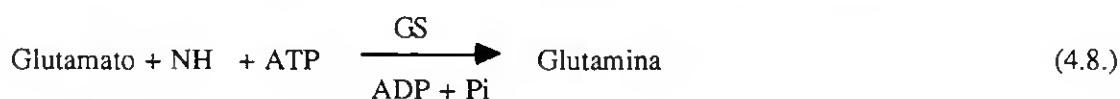
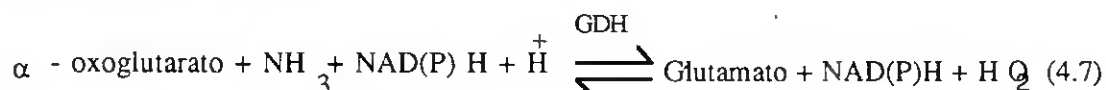
amónia como fonte de azoto, obtêm-se valores de pH entre 4,5 e 5,5 (Veliky e Rose, 1973).

Células de *Ipomoea purpurea* foram cultivadas, com sucesso, em meio nutriente com sais de amónio como única fonte de azoto e com controlo de pH para evitar uma excessiva acidificação do meio (Martin, 1977). Estes autores sugerem, igualmente, que a utilização duma mistura de nitrato e amónia nos meios nutrientes propicia a manutenção do pH dentro dos limites fisiológicos.

Os estudos realizados por diferentes bioquímicos e fisiologistas durante os últimos 20 anos, são particularmente importantes para explicar a função do azoto no metabolismo da célula vegetal. Com base nestes estudos, é actualmente reconhecido o papel primordial desempenhado pelo nitrato, na nutrição vegetal. Todavia, este radical é apenas assimilado após ser reduzido por acção das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase à forma de ião amónio:



Era igualmente aceite, a aminação da molécula de α -oxoglutarato por acção da enzima glutamato desidrogenase -GDH- como a única via possível para a assimilação da amónia pela célula vegetal (equação 5.7). Mifflin e Lea (1976) referem, no entanto, outra via metabólica alternativa: a aminação do glutamato catalisada pela glutamina sintetase -GS-, associada à subsequente formação do glutamato pela acção enzimática da glutamato sintetase -GOGAT- (equações 5.7 e 5.8) .



De acordo com os mesmos autores, a metabolização da amónia ocorre geralmente através da combinação da via GS e GOGAT, ou através da via metabólica única GDH, se o ião amónio se encontra em excesso (Fig. 4.3.). A adição do catião amónio ao meio nutriente, aumenta a actividade da GDH (Kanamori *et al.* 1972) e da GOGAT (Mohanty e Fletcher, 1980), mas reduz a actividade da GS (Bishop *et al.* 1976 ; Mohanty e Fletcher 1980). De acordo com estes autores, o ião amónio representa um factor determinante na selecção da via metabólica dos compostos azotados, pela variação da razão ponderal enzimática GDH/GS, o que justifica a importância da amónia no crescimento celular (Mohanty e Fletcher, 1980). As actividades enzimáticas da glutamina sintetase -GS- e da glutamato desidrogenase -GDH-, determinadas em extracto de cultura de células de rosa, são mais elevadas do que a taxa de transformação do azoto em amino-ácido e em proteína, sugerindo que as enzimas referidas não são limitantes do processo de assimilação do azoto (Mohanty e Fletcher, 1980). Segundo os mesmos autores, a enzima glutamato sintetase -GOGAT- possui uma actividade mínima em células jovens e participa na síntese proteica, o que os levou a propor que:

- Durante a fase inicial de crescimento celular, a via GDH seria dominante em detrimento das vias GS/GOGAT, que apenas se tornariam determinantes na fase de crescimento exponencial.
- A amónia presente no meio nutriente favorece a taxa de crescimento das células de rosa porque aumenta a actividade da enzima GOGAT, que por sua vez, promove a assimilação do azoto e da síntese proteica.

Rho e André (1991) consideraram diversas fases de crescimento celular em células de *Catharanthus roseus*, com base na proporção entre os compostos de carbono e os compostos azotados existentes intracelularmente (C/N).

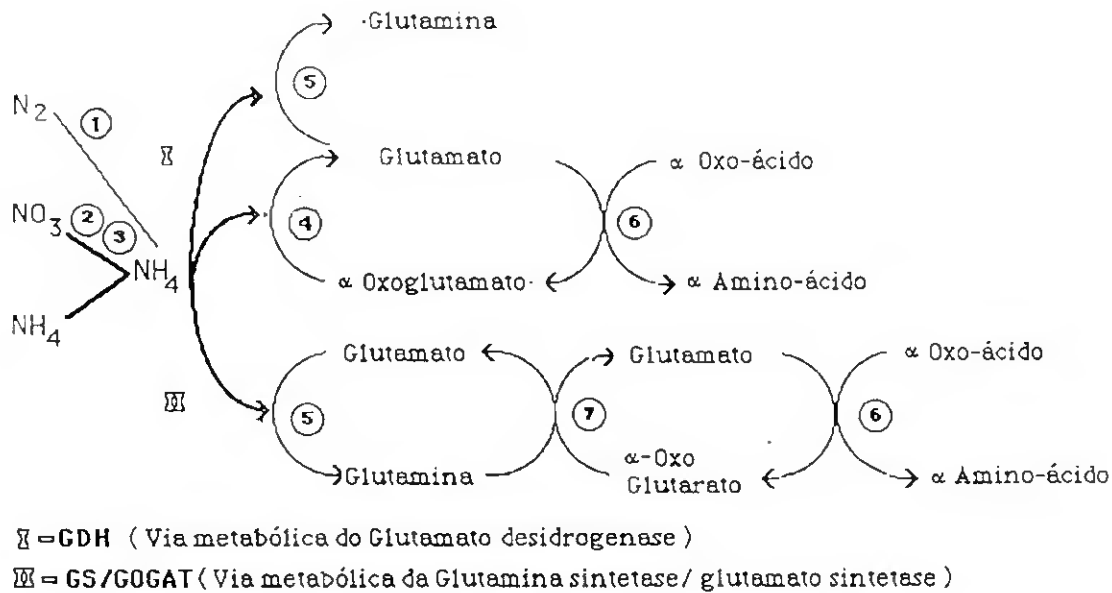


Fig.4.3. Representação esquemática das vias metabólicas alternativas de assimilação de azoto (adaptado de Mifflin e Lea, 1976). 1- Nitrogenase; 2- Nitrato redutase; 3- Nitrito redutase; 4- Glutamato desidrogenase; 5- Glutamina sintetase; 6- Transaminase; 7- Glutamato sintetase.

Uma fase de **crescimento activo** em que o quociente C/N é constante, correspondendo ao transporte quer de compostos azotados quer de hidratos de carbono, uma **fase de acumulação** em que apenas são transportados os glúcidos e o quociente C/N aumenta ao longo do tempo e, por fim, uma fase de declínio das reservas intracelulares com uma diminuição da razão ponderal C/N. Os mesmos autores questionam a clássica classificação das fases de crescimento celular, latência, exponencial e estacionária com base apenas nos valores de biomassa, visto não reflectir as variações da composição celular.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Influência do fósforo inorgânico no crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* em "erlenmeyer".

Como referido em 4.1., o crescimento e metabolismo de células em suspensão de *Cynara cardunculus* foram estudados na perspectiva da influência do macronutriente, fósforo inorgânico -Pi- em sistema descontínuo.

O aumento da concentração em fósforo inorgânico extracelular (1,25mM-2,50mM) não influenciou significativamente os parâmetros de crescimento das células em suspensão de *Cynara cardunculus* (Tabela 4.1. e Fig. 4.4.) As taxas específicas de crescimento (0,55 e 0,59 dia⁻¹), as produtividades de biomassa (0.46 e 0.45 g p.s./l.dia) e a relação ponderal peso fresco/peso seco apresentaram valores semelhantes em ambas as situações. Apenas o valor do rendimento de biomassa, calculado em função do fosfato consumido, apresenta um valor menor para a concentração 2,50 mM Pi (Tabela 4.1). Do mesmo molde, o aumento da concentração de Pi de 1,05 mM para 2,10 mM não influenciou a taxa específica de crescimento celular de culturas de células em suspensão de batateira (Gérard *et al.* 1991). Nesta cultura celular, pode verificar-se uma diminuição no rendimento de biomassa calculado em função do fósforo consumido (47,6-75,6 gp.s./gPi, valores calculados a partir dos dados numéricos publicados pelos autores), tal como acontece na cultura celular de *C. cardunculus*. Tal como verificado para os rendimentos de biomassa estimados para a cultura celular de cardo (Tabela 4.1.), as células em suspensão de *Daucus carota* mantidas em sistema semi-contínuo, apresentam valores entre 100 e 287 g p.s./g Pi (Dougall e Weyrauch, 1980).

4. Crescimento em descontínuo

Tabela 4.1. Parâmetros de crescimento de células de *Cynara cardunculus* mantidas em diferentes concentrações de fosfato em "erlenmeyer". B_A - 0mM; B_S - 1,25 mM; B_B - 2,50 mM; B_C - 12,5 mM.

[PO ₄ ³⁻] (mM)	Concentração celular inicial (Nº cel.10 ⁴ /ml)	µg (dia ⁻¹)	t _d (h)	Produtividade de Biomassa (g p.s./l.dia)	Y _{x/p} (g/g)	P.F/P.S.	
						Inicial	Final
0	7,7	0,27	61,6	0,17	-	37,8	81,3
1,25	8,4	0,55	30,2	0,46	277	37,3	75,7
2,50	6,1	0,59	28,2	0,45	144	37,8	75,9
12,5	6,0	0,58	28,7	0,83	123	38,0	72,8

Y_{x/p}- Rendimento de biomassa expresso em função do fosfato consumido (g p.s./gP_i).

Os valores dos tempos de duplicação/taxas específicas de crescimento enquadram-se dentro dos valores das taxas de crescimento referidas para cultura de células vegetais. Segundo Figueiredo *et al.* (1987), a maioria das culturas em suspensão de células vegetais apresentam tempos de duplicação entre 40 e 60 h e as taxas de crescimento mais rápidas localizam-se entre 15h e 35h. A cultura celular de *Catharanthus roseus* apresenta valores da taxa específica de crescimento entre 0,23 dia⁻¹ (Hegarthy *et al.* 1986) e 0,68 dia⁻¹ (Courtois e Guern, 1980), enquanto que nas células de *Nicotiana tabacum*, a taxa específica varia entre 0,67 dia⁻¹ (Kato *et al.* 1972) e 0,96 dia⁻¹ (Kato *et al.* 1977). Os valores citados para a taxa específica de crescimento referem-se a resultados obtidos em "erlenmeyer". A variabilidade encontrada da taxa específica de crescimento, evidencia a sua acentuada dependência das condições ambientais de cultura da suspensão celular e da espécie vegetal em causa.

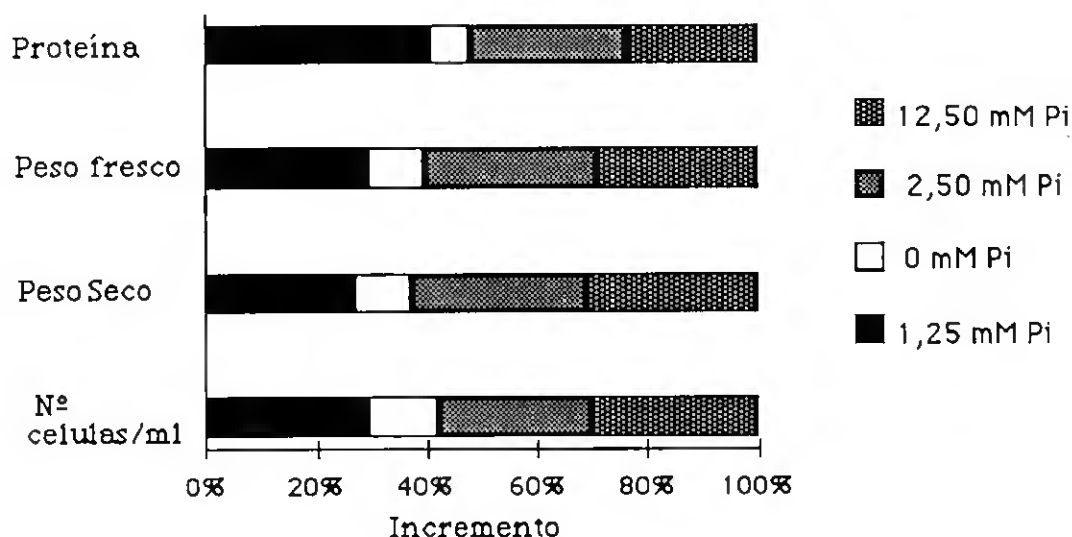


Fig. 4.4. Variação do incremento máximo dos parâmetros de crescimento ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* para diferentes concentrações de fosfato no meio nutriente B₅ em "erlenmeyer".

As culturas *in vitro* de *Cynara cardunculus*, cultivadas em meio nutriente com 12,5 mM P_i, apresentaram um acréscimo na produtividade de biomassa (Tabela 4.1.), sem, no entanto, se observar um aumento no incremento em biomassa (Fig.4.4.), tal como referido para células de *Papaver somniferum*, cultivadas em "erlenmeyer" (Curtis *et al.* 1991).

Assinale-se, que em células em suspensão de cardo, o quociente ponderal peso fresco/peso seco (Tabela 4.1.) aumentou ao longo do ciclo de crescimento celular, para as quatro situações testadas, B₅, B_A, B_B, B_C, o que reflecte a maior dimensão celular de *C. cardunculus* na fase estacionária do crescimento, independentemente do teor em fósforo inorgânico. Todavia, no final da fase estacionária, a viabilidade celular das células de cardo cultivadas na ausência do fosfato, foi apenas de 55%, enquanto que nas situações restantes foi de 80%. Viabilidades semelhantes foram referidas por Castro e Miranda (1992) em células de *C. roseus* cultivadas em "erlenmeyer"

4. Crescimento em descontínuo

(50% para 0 mM P_i e 75% e 85% para concentrações de fosfato de 1,25 mM e 2,50 mM, respectivamente).

Retomando os valores obtidos para a relação ponderal P.F./P.S., referidos no capítulo 3 (Tabela 3.3.), pode considerar-se que um elevado "stress" hidrodinâmico exerce uma maior influência na dimensão da célula do que o esgotamento nutricional (Tabela 4.1.)

Da análise da Tabela 4.1., Figs. 4.4 e 4.5. decorre, que a ausência de fósforo extracelular no meio de crescimento das células de cardo diminuiu acentuadamente o crescimento celular. A taxa específica de crescimento ($\mu_g=0,27 \text{ dia}^{-1}$) e a produtividade de biomassa apresentaram um valor reduzido (0,17 g p.s./l.dia), como expectável. No entanto, o crescimento celular não foi totalmente inibido e a viabilidade celular não foi afectada (80-85%), sugerindo a utilização de fosfato vacuolar na divisão celular, em situação de deficiência em fósforo (Rebeille *et al.* 1982). Similarmente, o crescimento de células de batateira cultivadas em "erlenmeyer", em meio nutriente sem fosfato, não demonstrou inibição total do crescimento, mas, apresentou uma menor taxa específica de crescimento ($0,23 \text{ dia}^{-1}$), mantendo níveis idênticos de viabilidade celular (80-90%) (Gérard *et al.* 1991).

Em cultura de células de batateira, o aumento na concentração de P_i no meio nutriente de 1,05 mM para 2,10 mM, não influencia a taxa específica de crescimento (Gérard *et al.* 1991), tal como verificámos para a suspensão celular de cardo.

A suspensão celular de *C. cardunculus* em "erlenmeyer", em presença de P_i (1,25 mM e 2,50 mM) apresentou um crescimento exponencial até ao 12º dia e linear após esse dia (Fig.4.5 B_5 e B_B). O início da fase linear, em ambos os casos, coincide com o esgotamento do fósforo do meio extracelular (8 e 12 dias, respectivamente para os meios B_5 e B_B), sugerindo, que o transporte de fosfato para o interior da célula ocorre durante a fase de latência, sendo consumido durante a fase exponencial.

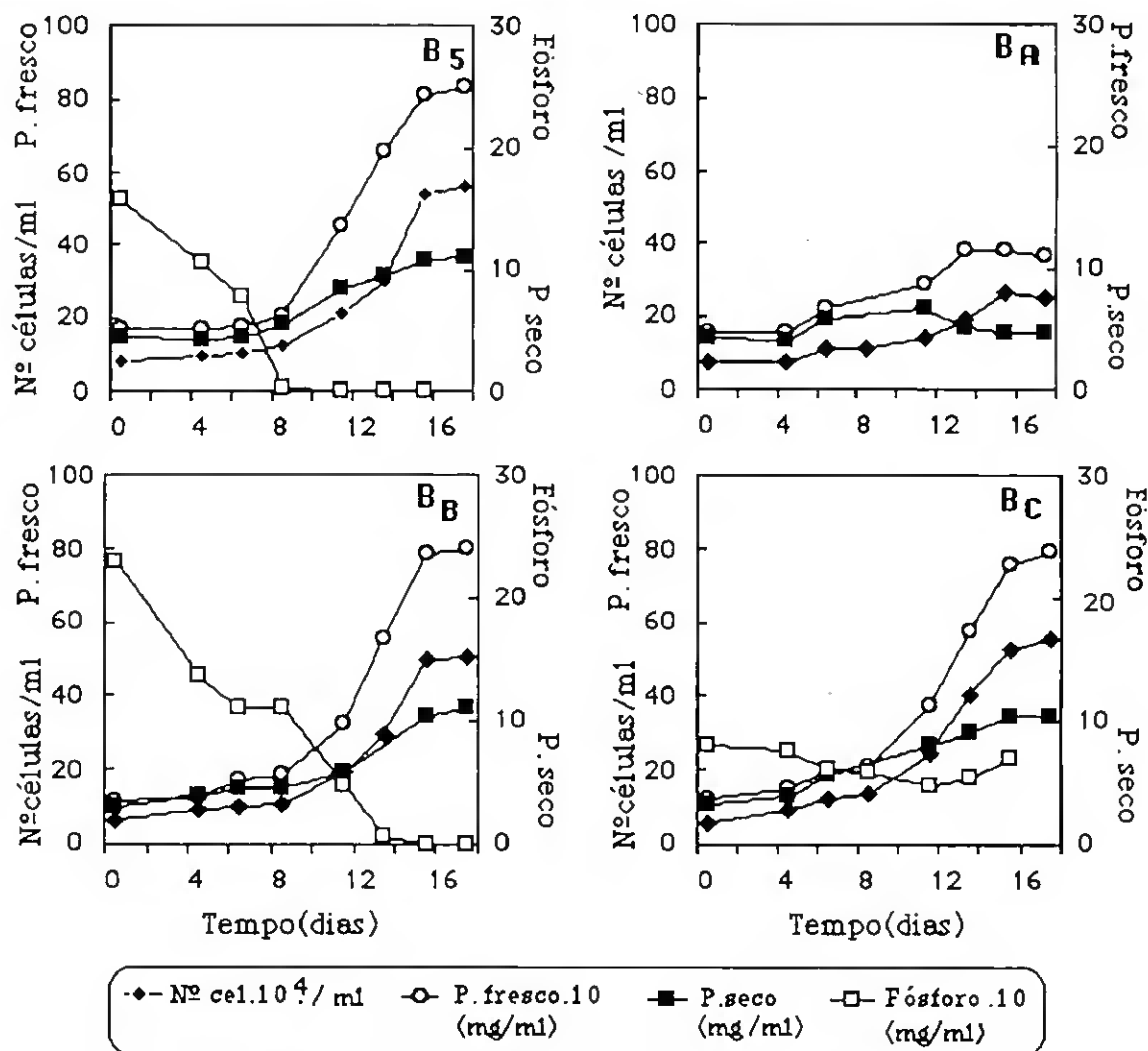


Fig.4.5. Perfil do crescimento da suspensão celular de *Cynara cardunculus* em "erlenmeyer" e consumo de fósforo inorgânico para diferentes concentrações de fosfato inicial no meio nutriente. B₅ (Gamborg,1968)- 1,25 mM P_i; B_A- 0 mM P_i; B_B- 2,50 mM P_i; B_C- 12,50 mM P_i.

Células em suspensão de *N. tabacum*, cultivadas em "erlenmeyer", iniciaram a divisão celular após o transporte total do fósforo para o interior da célula durante a fase de latência (Knoblock *et al.* 1981), o que está em concordância com os resultados obtidos com as células em suspensão de *Cynara cardunculus*.

Para a concentração de 12,5 mM P_i (Fig. 4.5-B_C), o crescimento celular de *Cynara cardunculus* configura uma exponencial, indicando um

excesso de fósforo, o que é confirmado pela curva de consumo de fosfato, em que não se verifica a depleção deste nutriente inorgânico. Nos últimos dias da fase estacionária de crescimento, o fosfato é acumulado extracelularmente, o que pode ser um indicativo de lise celular, com subsequente libertação de fósforo para o meio extracelular. Análises químicas, não evasivas, de Ressonância Magnética Nuclear -RMN-, permitiram a avaliação comparativa da concentração de fósforo vacuolar, em células em suspensão de cardo, mantidas em concentrações distintas de fósforo inorgânico. As células mantidas em meio nutriente suplementado com 12,5 mM P_i apresentavam, no final da fase estacionária do crescimento, um teor em fósforo inorgânico cerca de 5 vezes mais elevado do que as células cultivadas em meio nutriente com 1,25 mM P_i .

Os resultados obtidos sugerem, que o fósforo intracelular, armazenado em vacúolos, quando em concentração limitante (1,25 mM, 2,5 mM P_i), produz um efeito de linearidade no crescimento da suspensão celular de cardo. Van Gulik *et al.* (1992) obtiveram igualmente, em células de *C. roseus*, cultivadas em fermentador (sacarose 3%), um crescimento exponencial na 1ª parte da curva e linear na 2ª parte, para uma concentração de fósforo idêntica (1,25 mM P_i). Para meio de cultura com 6,25 mM P_i , os mesmos autores referiram um crescimento exponencial causado por um excesso de fósforo.

4.4.2. Influência do fósforo inorgânico no crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* em fermentador descontínuo.

As células em suspensão de cardo cultivadas em reactor, em meio basal B₅ e na ausência de P_i apresentaram inibição total do

crescimento $-\mu_g=0$ (Tabela 4.2). Todavia, foi observado um aumento da taxa respiratória durante os primeiros 5 dias de crescimento, atingindo $2,50 \mu\text{moles}/\text{min}$, o que sugere a utilização do fósforo inorgânico vacuolar na manutenção celular, contrariamente ao observado em "erlenmeyer", em que as células apresentaram um crescimento reduzido ($\mu_g=0,27 \text{ dia}^{-1}$).

Tabela 4.2. Parâmetros de crescimento de *C. cardunculus* em fermentador descontínuo, para diferentes concentrações de fósforo.

B_A - 0mM; B_S - 1,25 mM; B_C - 12,5 mM.

[PO_4^{3-}] Concentração celular inicial (mM)	μ_g ($\text{N}^\circ \text{ cel.} \cdot 10^4/\text{ml}$)	td (dia^{-1})	Produtividade de Biomassa (g p.s./l.dia)		$Y_{x/P}$ (g/g)	Taxa Respiratória Máxima ($\mu\text{moles O}_2/\text{l. min}$)
0,00	6,1	0,00	-	-	-	2,50
1,25	1,4	0,53	31,4	0,61	261	5,12
12,5	4,8	0,60	27,7	0,58	129	6,30

$Y_{x/P}$ - Rendimento de biomassa, expresso em função do fósforo consumido (g p.s./g P_i).

O inóculo utilizado nos ensaios em fermentador descontínuo é menor do que o utilizado nos ensaios em "erlenmeyer", o que pode justificar a ausência total de crescimento em condições de "stress" nutricional em biorreactor, visto que o desenvolvimento da cultura de células de *Cynara cardunculus*, não ocorre para valores de densidade celular inicial inferior a 10^4 células/ml (Lima Costa, 1988).

Similarmente, células em suspensão de *Catharanthus roseus*, mantidas em meio Murashige e Skoog, não apresentaram aumento do número de células/ml e de peso fresco, quando utilizado um inóculo reduzido 10%(v/v) em meio deficiente em fósforo, (Ukaji e Ashihara, 1986).

Em células em suspensão de *C. cardunculus*, a taxa respiratória mais elevada, foi observada para 12,5 mM P_i (Tabela 4.2.) no 9º dia de

4. Crescimento em descontínuo

crescimento ($6,30 \mu\text{moles O}_2/\text{min}$), correspondendo ao maior incremento em biomassa (Fig.4.6.).

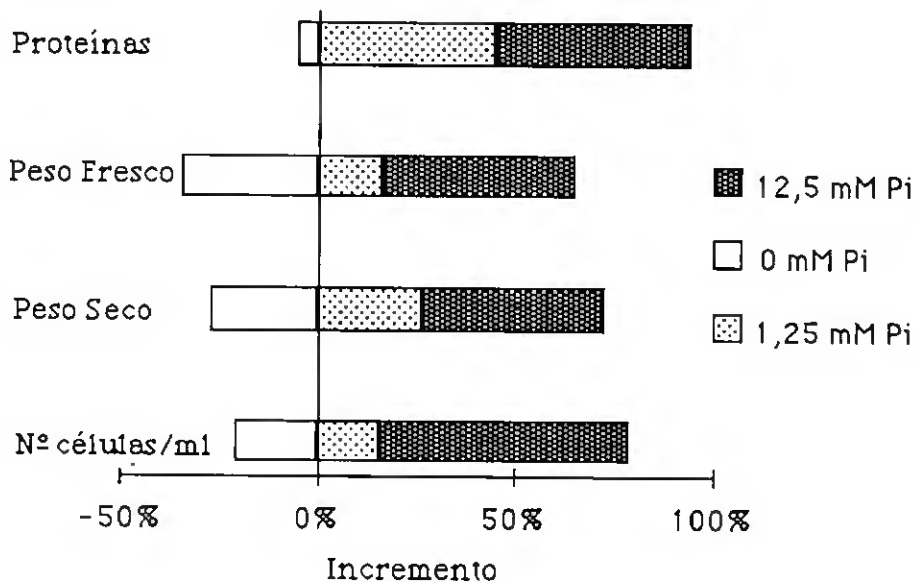


Fig. 4.6. Variação do incremento máximo dos parâmetros de crescimento ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* para diferentes concentrações de fosfato no meio nutriente B₅, em fermentador descontínuo.

Constatou-se igualmente, que o aumento do teor em fosfato inorgânico (1,25-12,5mM) influenciou positivamente a produção de biomassa, contrariamente ao registado em "erlenmeyer" (Fig.4.6.). Em células de *C. roseus* cultivadas em fermentador de 3l, foi igualmente referido por Van Gulik *et al.* (1992), um incremento no consumo de oxigénio ($100-133 \mu\text{MO}_2/\text{l.min}$), para maiores concentrações de fosfato (1,25-6,25 mM Pi). O método experimental utilizado por estes autores para estimar o consumo de oxigénio baseou-se num balanço de massas e não em determinações de oxigénio dissolvido na suspensão celular tal como utilizado para as células de cardo, pelo que, os valores não são comparáveis.

Da análise da Fig. 4.7, decorre que o aumento de biomassa de *C. cardunculus* configura uma curva em exponencial (B_5 e B_C), excepto para o meio nutriente sem fosfato (B_A), o que está em concordância com os resultados obtidos em "erlenmeyer". Como referimos anteriormente, a exponencialidade da curva de crescimento, é indicativo que o elemento fósforo não se encontra em concentração limitante, durante aquela fase do crescimento celular.

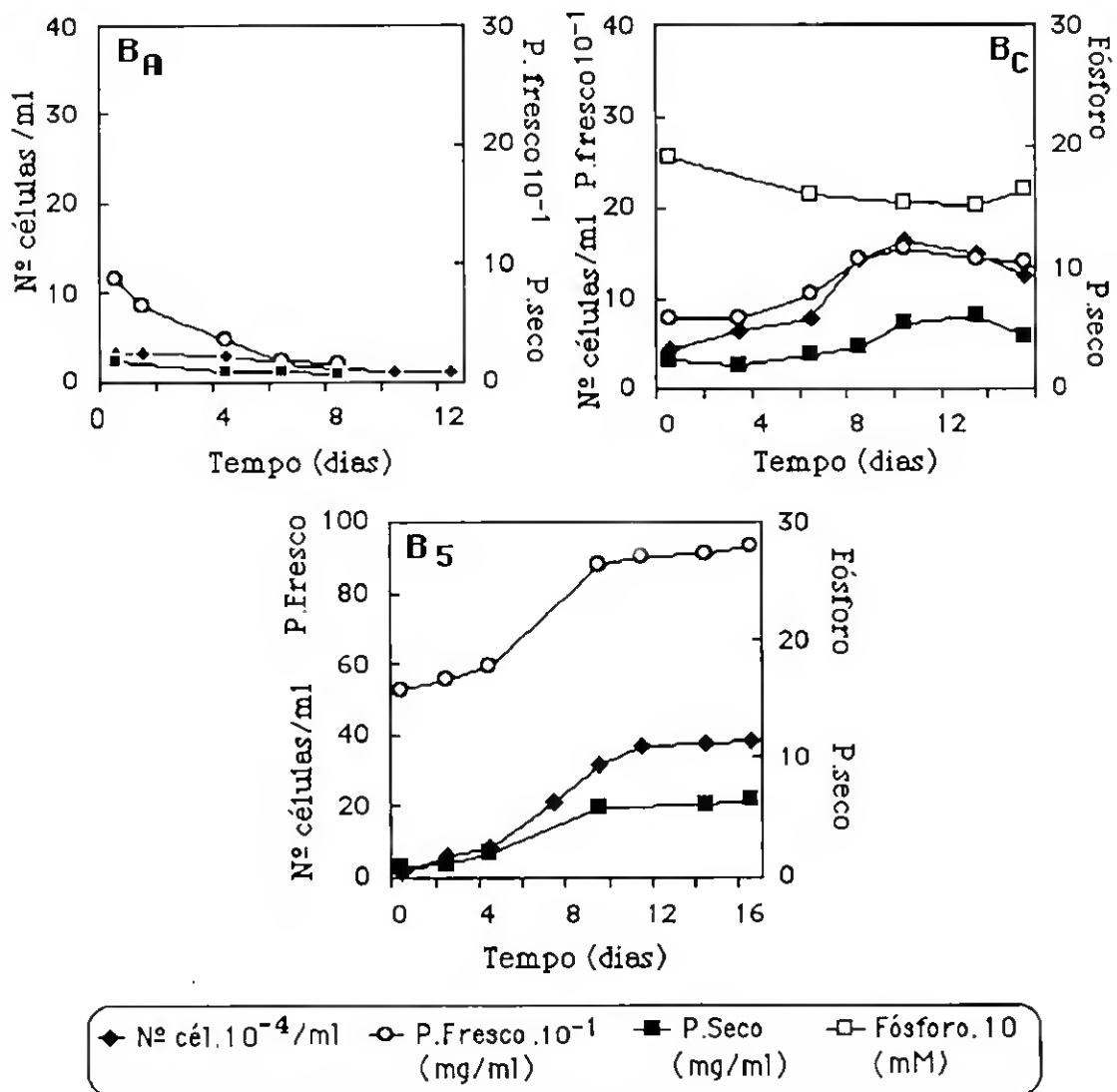


Fig.4.7. Perfil do crescimento da suspensão celular de *Cynara cardunculus* e consumo de fósforo inorgânico para diferentes concentrações de fosfato inicial nos meios nutrientes B_5 (Gamborg,1968)- 1,25 mM P_i ; B_A - 0 mM P_i e B_C - 12,50 mM P_i , em fermentador descontínuo.

4. Crescimento em descontínuo

Realce-se uma vez mais, que o anião fosfato foi acumulado, a partir do 14º dia de fermentação de células de cardo, no meio B_C com 12,5 mM Pi (Fig. 4.7), tal como observado em "erlenmeyer" (Fig.4.5.). Simultaneamente, a viabilidade celular diminuiu (50%), o que permite supor a ocorrência de lise celular, muito provavelmente responsável pela libertação de nutrientes para o meio extracelular. Em meio nutriente B₅ o fósforo inorgânico extracelular foi esgotado ao fim de oito dias, tal como observado em "erlenmeyer" (Fig.4.5.)

A fase de latência não é evidente no crescimento celular em fermentador (Fig.4.7), contrariamente ao observado em "erlenmeyer", em que esta fase do crescimento atingiu cerca de 6 dias. A maior capacidade de transferência de oxigénio num sistema arejado e agitado, e, conseqüentemente, a maior disponibilidade de oxigénio, pode explicar a rápida iniciação da oxidação fosforilada com a conseqüente libertação da energia necessária à divisão celular. Em conformidade, Ukaji *et al.* (1986) observaram uma produção imediata de ATP em células em suspensão de *C. roseus* após serem inoculadas em meio fosfatado e Shimazaki *et al.* (1982) verificaram que durante o 1º dia após a inoculação, o conteúdo em ATP em células *Vinca rosea* aumentava de cerca de 10 vezes.

Os resultados obtidos em fermentador descontínuo sugerem, que a reduzida fase de latência do crescimento de células de *C. cardunculus*, em presença de 1,25 mM ou 12,5 mM P_i, pode estar directamente relacionada com o aumento do catabolismo dos açúcares e com a maior acessibilidade do oxigénio, o que poderá induzir a produção imediata de ATP e de compostos fosforilados essenciais ao metabolismo da fase exponencial de crescimento, devido ao seu elevado conteúdo em energia potencial química.

4.4.3. Influência do azoto inorgânico no crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* em "erlenmeyer"

Como referimos no ponto 4.1, a influência da composição do macronutriente azoto inorgânico foi estudada tendo em conta, o metabolismo e o crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* em sistema descontínuo, quer em fermentador quer em "erlenmeyer".

Tabela 4.3. Parâmetros de crescimento de *Cynara cardunculus* em "erlenmeyer", para diferentes concentrações da fonte de azoto no meio nutriente B₅ (Gamborg,1968) e meio TNO₃⁻(Behrend e Mateles,1975).

[NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺]		Concentração celular inicial	μg	t _d	Produtividade Biomassa	Y _x /N	P.F./P.S.	
(mM)		N ^o cel.10 ⁴ /ml (dia-1)	(h)	(gp.s./l.dia)	(g/g)	Inicial	Final	
Meio B₅								
30/1	B ₅	15,6.	0,53	31,4	0,57	19,57	36,9	55,0
1/30	B _D	15,4.	0,24	69,3	0,13	10,21	35,9	39,0
1/1	B _E	15,5	0,33	50,4	0,30	307,1	39,8	50,7
30/30	B _F	14,7	0,25	48,9	0,12	6,320	34,4	34,3
Meio TNO₃⁻								
0/0,019	TNO ₃ ⁻	15,2	0,26	63,9	0,24	—	38,6	44,1
0/75	TNH ₄ ⁺	14,7	0,21	79,2	0,12	12,14	29,7	26,4

Verifica-se pela análise da Figura 4.8. e da Tabela 4.3, que o maior aumento de biomassa, a taxa específica de crescimento mais elevada e a maior produtividade de biomassa da suspensão celular de *C.*

4. Crescimento em descontinuo

ções nitrato e amónia é igual a 30. Resultados idênticos foram referidos para o aumento em peso seco de células em suspensão de *Achillea millefolium* (Figueiredo, 1992). Segundo Mohanty e Fletcher (1980), o crescimento óptimo de células de roseira, foi analogamente obtido para um quociente de 26,4 entre as concentrações de nitrato e amónia presentes no meio nutriente. Em contrapartida, a presença de elevada concentração do ião amónio (30 mM), quer na proporção nitrato/amónio de 30/1 ou 30/30 no meio basal B₅, inibiu o crescimento celular (Tabela 4.3, Figs:4.8 e 4.9.).

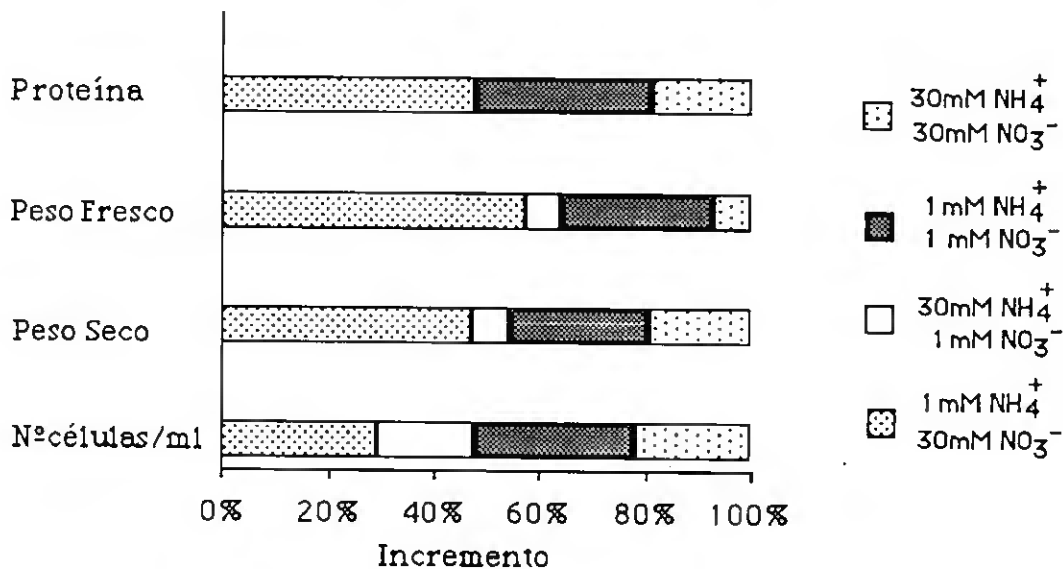


Fig.4.8. Variação do incremento máximo dos parâmetros de crescimento ao longo do ciclo de crescimento da suspensão celular de *C. cardunculus* para diferentes concentrações da fonte de azoto do meio basal B₅, em "erlenmeyer".

Idêntica inibição foi observada no crescimento celular em meio basal TNO₃⁻ para concentrações do ião amónio 19 μM (TNO₃⁻) ou 75 mM (TNH₄⁺) (Tabela 4.3.). As células de cardo, apresentaram em ambas as situações, baixa taxa específica de crescimento e baixa produtividade de biomassa.

Estes resultados apoiam a hipótese, de que os efeitos adversos do catião amónio não dependem da quantidade de ião nitrato presente.

Contudo, o reduzido crescimento em meio TNO_3^- , contendo apenas $19 \mu\text{M}$ de amónio é, muito provavelmente, uma consequência da reduzida concentração em azoto. Quando o amónio está presente em elevada concentração (75 mM), o reduzido crescimento pode dever-se à função inibitória do amónio na catálise enzimática da via metabólica do azoto, tal como foi referido em 4.3, ou à diminuição do pH do meio (Lips *et al.* 1987). A adição do catião amónio ao meio de crescimento reduz a actividade da glutamina sintetase (Mohanty e Fletcher, 1980), inibindo a principal via de assimilação do azoto. É hoje reconhecido, que o amónio adicionado em elevadas concentrações, inibe o transporte electrónico através do ciclo metabólico do ácido cítrico, limitando a síntese dos ácidos cetónicos necessários à síntese de amino-ácidos e transaminação. Todavia, a amónia quando presente em pequenas quantidades no meio nutriente ($7,5 \text{ mM}$), pode activar a nitrato redutase, como foi referenciado para cultura de células de *Atropa belladonna* (Salonen e Simola, 1989). Do mesmo modo, a adição de amónia em quantidades reduzidas (2 mM) ao anião nitrato (20 mM), estimula a nitrato redutase em folhas de *C. roseus* (Loyola-Vargas *et al.* 1986). Estes resultados são pertinentes, na tentativa de justificação da melhor resposta de crescimento celular encontrada para o meio nutricional B₅, em que o catião amónio está presente na proporção de 1 mM para 30 mM de ião nitrato (Fig. 4.8).

O estudo realizado por Filner (1966) sobre a regulação da nitrato redutase, em células em suspensão de *Nicotiana tabacum*, revelou que esta enzima é regulada, quer pelo substrato nitrato, quer pelos produtos finais da assimilação do azoto (amino-ácidos), o que está de acordo com o modelo cinético de Michaelis-Menten.

O valor do rendimento de biomassa em função do azoto consumido, para a razão ponderal nitrato/amónio de 30 (Tabela 4.3.), é similar ao valor referido por Rho e André (1991) para uma suspensão celular de *Catharanthus roseus* ($17,4 \text{ g/g}$) em que a concentração do nitrato é de 24 mM . Segundo Kato *et al.* 1977, o valor do rendimento

4. Crescimento em descontínuo

de biomassa calculado em função do azoto consumido, varia com a espécie vegetal e com as condições de cultura celular e pode apresentar valores entre 6,6 g/g e 23 g/g em células em suspensão de *Nicotiana tabacum*.

A eficiência relativa de produção de biomassa no meio B_E relativamente ao meio B₅ foi evidenciada pelo elevado rendimento, em função do azoto consumido (307,1 g/g), determinada para aquele meio. Contudo, esta situação foi acompanhada de um acentuado decréscimo na síntese proteica (Fig.4.10.-B_E), o que pode ser atribuído à utilização do azoto proteico na produção de biomassa.

A análise comparativa da razão ponderal peso fresco/peso seco, na fase inicial e final de crescimento (Tabela 4.3.) revelou um maior acréscimo, quando as células de cardo em suspensão mostraram uma melhor aptidão para a produção de biomassa (meios B₅ e B_E), o que evidencia uma maior dimensão celular na fase estacionária, provavelmente devido a uma maior retenção de água vacuolar, tal como observado para o nutriente fósforo. Em situação de "stress" nutricional ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+=1/30$ e $30/30$), as células no estado final de crescimento apresentaram uma menor dimensão, o que está de acordo com os resultados do estudo do "stress" hidrodinâmico na cultura celular de cardo (capítulo 3).

A exponencialidade no crescimento da suspensão celular de *C. cardunculus*, em meio B₅, foi de novo verificada até ao 12º dia do ciclo de crescimento (Fig.4.9 B₅), tal como registado neste capítulo, no estudo sobre a influência do fósforo inorgânico em células em suspensão de cardo. Ao invés, no meio de cultura B_D, foi observado um reduzido crescimento celular (Fig.4.9.,Tabela 4.3.), o que está em concordância com os resultados registados na Tabela 4.3. e pode ser interpretado como resultado da inibição pelo catião amónio. A exaustão deste ião em meio B₅, ocorreu ao fim dos primeiros oito dias do ciclo de crescimento e foi preferencialmente metabolizado

relativamente ao anião nitrato (Fig.4.9.), sendo este totalmente consumido no 12º dia do crescimento.

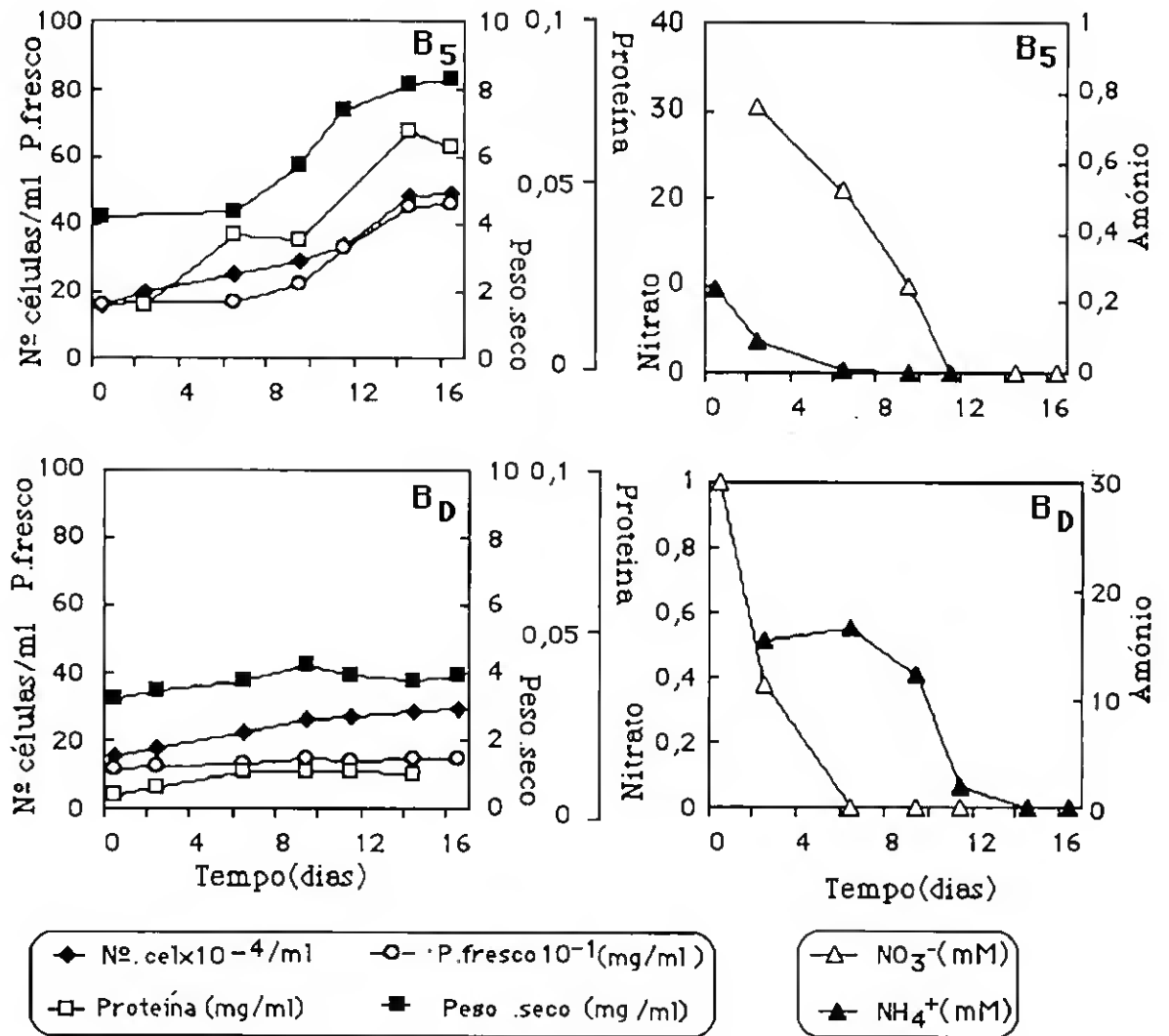


Fig.4.9. Perfil do crescimento da suspensão celular de *Cynara cardunculus* e consumo de azoto para diferentes concentrações da fonte de azoto no meio nutriente B₅ (Gamborg,1968)- 1 mM NH₄⁺, 30 mM NO₃⁻; B_D- 30 mM NH₄⁺, 1mM NO₃⁻, em "erlenmeyer".

4. Crescimento em descontínuo

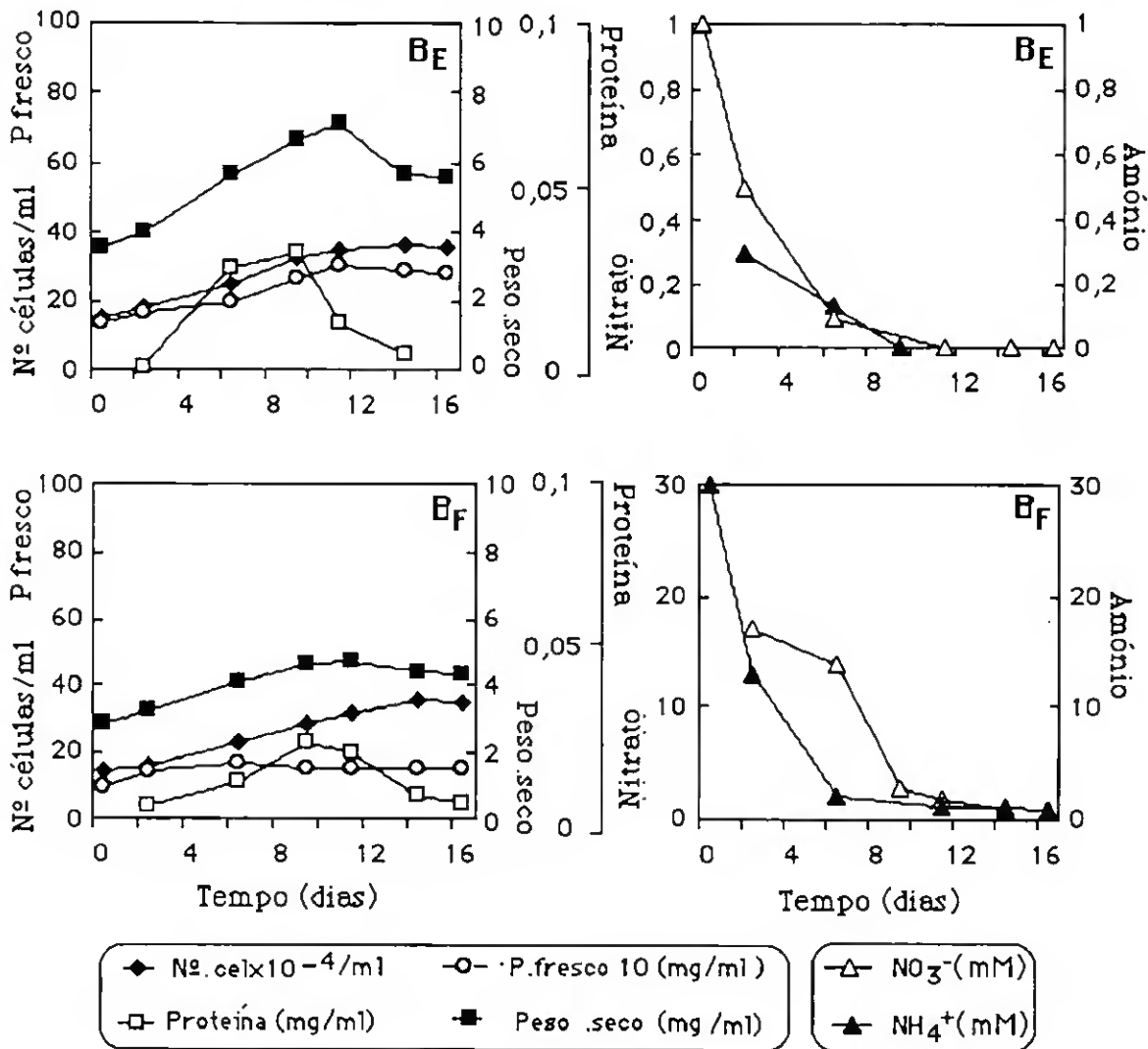


Fig.4.10.Perfil do crescimento da suspensão celular de *Cynara cardunculus* e consumo de azoto para diferentes concentrações da fonte de azoto no meio nutriente **B_E**- 1 mM NH₄⁺, 1 mM NO₃⁻; **B_F**- 30 mM NH₄⁺, 30 mM NO₃⁻ em "erlenmeyer".

O nitrato foi detectável no meio nutriente **B_F** durante a fase estacionária do crescimento da cultura celular de *C. cardunculus*, verificando-se a linearidade no crescimento celular até cerca do 10^o dia, (Fig.4.10. **B_F**), o que vem atestar, que a inibição do crescimento não foi consequência da concentração limitante da fonte de azoto, mas, muito provavelmente, pode dever-se à inativação da glutamina sintetase, enzima da via metabólica da assimilação do

azoto GS/GOGAT. Este resultado apoia a hipótese de que esta, seria a via metabólica fundamental de assimilação de azoto na cultura de células de *C. cardunculus*, o que, no entanto, carece de ser provado. Contrariamente, no meio B_E (Fig.4.10), a concentração de azoto decresce acentuadamente até ao 6^o dia de crescimento, observando-se, igualmente, uma configuração linear no crescimento. Neste caso, a concentração em nitrato e amónio no meio de cultura é reduzida, o que pode causar limitação nutricional e, subseqüentemente, a não exponencialidade do crescimento. Nestas circunstâncias, não é possível distinguir, por simples análise da configuração do perfil do crescimento, entre a situação em que a concentração da fonte de azoto do meio de cultura é limitante do crescimento, ou em que o azoto não é metabolizado devido a efeitos metabólicos inibitórios da assimilação deste nutriente.

4.4.4. Influência do azoto inorgânico no crescimento de *C. cardunculus* em fermentador descontínuo.

Tal como nos ensaios realizados em "erlenmeyer", foi observado o efeito inibitório do ião amónio na produção de biomassa de células em suspensão de cardo, quando presente em concentração elevada, (Tabela 4.4., Fig.4.11. e Fig. 4.12.).

Tabela 4.4. Parâmetro de crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* em fermentador descontínuo, para diferentes concentrações da fonte de azoto no meio basal B₅.

[NO ⁻³ /NH ⁺⁴] Concentração celular inicial		µg	t _d	Produtividade de Biomassa	Y _{x/N}	Taxa Respiratória Máxima	
(mM)	N ^o cel.10 ⁴ /ml	(dia ⁻¹)	(h)	(g.p.s./l.dia)	(g/g)	(µmole O ₂ /min)	
1/30	B _D	4,47	0,20	83,20	0,34	11,32	3,25
30/1	B ₅	1,40	0,53	31,40	0,61	20,20	5,12
0/5	B _G	10,0	0,09	184,8	0,12	5,900	2,38

4. Crescimento em descontínuo

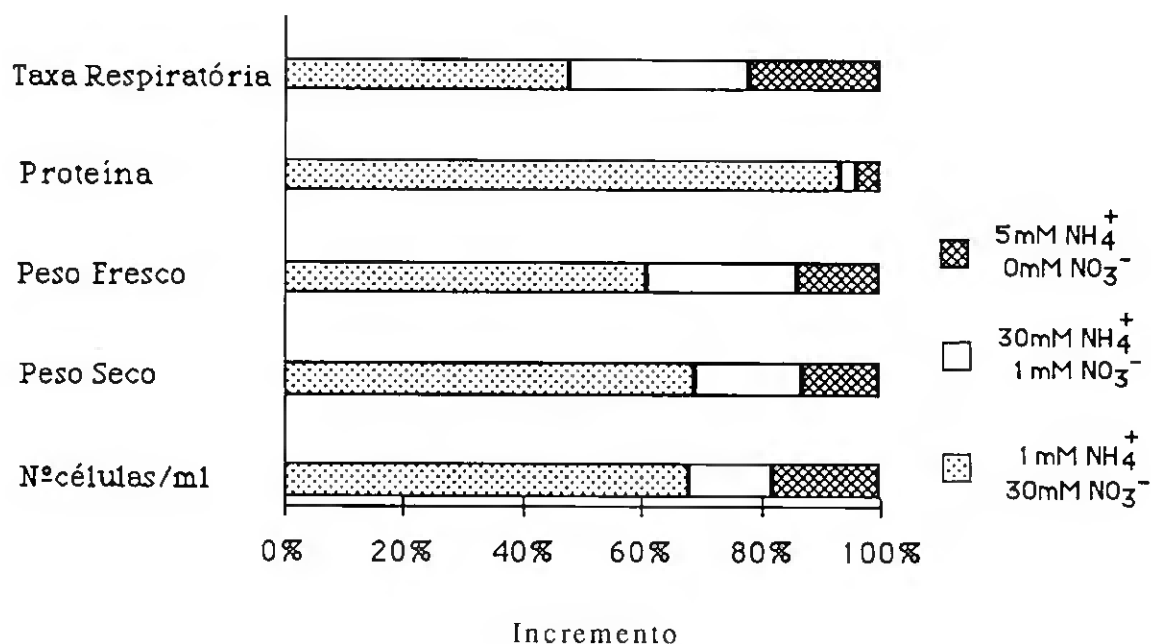


Fig.4.11. Variação do incremento máximo dos parâmetros de crescimento ao longo do ciclo de crescimento da suspensão celular de *Cynara cardunculus* para diferentes concentrações da fonte de azoto do meio basal B₅, em fermentador descontínuo.

Este efeito traduziu-se numa menor taxa específica de crescimento, menor incremento nos parâmetros quantificadores da biomassa, menor rendimento e menores produtividade biomássicas. Por outro lado, a presença deste catião em baixa concentração (1 mM) produziu um efeito benéfico no crescimento, tal como verificado no crescimento da suspensão celular em meio B₅ (Fig. 4.11 e Fig.4.12.). Esta acção positiva do amónio, foi igualmente observada no crescimento de células em suspensão de cardo em "erlenmeyer", anteriormente descrita.

Os parâmetros de crescimento (Tabela 4.4.) são semelhantes aos determinados em "erlenmeyer", para os meios B₅ e B_D, respectivamente. A taxa respiratória mais elevada foi determinada para o meio B₅, o que sugere, neste caso, uma maior activação do ciclo metabólico do ácido cítrico.

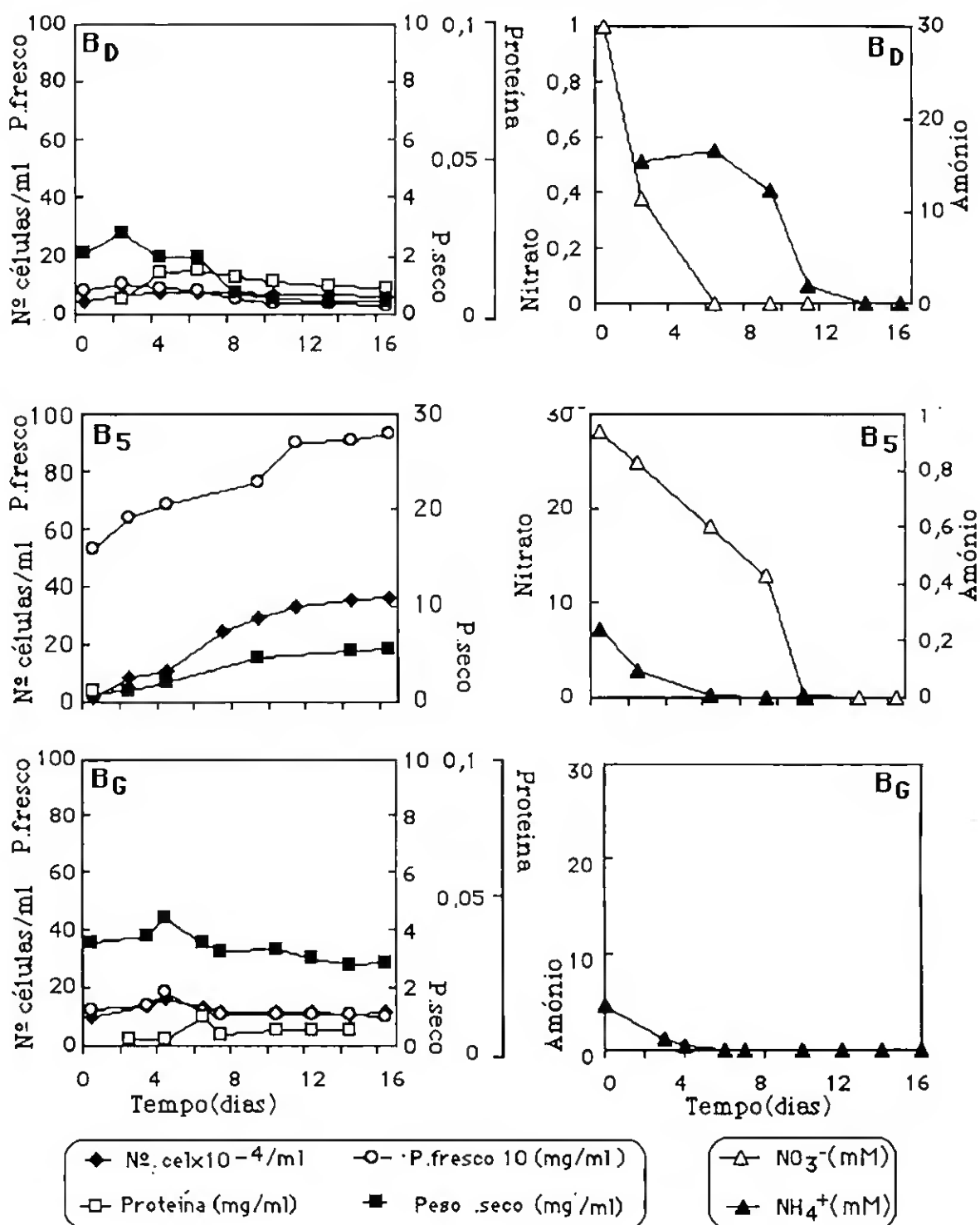


Fig.4.12. Perfil do crescimento da suspensão celular de *Cynara cardunculus* e consumo de azoto para diferentes concentrações da fonte de azoto no meio nutriente em fermentador descontínuo. B₅ (Gamborg,1968)- 1 mM NH₄⁺, 30 mM NO₃⁻; B_D- 30 mM NH₄⁺, 1mM NO₃⁻; B_G- 5 mM NH₄⁺

4. Crescimento em descontínuo

Da análise da Tabela 4.4. e Figuras 4.11. e 4.12. decorre, ainda, que a fermentação realizada em meio B₅, suplementado com apenas 5 mM de ião amónio (B_G), apresenta reduzido crescimento celular, comparável em termos de produtividade de biomassa, com o obtido em meio B₅ com elevada concentração em amónio (30 mM), em "erlenmeyer" e idêntico à produtividade determinada em "erlenmeyer" no meio nutriente TNH₄⁺ (Tabela 4.3.). A influência negativa do amónio no crescimento celular, é sugerida novamente por estes resultados, independentemente do meio nutriente utilizado. Contudo, foi constatado, em fermentador, um menor incremento nos parâmetros medidores de biomassa no meio B_G (5mM NH₄), do que no meio B_D (Fig.4.11.), o que pode dever-se à concentração limitante da fonte azoto que se esgota ao fim do 4º dia do ciclo de crescimento no meio B_G, com o subsequente decréscimo em biomassa (Fig. 4.11) e aumento na letalidade das células (40% de viabilidade no 10º dia do ciclo). Simultâneamente, a diminuta produção proteica observada no meio nutriente B_G, pode ficar a dever-se à utilização das proteínas como fonte de azoto.

À semelhança dos resultados obtidos no meio nutriente B₅ em "erlenmeyer" (Fig.4.9.), o ião amónio foi preferencialmente consumido relativamente ao ião nitrato em meio B₅ (Fig. 4.12.). Zink (1982) sugere, que a nitrato redutase é inibida na presença da amónia. Segundo este autor, em células de *Ipomea sp.*, o nitrato apenas foi consumido após o esgotamento da amónia, coincidindo com a indução da nitrato redutase. Pelo contrário, em células de cardo mantidas em meio B₅, embora o amónio seja consumido antes do nitrato, o decréscimo deste catião no meio nutriente decorre desde o momento da inoculação. Da mesma forma, durante o ciclo de crescimento no meio B_D (30 mM NH₄⁺ e 1 mM NO₃⁻), o nitrato é consumido ao fim do 6º dia de crescimento, enquanto que a concentração em amónio continua a decrescer até ao final da fase estacionária de crescimento. Tal facto, permite constatar mais uma vez, que em células em suspensão de cardo não se verifica uma inibição da nitrato redutase na presença da espécie química amónio, mesmo quando em concentração elevada.

O consumo preferencial do amónio, relativamente ao ião nitrato, em células vegetais cultivadas *in vitro*, é referido por diversos autores (Kirby *et al.* 1987, Jordan e Fletcher, 1980, Figueiredo, 1992). A depleção do ião nitrato previamente ao ião amónio no meio B_D, pode dever-se à reduzida quantidade deste ião no meio de cultura, tal como ocorreu em "erlenmeyer". Contudo, é reconhecido que a metabolização do amónio em células vegetais é, em princípio, feita com um menor gasto energético do que a do nitrato, o que poderia ser um factor estimulante do crescimento.

4.4.5. Actividade proteolítica e produção fenólica em fermentador descontínuo e em "erlenmeyer" de células em suspensão de *Cynara cardunculus*.

A actividade proteolítica específica extracelular foi quantificada para células em suspensão de cardo mantidas em meio B₅ Gamborg, na presença de fosfato 1,25 mM, 2,50 mM e 12,5 mM. Na ausência de fósforo inorgânico as células de cardo apresentaram actividade proteolítica específica nula, quer em "erlenmeyer" (Fig.4.13.A), quer em fermentador (Fig. 4.14.A). A duplicação da concentração em fosfato relativamente à concentração existente no meio B₅ (1,25 mM) influenciou positivamente a actividade azocaseinolítica específica da suspensão celular durante o período inicial de 11 dias (Fig.4.13A) Contudo, o aumento da concentração em fosfato de 2,5mM para 12,5mM P_i não alterou significativamente a taxa de proteólise (Fig.4.13A). Em contraste, células em suspensão de *Catharanthus roseus* apresentam valores elevados de actividade proteolítica específica (endopeptidase) na ausência de fosfato, ocorrendo, em simultâneo, degradação proteica das referidas células, o que pode significar excreção das proteases, quando estas são desnecessárias ao metabolismo de manutenção celular (Ukaji e Ashihara, 1977).

4. Crescimento em descontínuo

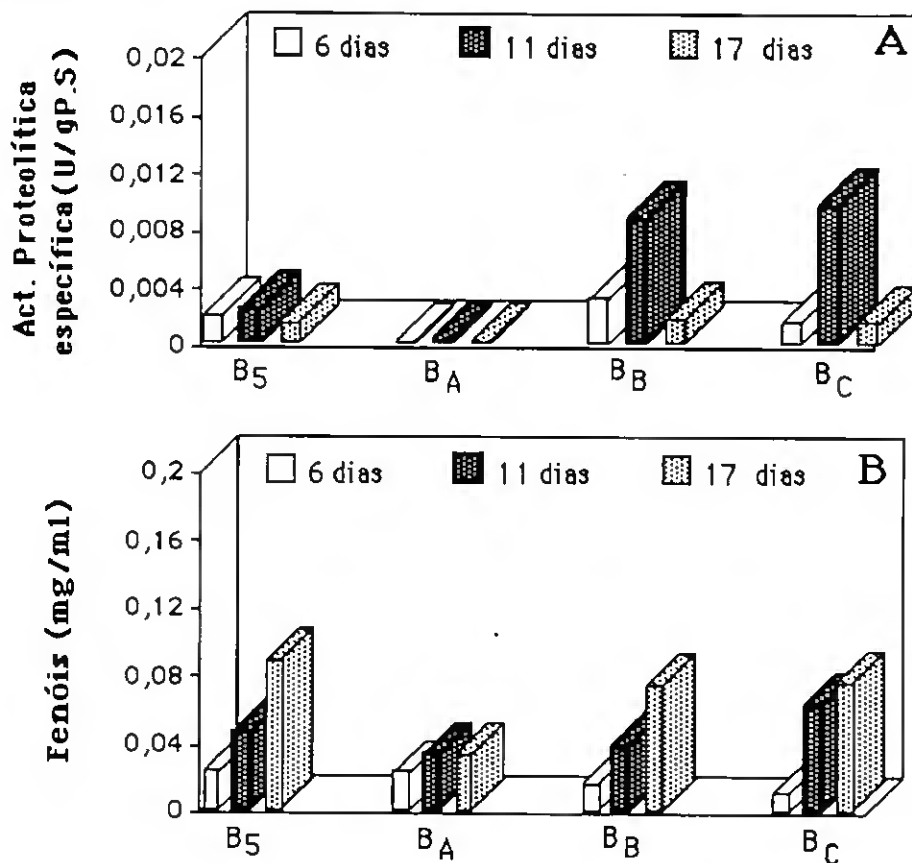


Fig.4.13. Actividade proteolítica específica (A) e produção fenólica (B) determinadas ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* em sistema "erlenmeyer". B₅- 1,25mM P_i; B_A- 0mM P_i; B_B- 2,5mM P_i; B_C- 12,5mM P_i. O desvio padrão apresentou valores inferiores a 0,04.

Nas células em suspensão de *Cynara cardunculus* é suposto, que as ciproquinas permanecem no interior da célula, mesmo na fase final de crescimento (Lima Costa, 1988).

O valor mais elevado da actividade proteolítica específica de células de cardo, assim como a máxima actividade azocaseinolítica específica média (0,0127 U/g P.S.-Tabela 4.5) foram obtidos em meio B_C(12,5 mM Pi) em fermentador descontínuo (0,0171 U/g P.S, Fig.4.14A), o que pode ser interpretado pelo aumento da eficiência na síntese proteica em fermentador, quando comparada com os

ensaios realizados em "erlenmeyer", muito provavelmente, devido às melhores condições de arejamento no biorreactor, como foi discutido em 4.4.2. Este resultado sugere que as proteases quantificadas são metabolitos primários.

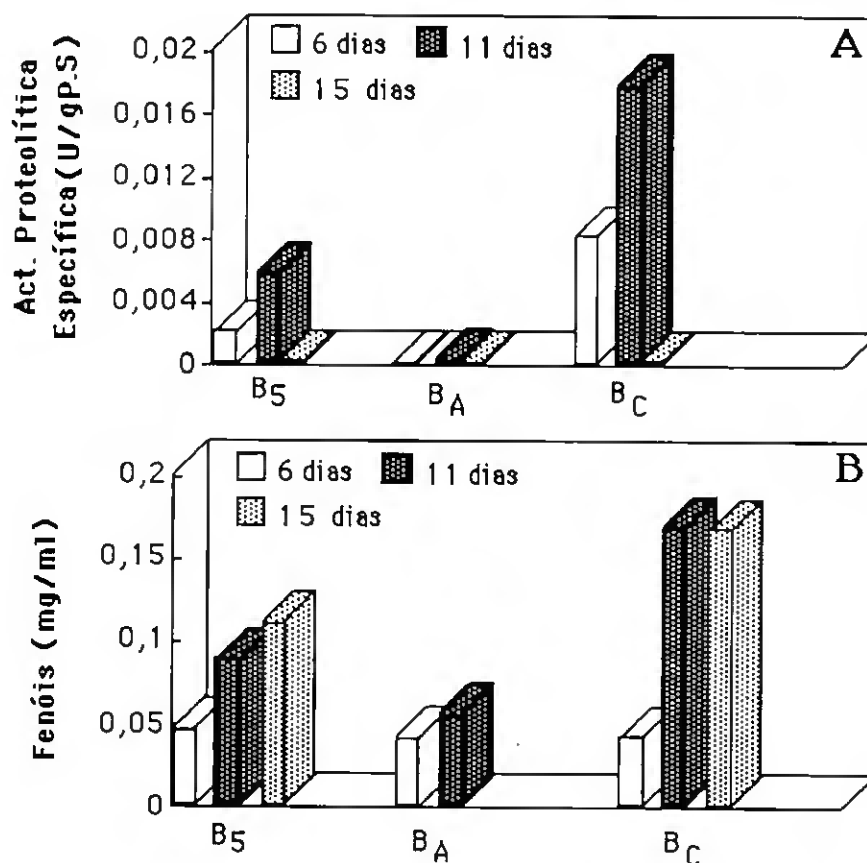


Fig.4.14. Actividade proteolítica específica (A) e produção fenólica (B) determinadas ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* em fermentador descontínuo para concentrações diferentes de fosfato em meio Gamborg,(1968). B₅- 1,25mM P_i; B_A- 0mM P_i; B_C- 12,5mM P_i. O desvio padrão apresentou valores inferiores a 0,05.

Poder-se-ia pensar, que a eventual inibição da síntese das proteases durante a fase estacionária de crescimento das células de cardo seria devida à presença de elevado conteúdo fenólico (Fig.4.14.). Contudo, a elevada taxa de proteólise observada, em fermentador,

4. Crescimento em descontínuo

no 11º dia do ciclo, em simultâneo com a presença de elevada concentração fenólica (0,17mg/ml) contradiz esta hipótese.

Tabela 4.5. Produtividades proteásicas, actividades proteolíticas específicas médias e respectivos intervalos de confiança, determinadas em cultura de células de *C. cardunculus* em "erlenmeyer" e fermentador descontínuo para diferentes concentrações de fósforo e de azoto no meio basal B₅ (Gamborg, 1968).

Meio Nutriente	Produtividade Proteásica (U/Kl. dia)	Act. Proteolítica Específica Média (U/g. P.S.)	Intervalo de Confiança 95%			
	"Erlenm" Fermentador	"Erlenm." Fermentador	"Erlenm."	Fermentador		
B ₅	4,75	2,02	0,0020	0,0038	0,0018-0,0022	0,0003-0,0073
B _A	0,00	0,00	0,0000	0,0000	-----	-----
B _B	7,25	n.d.	0,0059	n.d.	0,0021-0,0097	-----
B _C	13,4	13,6	0,0055	0,0127	0,0000-0,0110	0,0071-0,0180
B _D	0,84	3,32	0,0076	0,0068	0,0046-0,0110	0,0018-0,0084
B _E	0,78	n.d.	0,0049	n.d.	0,0014-0,0084	-----
B _F	3,62	n.d.	0,0090	n.d.	0,0070-0,0110	-----
TNO ₃ ⁻	3,78	n.d.	0,0084	n.d.	0,0070-0,0098	-----

n.d.- valor não determinado

B₅- 1,25mM P_i; B_A- 0mM P_i; B_B-2,5 mM P_i; B_C- 12,5mM P_i

B_D - 30 mM NH₄⁺ 1 mM NO₃⁻; B_E - 1 mM NH₄⁺, 1 mM NO₃⁻; B_F- 30 mM NH₄⁺, 30 mM NO₃⁻.

Refira-se, ainda a propósito do nutriente fósforo, a sua importante função desempenhada no metabolismo primário enzimático em sistemas microbianos. Moon e Parulekar (1993) obtiveram, em culturas de *Bacillus firmus*, aumento na actividade proteolítica específica com o aumento da concentração de fósforo de 11,5 mM para 23,0 mM. Yoon *et al.* (1989) e Ryan *et al.* (1989) defenderam o efeito de estímulo do fosfato na síntese de α-amilase em *Bacillus amyloliquefaciens* e na síntese de β-lactamase em *Escherichia coli*.

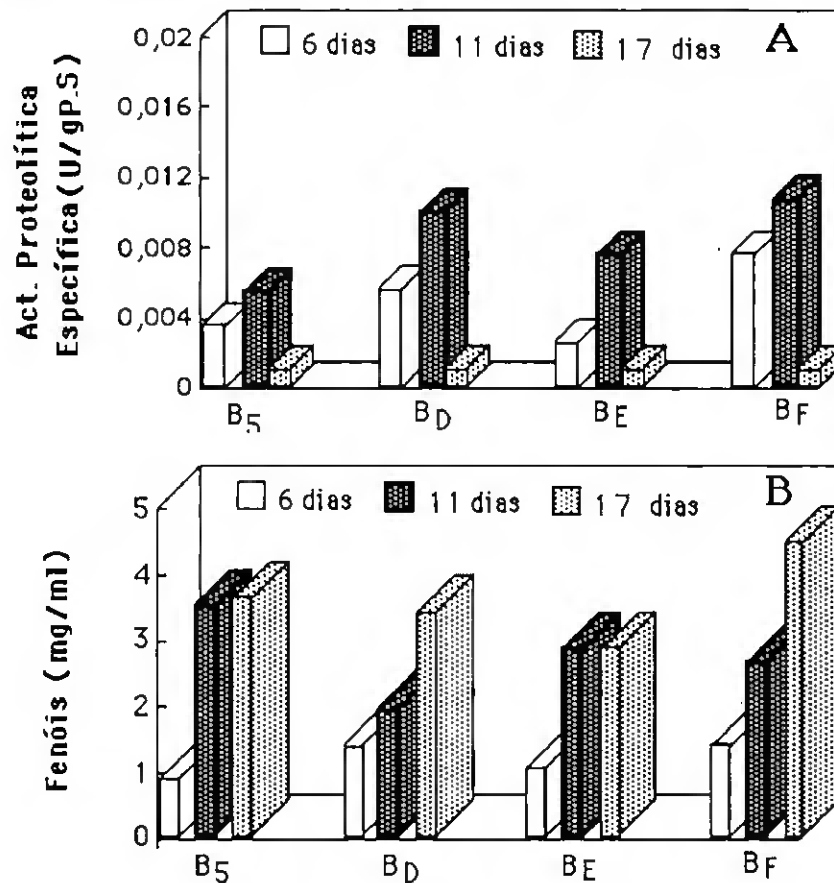


Fig.4.15.Actividade proteolítica específica (A) e produção fenólica (B) determinadas ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus*, em "erlenmeyer". B - 1mM NH₄⁺, 30mM NO₃⁻; B_D - 30mM NH₄⁺, 1mM NO₃⁻; B_E- 1mM NH₄⁺, 1mM NO₃⁻; B_F- 30mM NH₄⁺, 30 mM NO₃⁻. O desvio padrão apresentou valores inferiores a 0,05.

Quer em biorreactor, quer em "erlenmeyer", observa-se, duma maneira geral, um aumento na actividade proteolítica específica durante a fase de crescimento exponencial-linear, atingindo-se um valor superior ao inicialmente determinado, seguido-se uma desactivação acentuada no início da fase estacionária (Fig. 4.13, 4.14, 4.15 e 4.16). Segundo Ducos *et al.* (1988), as enzimas da via metabólica primária glicolítica (hexoquinase, glucose-6-fosfato desidrogenase, fosfofrutoquinase) apresentam um perfil de activação semelhante.

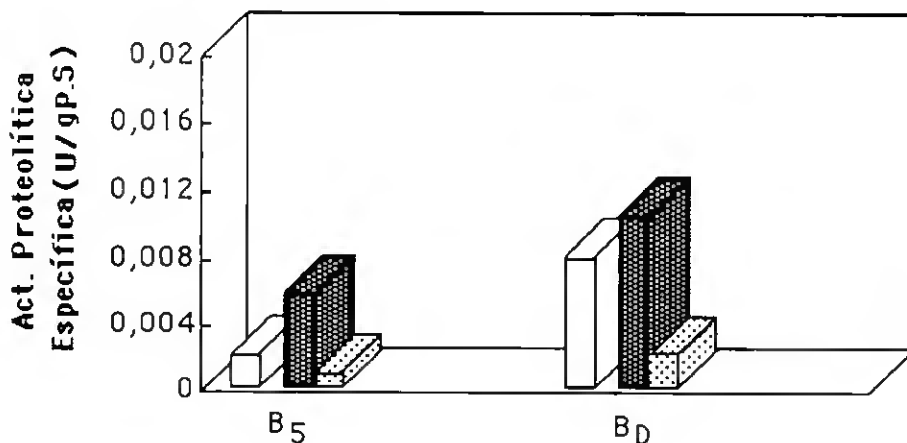


Fig.4.16. Actividade proteolítica específica determinada ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus* em fermentador descontínuo. B₅- 1mM NH₄⁺, 30mM NO₃⁻; B₀- 30mM NH₄⁺, 1mM NO₃⁻. O desvio padrão de cada uma das amostras apresentou valores inferiores a 0,05.

O declínio acentuado da actividade proteolítica específica na suspensão celular de cardo observado no 17^o dia do ciclo de crescimento, poderá estar associado ao esgotamento da fonte de azoto (Fig.4.9, 4.10, 4.11) ou da fonte de carbono (Fig.5.6 B), nutrientes essenciais à síntese proteica. Resultados díspares foram referidos para células em suspensão de *Silybum marianum*, em que a actividade azocaseinolítica máxima foi atingida no 4^o dia de crescimento, início da fase exponencial de crescimento (Fevereiro,1991).

A avaliação quantitativa da actividade especificadas cipsosinas das células em suspensão de *Cynara cardunculus*, na presença de diferentes concentrações da fonte de azoto (Figs. 4.15 e 4.16), denota um incremento quando se aumenta a concentração do catião amónio no meio de inoculação (30mM NH₄⁺), quer em "erlenmeyer", quer em fermentador, sugerindo um efeito indutor da activação enzimática proteolítica, devido a eventual bloqueamento da via metabólica do azoto. Rhodes *et al.* (1986) registaram, igualmente, um aumento de actividade proteolítica em *Lemna minor* L, *in vivo*, quando ocorre repressão da via metabólica do azoto inorgânico. A activação da(s)

protease(s) ocorreu igualmente com a inibição do metabolismo do azoto inorgânico em células de *Lemna paucicostada*. (Tanaka *et al*, 1990). Refira-se, a propósito, que a regulação directa do gene das proteases pelo catião amónio é sugerida por Metzberg, 1979 (citado por Fevereiro, 1991).

A Tabela 4.5. reúne os valores das actividades proteolíticas específicas médias, respectivos intervalos de confiança e produtividade proteásicas, determinadas ao longo do ciclo de crescimento de células em suspensão de cardo. Estes parâmetros foram calculados para diferentes concentrações de fósforo e de azoto no meio nutriente B₅ e comparados com as actividades proteolíticas específicas determinadas no meio TNO₃⁻. Pode observar-se nesta tabela, que os valores máximos das produtividades proteolíticas foram obtidos para 12,5mM P_i (B_C), quer em "erlenmeyer", quer em fermentador, o que reafirma a influência favorável da presença de fosfato na produção proteásica. No que concerne aos valores de produtividades determinados para diferentes concentrações de azoto (B_D, B_E, B_F, TNO₃⁻), constatou-se que o seu valor máximo (3,62 U/kl.dia) corresponde a células mantidas no meio B_F (30mM NO₃⁺, 30mM NH₄⁺) e no meio TNO₃⁻ ("erlenmeyer"), enquanto que o menor valor coincide com a menor concentração em ião amónio (meio B_E), sugerindo de novo, a influência do catião amónio na indução da actividade proteolítica. A actividade específica proteolítica média, em meio TNO₃⁻, é cerca de 4,5 vezes superior à actividade proteolítica específica determinada em meio B₅ (Tabela 4.5., "erlenmeyer"), o que está de acordo com o referido por Lima Costa, (1988) e por Figueiredo, (1988). Segundo Cordeiro *et al.* (1993), as ciproquinas são sintetizadas em células em suspensão de cardo quando cultivadas em meio TNO₃⁻

Os valores mais elevados de actividades proteolíticas da cultura celular de cardo, estimadas em "erlenmeyer" (Tabela 4.5.), foram obtidos para os meios B_F, TNO₃⁻, B_D e B_C. Atente-se ainda, que os intervalos de confiança determinados para cada uma das condições

4. Crescimento em descontínuo

nutricionais referidas, se interseccionam, o que indica a não discriminação daquelas actividades proteolíticas específicas médias. Em conformidade com o sugerido por *Cordeiro et al.* (1993), as cipsosinas detectadas em células em suspensão de *C. cardunculus* são cisteínicas. O centro activo com o resíduo cisteína envolvido no complexo intermediário catalítico liga-se covalentemente ao substrato e pode ser inibido especificamente pela cetona diazometil peptídica. A flutuação da concentração de inibidores naturais presentes no citosol ou nos lisossomas pode ser o regulador da actividade proteolítica, tal como sugerido por Bond e Butler, (1987). Todavia, o mecanismo de activação das proteases vegetais ainda não está esclarecido.

A acumulação fénolica extracelular na cultura em suspensão de *C. cardunculus* está reproduzida nas Figs 4.13, 4.14 e 4.15, para as diferentes condições de cultivo e revela um aumento ao longo do ciclo do crescimento, atingindo o valor máximo na fase estacionária. Tal, está de acordo com o referido por Sahai e Shuler (1984), segundo os quais, a maior produção de fenóis em células de *N. tabacum* se verifica em condições de "stress" nutricional. Ainda segundo estes autores, a produção de metabolitos secundários depende das condições de cultura das células (temperatura, luz) composição hormonal e nutricional do meio nutriente e varia de espécie para espécie vegetal. Diversos autores apoiam a hipótese, de que a produção de metabolitos secundários na célula vegetal é induzida durante a fase estacionária do crescimento. *Dioscorea deltoidea* produz diosgenina e esteróis na fase final de crescimento (Ravishankar,1991); alcalóides indólicos obtidos a partir da cultura celular de *C. roseus* em suspensão são acumulados primordialmente durante a fase estacionária de crescimento, ou seja em condições de "stress" nutricional (Zenk *et al.* 1977, Knobloch e Berlin 1980, Moreno *et al.* 1993, Schlatman *et al.* 1993).

Para concentrações de 12,5 mM P_i do meio de cultura, as células de cardo evidenciaram uma acentuada acumulação de fenóis a partir do 11º dia (fase exponencial) do ciclo, quer em "erlenmeyer", quer

para a síntese de metabolitos primários quer para a síntese de metabolitos secundários (Lima Costa 1987). Similar aumento na produção fenólica foi referido em células de tabaco, após remoção da hormona de crescimento e diminuição da concentração da fonte de carbono, ou seja, indução de "stress" nutricional (Schmidt *et al.* 1989). Segundo Lips *et al.* 1987, a acumulação fenólica está relacionada com a razão entre o teor em amónio e em hidratos de carbono presentes no meio. Após o esgotamento do azoto no meio de cultura, os glúcidos são metabolizados através da via secundária para a produção de compostos fenólicos.

Células em suspensão de *C. roseus* revelaram no entanto, maior concentração fenólica na ausência de fosfato no meio (Ukaji e Ashihara 1987), contrariamente ao observado em células de *C. candunculus* cultivadas em meio não fosfatado (Fig. 4.14).

Analisando a Fig. 4.15B, constata-se que a cultura celular apresenta, na fase inicial de crescimento (6 dias), um elevado teor fenólico e que as diferentes concentrações iniciais de azoto no meio nutriente não afectaram significativamente a acumulação fenólica ao longo do ciclo de crescimento, atingindo valores máximos semelhantes no final da fase estacionária (3,49+/-0,12 mg/ml). A máxima concentração fenólica obtida neste ensaio (Fig. 4.15B), é de 4 mg/ml, cerca de 25 vezes mais elevado do que os valores calculados (0,15 mg/ml) para o ensaio em fermentador com o fósforo inorgânico (Fig. 4.14B), o que pode ser atribuído ao elevado conteúdo fenólico do inóculo utilizado. Todavia, o elevado teor em fenóis não afectou o crescimento celular (Fig. 4.9-B₅).

Do exposto, ressalta que a actividade azocaseinolítica e a produção fenólica parecem ser reguladas antagonisticamente, deixando supor, mais uma vez, que as proteases presentes em células em suspensão de *C. candunculus* são metabolitos associados ao crescimento. A existência de um precursor comum entre as vias metabólicas primária e secundária, regulador das duas vias bioquímicas, foi proposto por Knobloch e Berlin (1980) e Phillips e Henshaw (1977).

4. Crescimento em descontínuo

Por outro lado, a produção de metabolitos secundários, como tem sido largamente referido, encontra-se associada, de alguma maneira, a deficientes condições ambientais, quer nutricionais, quer hidrodinâmicas.

CAPÍTULO 5

Cinética e energética de crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus*

5.1. Metodologia e Objectivos

5.2. A Fonte de Carbono e de Energia em Culturas de Células Vegetais. Modelos Interpretativos.

5.3. Modelos Matemáticos do Crescimento Celular Vegetal.

5.3.1. Modelos não estruturados do crescimento celular.

5.3.2. Modelos estruturados do crescimento celular.

5.4. Resultados e Discussão

5.4.1. Parâmetros cinéticos e utilização da fonte de carbono e de energia no crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus*, em sistema descontínuo.

5.4.2. Influência da fonte de carbono na actividade proteolítica e na produção fenólica de células em suspensão de *C. cardunculus*, em sistema descontínuo.

5.1 METODOLOGIA E OBJECTIVOS

Com o intuito de avaliar a influência da concentração inicial de substrato na cinética de crescimento, determinaram-se os parâmetros de crescimento para teores de sacarose entre 1 e 8% (p/v) em sistema descontínuo. Com os resultados obtidos, foram ensaiadas representações de Lineweaver-Burk, com o objectivo de verificar a aplicabilidade do modelo cinético de crescimento de Monod. Outros modelos não estruturados foram aplicados ao crescimento da suspensão de células de cardo, com a finalidade de determinar o rendimento de biomassa real ($Y'_{X/S}$), e o coeficiente de manutenção $-m-$. Estes parâmetros quantificam, a transformação do carbono em biomassa e em energia necessária à manutenção da viabilidade celular.

Foi também estudada a influência da concentração da fonte do carbono e de energia na produtividade azocaseinolítica e na produção fenólica da referida suspensão celular. Para tal efectuaram-se ensaios num fermentador descontínuo e em "erlenmeyer" para diferentes concentrações da fonte de carbono e de energia (1%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8% p/v) (Fig. 5.1.)

O crescimento da suspensão celular foi avaliado para cada um dos teores iniciais de sacarose, pela determinação dos parâmetros peso seco, peso fresco, n° de células/ml, taxa respiratória e da taxa específica de crescimento. Foram determinadas as produtividades de biomassa e proteásica e os coeficientes de rendimento aparente de biomassa em função dos hidratos de carbono consumidos ($Y_{X/S}$) durante o crescimento da suspensão celular. Foram igualmente determinadas, a produção fenólica, as actividades azocaseinolíticas e os consumos dos hidratos de carbono. As actividades proteolíticas foram determinadas em testes realizados em "erlenmeyer", para as referidas concentrações iniciais de substrato.

Tal como referido em 3.1. as fermentações foram realizadas pelo menos 2 vezes e em condições de oxigénio não limitante (o oxigénio dissolvido foi mantido entre 30% e 50% do valor total de saturação do meio de cultura em oxigénio).

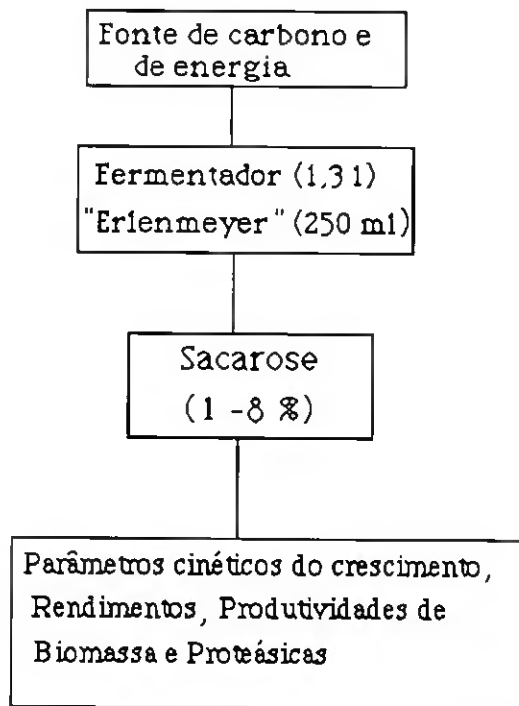


Fig. 5.1. Esquema organizativo da experimentação do capítulo 5.

Estipulou-se um coeficiente de transferência de massa volumétrico de oxigénio ($k_L a$) igual a $6,1 \text{ h}^{-1}$, para os ensaios efectuados em biorreactor descontínuo, de acordo com o estudo de optimização do crescimento celular da suspensão celular de *C. cardunculus* efectuado no capítulo 3. Os ensaios em "erlenmeyer" foram realizados em triplicado.

5.2. A FONTE DE CARBONO E DE ENERGIA EM CULTURAS DE CÉLULAS VEGETAIS. MODELOS INTERPRETATIVOS.

As células vegetais cultivadas *in vitro* têm, genericamente, um comportamento heterotrófico e quimiorganotrófico. No entanto, existem culturas de tecidos vegetais que possuem o sistema fotossintético activo, portanto, com um comportamento fotoheterotrófico. Este tipo de culturas celulares foi amplamente investigado por Dalton (1980,1983,1984) em culturas de células em suspensão de espinafre e de *Ocimum basilicum*, por Treat e Engler, (1989) em suspensões celulares de *Glycine max.* e de *Pinus elliottii* e por Chagvardieff *et al.* (1990) em culturas celulares de *Euphorbia characias*.

O substrato sacarose, funciona duplamente como fonte de carbono e de energia da célula vegetal, cultivada *in vitro*. A energia forma-se através de reacções de oxi-redução e liberta-se sob a forma de ATP, como foi referido em 4.2. O oxigénio é o receptor final de electrões da cadeia respiratória. A duplicidade de funções da sacarose dificulta a distinção entre o carbono consumido nos processos catabólicos, que se traduz na energia biologicamente útil e nos processos anabólicos, intervenientes na manutenção do funcionamento da célula.

Os modelos de Herbert (1958) e de Pirt (1965) são abordagens cinéticas do crescimento celular, que pela primeira vez consideraram os balanços energéticos. Estes modelos foram postulados para culturas de microrganismos e introduziram, pela primeira vez, o conceito da necessidade energética para a manutenção celular, expresso pelo coeficiente de manutenção m . Neste parâmetro pode-se incluir a difusão osmótica, a manutenção dos gradientes químicos, eléctricos e nutricionais (transporte passivo de nutrientes) entre a célula e o ambiente, a mobilidade celular (no caso de sistemas microbianos) e o "turnover" do

5. Cinética do crescimento

material celular (proteínas, RNA). Ambos os modelos são tratados como sistemas físicos fechados, utilizados frequentemente na indústria fermentativa e representados por uma equação linear que traduz o consumo do substrato.

Segundo **Pirt (1965)**, a energia total do sistema (ΔS_E) inclui duas formas de energias, a energia necessária para o crescimento celular (ΔS_C) e a energia de manutenção celular (ΔS_M)

$$\Delta S_E = \Delta S_C + \Delta S_M$$

O coeficiente de rendimento global de biomassa (Y_E) é expresso por:

$$Y_E = \frac{\Delta x}{\Delta S_E} \quad (5.1.)$$

Y_E - coeficiente de rendimento de biomassa
 Δx - biomassa produzida

No caso da energia de manutenção celular se anular, o rendimento de biomassa escrever-se-à:

$$Y_E = \frac{\Delta x}{\Delta S_C} \quad (5.2.)$$

O coeficiente de rendimento de biomassa (Y_{EG}) corresponde ao valor energético necessário à manutenção celular e é considerado constante ao longo do ciclo de crescimento celular.

$$\frac{dS_M}{dt} = mx \quad (5.3.)$$

m - coeficiente de manutenção

Ainda segundo o modelo de Pirt (1965), o balanço energético em termos de fonte de energia consumida, tem a seguinte forma:

$$\text{Taxa total de consumo} = \text{Taxa de consumo para crescimento} + \text{Taxa de consumo para manutenção} \quad (5.4.)$$

ou matematicamente:

$$\frac{\mu_x}{Y_E} = \frac{\mu_x}{Y_{EG}} + m_x \quad (5.5.)$$

ou ainda

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/S}} + m \quad (5.6.)$$

em que :

q_s - taxa específica de consumo do substrato
 $Y_{x/S}$ - coeficiente de rendimento real de
 biomassa

donde se conclui que :

$$q_s = f(\mu) \quad (5.7.)$$

Beefink *et al.* (1990) propuseram uma formulação matemática para o modelo de Pirt, que está expressa na equação 5.8. De acordo com a interpretação feita por aqueles autores, o substrato é consumido para as necessidades anabólicos e catabólicos do crescimento celular (q_{cres}) e nos processos energéticos associados à manutenção celular (m_s), sem contudo, haver alteração da taxa específica de crescimento.

$$\begin{aligned} \mu_{obs} &= \mu_{verd} \\ q_{obs} &= q_{cresc} + m_s \end{aligned} \quad (5.8.)$$

Pareilleux e Chaubet (1980) aplicaram o modelo de Pirt no cálculo do coeficiente de rendimento real de crescimento de uma cultura de células em suspensão de maçã, cultivadas em fermentador de 4l. Foi, igualmente, aplicado ao estudo do consumo energético de uma suspensão celular de *Nicotiana tabacum L.* (Kato e Nagai 1979). Mais recentemente, Taticek *et al.* (1990) aplicaram, com sucesso, o referido modelo ao crescimento de células em suspensão de *Eschscholtzia californica* para diferentes tipos de biorreactores.

5. Cinética do crescimento

Herbert (1958) considera no seu modelo teórico interpretativo do crescimento celular, que todo o substrato disponível é transformado em biomassa e a energia necessária à manutenção celular provém da combustão parcial de biomassa (metabolismo endógeno).

Desta forma, o crescimento observado ou aparente, resultaria da diferença entre o crescimento real e a biomassa consumida endogenamente:

$$\text{crescimento observado} = \text{crescimento real} - \text{biomassa consumida endogenamente}$$

Para baixas taxas específicas de crescimento, o metabolismo endógeno torna-se proporcionalmente mais importante do que o metabolismo anabólico. Segundo Herbert (1958), a formulação matemática deste modelo tem a seguinte forma:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{MAX} x - a x \quad (5.9.)$$

ou

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{ap} - x \quad \mu_{ap} - \text{taxa específica aparente de crescimento}$$

μ_{MAX} - taxa específica máxima de crescimento
 a - taxa específica relativa de manutenção.

O balanço energético neste modelo é descrito pela seguinte equação:

$$\frac{1}{Y_s} = \frac{1}{Y_{MAX}} + \frac{a}{\mu Y_{MAX}} \quad (5.10.)$$

em que: $m = \frac{a}{Y_{MAX}}$ (5.11.)

Para Herbert, o coeficiente de manutenção a corresponde ao consumo endógeno de biomassa.

A expressão 5.11. exprime a relação entre os modelos de Pirt e de Herbert, em que são comparadas as necessidades energéticas para a manutenção celular (m) e a quantidade de biomassa catabolisada para a manutenção (a). Embora os modelos de Pirt (1965) e de Herbert (1958) se possam considerar equivalentes, cada um deles apresenta as suas idiossincracias. No modelo de Herbert, todo o substrato disponível é transformado em biomassa, sendo a energia de manutenção proveniente apenas da combustão da biomassa, mesmo na presença de substrato disponível. No modelo de Pirt, pelo contrário, toda a energia necessária à manutenção celular provém do substrato, mesmo na situação de metabolização total deste. Nenhum dos modelos, postula a formação de produtos metabólicos.

O modelo proposto por **Beefink *et al.* (1990)** pretende conciliar os 2 modelos anteriormente descritos. A energia de manutenção será disponibilizada pela combustão do substrato quando este não se encontra em concentrações limitantes e pela degradação da biomassa quando o substrato se esgota.

Matematicamente o modelo é formulado pelas seguintes equações:

$$\mu_{obs} = \mu_{MAX} - \mu_M \quad (5.12.)$$

$$q_{obs} = q_{an} + q_{cat, cresc} + q_{cat, m} \quad (5.13.)$$

em que:

q_{an} - taxa específica de consumo de substrato por anabolismo

$q_{cat, cr}$ - taxa específica de consumo de substrato no catabolismo de crescimento

$q_{cat, m}$ - taxa específica de consumo de substrato no catabolismo de manutenção

A equação 5.13. pode ser reescrita, considerando $Y_{x/S} = \frac{\mu_{MAX}}{q_{cresc}}$

$$q_s = \frac{\mu_{MAX}}{Y_{x/S}} + q_{cat, m} \quad (5.14.)$$

5. Cinética do crescimento

Este modelo foi aplicado a uma cultura de células vegetais *in vitro*, pela primeira vez, por Van Gulik *et al.* (1992). Células em suspensão de *Catharanthus roseus* e de *Nicotiana tabacum* evidenciaram razoável concordância com este modelo quer em sistema semi-contínuo quer em sistema contínuo.

Na Fig. 5.2. está representado o esquema conceptual do modelo de Beftink *et al.* (1990).

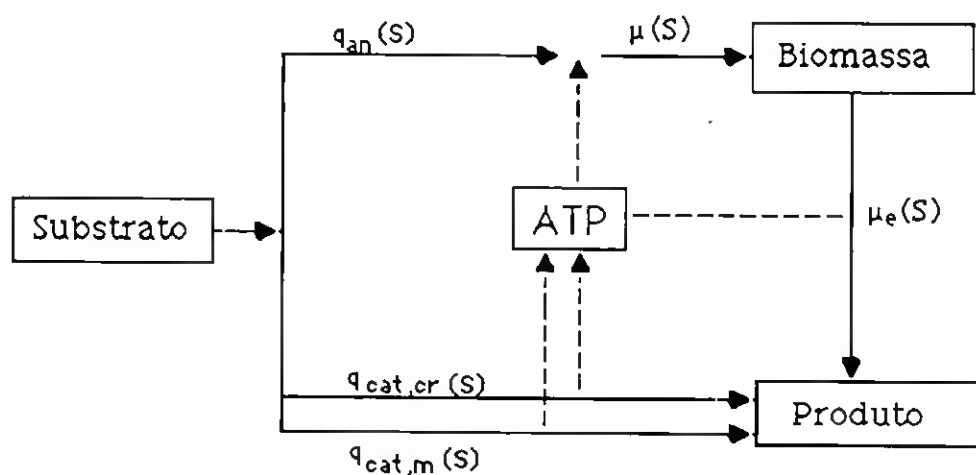


Fig.5.2. Utilização do substrato e formação de biomassa segundo o modelo de Beftink *et al.* (1990). Formação e consumo de ATP. $q_{an}(S)$ - consumo de substrato para fins anabólicos; $q_{cat,cr}(S)$ - consumo de substrato associado ao crescimento; $q_{cat,m}(S)$ - consumo de substrato para a manutenção celular; $\mu(S)$ - taxa específica de crescimento; $\mu_e(S)$ - taxa específica de manutenção.

5.3. MODELOS MATEMÁTICOS DO CRESCIMENTO CELULAR VEGETAL.

5.3.1. Modelos não estruturados do crescimento celular.

Os modelos matemáticos dos processos biológicos são instrumentos importantes na otimização 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, que pressupõem a composição celular constante ao longo do crescimento. Sendo aceitável, este postulado em microrganismos, em culturas de células vegetais é largamente restritivo, devido à complexidade do sistema metabólico vegetal e por não contemplar a multiplicidade e variabilidade dos componentes intracelulares ao longo do crescimento. No entanto, modelos clássicos como o de Monod, (1942), de Luedeking-Piret (1959) e de Nyholm (1976) têm sido amplamente aplicados à cinética de crescimento de células vegetais, embora não prevejam a formação de produtos residuais, a lise ou a expansão celular.

O modelo clássico de Monod, desenvolvido para o estudo da cinética microbiana, baseia-se fundamentalmente na hipótese, de que o aumento de biomassa está relacionado com o desaparecimento do substrato do meio e que a taxa específica de crescimento é apenas função da concentração do substrato extracelular. Apesar das limitações de aplicabilidade deste modelo a células vegetais, o crescimento da suspensão celular de *Dioscorea deltoidea* em fermentador de 14 l agitado mecânicamente, foi descrito pela cinética estabelecida por Monod (Drapeau *et al.*1986), apresentando uma constante de saturação $K_S=7$ g/l.

Nyholm (1976) desenvolveu um modelo para substratos não conservativos, isto é, substratos que não são consumidos

5. Cinética do crescimento

imediatamente após o seu transporte para o interior da célula, mas armazenados em vacúolos. Como foi evidenciado no capítulo anterior, o fósforo inorgânico é um substrato conservativo na cultura de células em suspensão de *C. cardunculus* e na suspensão celular de *Catharanthus roseus* (Ukaji e Ashihara, 1987). São também considerados substratos conservativos, os íons Fe^{2+} , K^+ e as vitaminas, contrariamente à glucose e sacarose que são metabolizadas imediatamente após entrada na célula.

O modelo de Monod não é aplicável a substratos conservativos, por não ser possível, neste caso, correlacionar o aumento de biomassa e a concentração do substrato extracelular. No modelo de Nyholm, apenas é considerado o substrato intracelular ($S_e + S_a$), de acordo com o esquema indicado na Fig. 5.3.

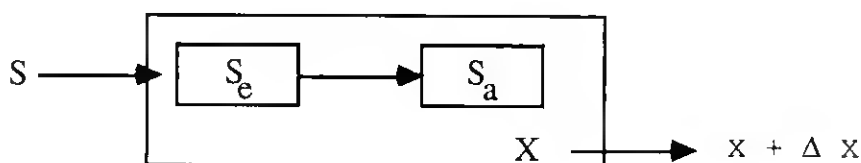


Fig.5.3. Esquema representativo do comportamento do substrato celular no modelo de crescimento de Nyholm (1976). S - substrato extracelular; S_e - substrato utilizado para o crescimento celular; S_a - substrato necessário à manutenção celular.

Matematicamente o modelo de Nyholm pode expressar-se da seguinte forma:

$$C_i = S_i/x \quad \text{e} \quad Y = X/S_i \quad (5.15.)$$

em que:

$$\begin{aligned} \mu &= f(C_i) \\ \frac{dC_i}{dt} &= v - \mu C \end{aligned} \quad (5.16.)$$

e:

$$v = \frac{1}{X} \frac{dS_i}{dt} \begin{cases} \frac{R}{X} & \text{se } C < C_{i,\max} \\ C_{i,\max} \cdot \mu & \text{se } C_i = C_{i,\max} \text{ (crescimento óptimo)} \end{cases}$$

- v - taxa específica de transporte do substrato
 S_i - concentração do substrato intracelular
 X - concentração de biomassa
 C_i - concentração de substrato intracelular por unidade de biomassa
 $C_{i,\max}$ - concentração de substrato que permite um crescimento óptimo
 Y - coeficiente de rendimento de biomassa
 R - concentração do substrato em cultura contínua ($R=D \cdot S_o$)

Em resumo, para que o modelo de Nyholm seja válido é necessário que se verifiquem as seguintes condições:

- Substrato conservativo
- Condições ambientais celulares constantes (conteúdo intracelular e extracelular constantes)

A maior aplicabilidade deste modelo verificou-se em sistema contínuo de culturas microbianas. Contudo, Dougall e Weyrauch (1980) utilizaram-no para interpretar o crescimento e produção de antocianinas, por células em suspensão de cenoura, em cultura contínua, cultivadas em meio nutriente com concentrações limitantes de fósforo inorgânico.

5.2.3. Modelos Estruturados do Crescimento Celular

Este tipo de modelos permite uma descrição mais rigorosa do crescimento da cultura de células vegetais *in vitro*, por reflectirem a multiplicidade dos componentes intracelulares e suas possíveis interações.

5. Cinética do crescimento

Bailey e Nicholson (1989) propuseram um modelo, em que as células vegetais *in vitro* são caracterizadas por 5 variáveis: peso seco viável (v), peso seco não viável (X_d), peso fresco (X_f), concentração do produto (p), concentração do substrato limitante (S).

Peso seco viável é definido como a proporção de peso seco viável relativamente à massa total de peso seco. O peso seco é identificado como a parede celular e citoplasma e o peso fresco com o conteúdo vacuolar.

O quociente entre peso fresco e peso seco viável permite estimar a dimensão celular que os autores relacionam com a sensibilidade à agitação, tal como se referiu no capítulo 3. As expressões matemáticas que traduzem o modelo de Bailey e Nicholson, (1989) são as seguintes:

$$1) \frac{\partial X_d}{\partial t} = (\mu_g V S - K_d) X_d$$

O aumento em peso seco (X_d) depende da viabilidade celular (V) do metabolismo endógeno K_d

$$2) \frac{\partial S}{\partial t} = - \mu_g \frac{S X_{vd}}{Y}$$

O substrato é transformado em peso seco viável (X_{vd}) com o rendimento Y

$$3) \frac{\partial X_{vd}}{\partial t} = \mu S X_{vd} - K_i X_{vd} - \chi^i K_d X_{vd}$$

A variação do peso seco viável depende da mortalidade (K_i) e do metabolismo endógeno K_d .

$$4) \frac{\partial v}{\partial t} = v (\mu_g S (1-v) - K_i \chi^i)$$

Equação de viabilidade obtida por diferenciação da equação $X_{vd} = X_d V$
 $\chi = X_f / V X_d$

$$5) \frac{\partial X_f}{\partial t} = \frac{dV}{dt} \cdot \frac{X_f}{v} + Z V X_d$$

Aumento da biomassa em peso fresco (X_f) depende também da viabilidade celular (V)

$$6) \frac{\partial P}{\partial t} = \alpha V \frac{dX_d}{dt} + \beta V X_d + \frac{\partial V}{\partial t} \frac{P}{V}$$

α - coeficiente de produção associado ao crescimento celular
 β - coeficiente de produção dissociado do crescimento
 A - parâmetro de diminuição da produção por mortalidade

O modelo de Bailey e Nicholson (1989) possibilita a previsão da expansão celular e da fase necrótica celular através da razão ponderal peso fresco/peso seco. Segundo este modelo, na fase de crescimento, o peso fresco e o peso seco aumentam e a viabilidade é elevada. Na fase de expansão celular, o peso fresco continua a aumentar mas o peso seco mantém-se ou diminui; a viabilidade é ainda elevada. Na fase de lise celular, quer o peso seco quer o peso fresco diminuem, assim como a viabilidade das células.

Este modelo teórico foi aplicado com sucesso, na descrição do crescimento e optimização da temperatura e na produção de alcalóides em células de *C. roseus* (Morris, 1986; Bailey e Nicholson, 1990). Todavia, a aplicação deste modelo ao crescimento celular vegetal não possibilita a distinção entre a quantidade de substrato utilizado para crescimento, ou para a manutenção celular, ou ainda, para a formação de produtos.

No modelo estruturado de Frazier (1989), é postulado que o crescimento celular é controlado, não pelo consumo do substrato extracelular, mas por um composto intermediário -M-, tal como é pressuposto no modelo cinético de Michaelis-Menten. Este comportamento irá determinar a formulação matemática deste modelo.



Este modelo revelou restrições diversas na sua aplicação a crescimentos de suspensões celulares vegetais, visto não considerar parâmetros que quantifiquem a manutenção celular, ou a formação de produtos metabólicos.

5. Cinética do crescimento

A taxa específica de crescimento μ_g e a taxa de produção de metabolitos r_m têm a seguinte forma :

$$\mu_g = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot m_i}{K_m^m + m_i} \quad (5.17)$$

$$r_m = Y_{m/s} \frac{\mu_{\max}^s S}{K_m^s + S} - \frac{1}{Y_{x/m}} \frac{dX}{dt} \quad (5.18)$$

m_i - concentração do composto intermediário M

r_m - taxa de produção do metabolito intermediário

$Y_{m/s}$ - rendimento do metabolito intermediário relativamente ao substrato

$Y_{x/m}$ - rendimento de biomassa relativamente ao metabolito intermediário

K_m - constante de Michaelis.

μ_{\max}^s - taxa específica máxima de conversão do substrato

μ_{\max}^m - taxa específica máxima de conversão do composto intermediário

O modelo de Frazier (1989) apresenta a vantagem de prever a fase de latência do crescimento celular, o que não é possível com os modelos não estruturados. O autor, na tentativa de validação do modelo, verificou que a caracterização teórica da fase de latência coincidia com os resultados experimentais referentes ao crescimento em sistema descontínuo, de uma suspensão celular de *Dioscorea deltoidea*. Segundo este modelo, a fase de latência do crescimento celular, em que a taxa específica de crescimento é reduzida ou mesmo nula, é interpretada pela necessidade primordial de sintetizar compostos intermediários fundamentais à formação de biomassa, antes do início da divisão celular.

O modelo estruturado de Hooker e Lee, (1992) admite, de acordo com o esquema conceptual representado na Fig. 5.4., que o metabolismo primário e secundário da célula vegetal competem para o mesmo substrato, tal como a função respiratória,

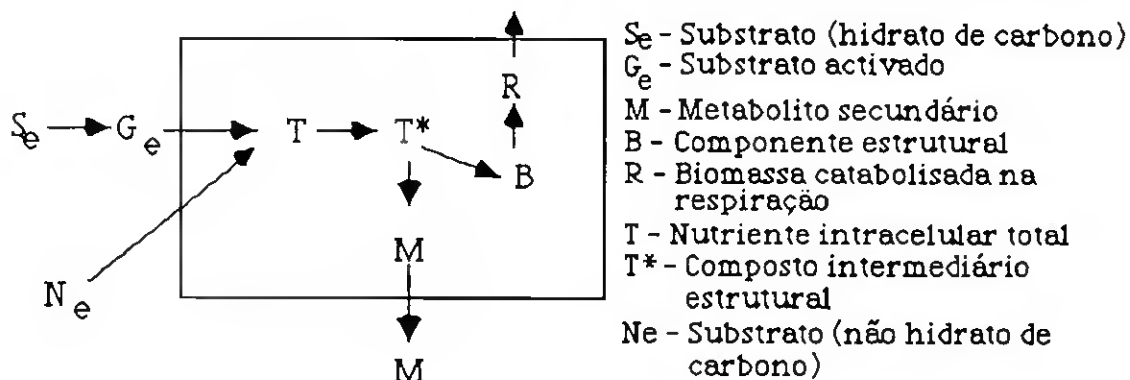


Fig.5.4. Diagrama representativo do modelo cinético estruturado de Hooker e Lee, (1992).

Neste modelo, o sistema metabólico foi definido como a fase biótica da cultura. As concentrações intracelulares são calculadas em função do volume biótico do sistema. As concentrações extracelulares referem-se ao volume do meio nutriente existente na fase abiótica.

Volume da fase biótica V_b :

$$V_b = m \vartheta$$

m - peso seco do sistema celular
 ϑ - volume do peso seco/unidade de peso seco

Volume da fase abiótica V_a :

$$V_a = V_T - m \vartheta$$

V_T - volume total de cultura

O modelo de Hooker e Lee (1992) considera, por hipótese, que o transporte activo dos substratos para o interior da célula, se efectua através de reacções enzimáticas que obedecem à cinética de Michaelis-Menten.

5. Cinética do crescimento

Este modelo pressupõe a existência de n componentes intracelulares. A variação da massa de cada um dos componentes (dC_j), em sistema descontínuo pode ser descrita da seguinte forma:

$$\frac{d\hat{C}_j}{dt} = \sum_{k=1}^P r_{k,j} - \frac{1}{m} \frac{dm}{dt} d\hat{C}_j \quad (5.19)$$

$r_{k,j}$ - taxa de formação do componente j na reação k por unidade de volume

$\frac{dm}{dt}$ - representa a diluição do componente intracelular devido à expansão da fase biótica.

Se o componente j estiver presente no meio extracelular, o balanço de massas da fase abiótica será:

$$\frac{d\bar{C}_{j,e}}{dt} = \sum_{k=1}^P r_{k,j,e} + \frac{\hat{v}}{(v - m\bar{v})} \frac{dm}{dt} \bar{C}_{j,e} \quad (5.20)$$

O modelo de Van Gulik et al. (1993) foi desenvolvido, tendo em conta a disponibilidade de dois substratos, a glucose e o fosfato. Foi considerado que os restantes nutrientes necessários ao crescimento celular estavam presentes em condições não limitantes. O modelo considera ainda, que numa suspensão celular de *C. roseus*, o fosfato e a glucose são substratos conservativos, desde que se encontrem presentes em condições não limitantes do crescimento celular; o fosfato será acumulado intracelularmente em vacúolos e a glucose sob a forma de amido. De acordo com o diagrama conceptual do modelo, representado na Fig. 5.5., a taxa de produção de biomassa depende do nível intracelular dos compostos fosforilados e a biomassa é constituída por quatro componentes distintos, fosfato inorgânico, compostos fosforilados de baixo peso molecular, hidratos de carbono e biomassa estrutural. Foi, igualmente, incluído no modelo, a degradação da biomassa, originando produtos resultantes da lise celular.

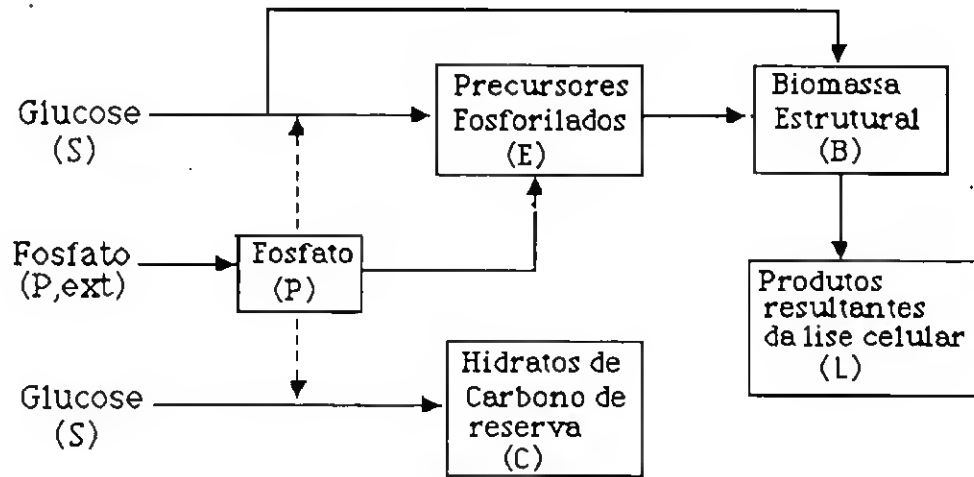


Fig.5.5. Diagrama conceptual do modelo estruturado de van Gulik *et al.* (1993).

Matematicamente o modelo é expresso pelas seguintes equações:

Transporte e acumulação do fosfato:

$$r_{P,ext} = q_{P,ext} C_x \frac{C_{P,ext}}{K_{P,ext} + C_{P,ext}} \quad (5.23.)$$

$r_{P,ext}$ - taxa de acumulação do fosfato extracelular

$C_{P,ext}$ - concentração de fosfato

$q_{P,ext}$ - taxa específica máxima de transporte do fosfato

$K_{P,ext}$ - constante cinética de saturação do fosfato extracelular

C_x - concentração da biomassa total

Formação dos produtos resultantes da lise celular:

$$r_L = q_L \cdot \omega_B \cdot C_x \quad (5.24.)$$

r_L - taxa de síntese dos produtos da lise

q_L - taxa específica de formação dos produtos de lise.

5. Cinética do crescimento

Conversão da glucose em biomassa estrutural:

$$r_B = q_{B,max} \cdot \omega_B \cdot C_x \cdot \frac{\omega_E}{K_E + \omega_E} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (5.25.)$$

r_B - taxa de síntese da biomassa estrutural

$q_{B,max}$ - taxa específica máxima de síntese da biomassa estrutural

K_E - constante de saturação dos compostos fosforilados.

ω_E - concentração dos compostos fosforilados

Conversão da glucose em compostos fosforilados

$$r_E = q_{E,max} \cdot \omega_B \cdot C_x \cdot \frac{\omega_P}{K_P + \omega_P} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (5.26.)$$

r_E - taxa de síntese dos compostos fosforilados K_s - constante de saturação da glucose extracelular

$q_{E,max}$ - taxa específica máxima de síntese dos compostos fosforilados

ω_B - concentração da biomassa estrutural

K_P - constante de saturação

ω_P - concentração do fosfato intracelular

do fosfato intracelular

C_s - concentração da glucose extracelular

Conversão da glucose em hidratos de carbono de reserva:

$$r_C = q_{C,max} \cdot \omega_B \cdot C_x \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s (1 + \omega_P / k_i)} \quad (5.27.)$$

r_C - taxa de síntese dos hidratos de carbono de reserva

$q_{C,max}$ - taxa específica de formação hidratos de carbono de reserva

k_i - constante de inibição (a síntese do amido é inibida pelo fosfato intracelular)

Consumo da glucose necessária à formação de energia de manutenção :

$$r_{MS} = K_M \cdot \omega_B \cdot C_x \quad (5.28.)$$

r_{MS} - taxa de consumo da glucose para manutenção celular

K_M - taxa de consumo de glucose por unidade de biomassa estrutural.

A energia para a manutenção celular, provém segundo este modelo, do consumo da glucose extracelular ou do amido intracelular.

$$\Gamma_{S,ms} = \Gamma_{MS} \frac{C_S}{C_S + K_2 \omega_c} \quad (5.29)$$

$\Gamma_{S,ms}$ - taxa de consumo da glucose extracelular para a manutenção

K_2 - constante de saturação

$$\Gamma_{C,ms} = \Gamma_{MS} \frac{K_2 \omega_c}{C_S + K_2 \omega_c}$$

$\Gamma_{S,ms}$ - taxa de consumo da glucose

extracelular para manutenção

ω_c - concentração dos hidratos de carbono de reserva

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. Parâmetros cinéticos e utilização da fonte de carbono e de energia no crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus*, em sistema descontínuo.

Como pode observar-se na Tabela 5.1., a melhor resposta global expressa em função da taxa específica de crescimento de células de *C. cardunculus*, foi obtida para as concentrações de 2% e 3% (p/v) e a maior produtividade de biomassa foi obtida para o meio de cultura com 3% (p/v) de sacarose. É notório, o decréscimo acentuado nos valores das taxas específicas de crescimento para elevados teores de sacarose (6% e 8% p/v), sem que isso signifique, no entanto, uma inibição total do crescimento, se se atender ao valor determinado para a produtividade de biomassa, ao valor do coeficiente de rendimento aparente de biomassa (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Parâmetros cinéticos de crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus L* para diferentes concentrações de substrato em fermentador descontínuo de monoturbina (A) e de duas turbinas (B).

* coeficiente de rendimento aparente de biomassa (g peso seco/g sacarose)

* * coeficiente de rendimento real de biomassa (g peso seco/g sacarose)

*** o modelo teórico de Pirt (1965) não é aplicável.

(Sacarose) %		Concentração celular inicial Nº de cel x 10/ml	μ g (dia ⁻¹)	td (H)	Produtividade Biomassa g.p.s./l dia	YX/S* (g/g)	Y \dot{X} /S** (g/.g)	Taxa respiratória Máxima (μ M/l.dia)	ms g/g.p.s. h)
1,0	A	12,74	0,230	72,33	0,454	0,53	***	7,20	***
1,5	A	15,30	0,230	72,33	0,168	0,22	0,821	n.d.	***
2,0	A	7,120	0,590	28,21	0,492	0,53	0,570	7,90	0,01100
3,0	A	11,78	0,450	36,90	0,600	0,52	0,820	7,60	0,00860
4,0	A	9,300	0,180	92,40	0,252	0,35	***	6,90	0,00015
6,0	A	12,27	0,120	138,6	n.d.	n.d.	***	n.d.	***
8,0	A	15,10	0,100	166,4	0,329	0,29	***	7,10	***
2,0	B	5,28	0,450	36,90	1,030	0,56	***	13,3	***

Tabela 5.2. - Rendimento de biomassa aparantes e reais, produtividades de biomassa, taxas específicas de crescimento e coeficientes de manutenção de culturas de células em suspensão de diferentes espécies vegetais.

Espécie Vegetal	Biorreactor	Meio Nutriente	Yx/s (g/g)	Yx/s (g/g)	m (g/g P.S.h.)	μg (dia-1)	Produtividade Biomassa (g/l. dia)	Referências
C. roseus	Erlenmeyer	B5 2%	0,36	---	---	0,086	---	Courtoise e Guern, (1980)
		Sacarose	0,52	---	---	0,696	---	
C. roseus	Erlenmeyer	B5 2%	0,51	---	---	---	---	Maurel e Pareilleux, (1985)
		Sacarose	---	---	---	0,46/0,48	0,72/1,32	
C. roseus	Ferm. 10 l.	B5 2%	0,39/0,58	---	---	---	---	Ducos e Pareilleux, (1986)
		Glucose	0,37/0,56	---	---	0,46/0,50	---	Pareilleux e Vinas, (1983)
C. roseus	Ferm. 4 l.	B5 2%	0,78	---	---	0,48	0,60	
		Sacarose	---	---	---	---	---	
C. roseus	Air-Lift 7 l.	M3 2%	---	---	---	0,23	1,44	Scragg et al, (1990)
C. roseus	Air-Lift 30 l.	M3 6%	---	---	---	0,27	1,91	
C. roseus	Erlenmeyer	M3 2%	---	---	---	0,46	2,3	
C. roseus	Erlenmeyer	M3 6%	---	---	---	0,33	2,27	
N. Tabacum	Ferm. 30 l.	1% Sacarose	0,44	0,59	$3,6 \times 10^{-3}$	---	---	Kato e Nagai, (1979)
P. malus	Ferm. (41)	MS 4%	0,47	0,57	$3,2 \times 10^{-3}$	---	---	Pareilleux e Chaubet, (1981)
		Sacarose	---	---	---	---	---	
M. Sativa	Ferm. (41)	MS 3%	0,43	0,77	$4,7 \times 10^{-3}$	---	---	Pareilleux e Chaubet, (1981)
		Lactose	---	---	---	---	---	
F. Vesga	Erlenmeyer	MS 3%	0,39	---	---	0,12	---	Hong et al, (1989)
		Sacarose	---	---	---	---	---	
F. Vesga	Air-Lift (700)	MS 3%	0,44	---	---	0,14	---	Hong et al, (1989)
		Sacarose	---	---	---	---	---	
F. Vesga	Roller Bottle (1,85)	MS 3%	0,15	---	---	0,41	---	Hong et al, (1989)
		Sacarose	---	---	---	---	---	
D. deltoidea	Air-Lift (2.5.l)	MS 3%	0,78	---	---	---	0,14/1,06	Robertson et al, (1990)
		Sacarose	0,44	---	---	---	---	
E. californica	Erlenmeyer	MS 3%	0,42	0,68	0,0082	---	---	Taticek et al, (1989)
		Sacarose	---	---	---	---	---	
E. californica	Ferm. 1 l.	MS 3%	0,47	0,71	0,0031	---	---	Taticek et al, (1989)
		Sacarose	---	---	---	---	---	
E. californica	Air-Lift 1 l.	MS 3%	0,50	0,69	0,0016	---	---	Curtis et al, (1990)
		Sacarose	---	---	---	---	---	
P. somniferum	Erlenmeyer	MS 1,5%	0,27	---	---	---	---	Curtis et al, (1990)
		6% Sacarose	0,29	---	---	---	---	
N. tabacum	Quimostato 3 l	LS 0,8%	---	0,63	0,0062	---	---	ten Hoopen, (1992)
		Sacarose	---	---	---	---	---	
C. roseus	Quimostato 3 l	LS 0,8%	---	0,65	0,0083	---	---	ten Hoopen, (1992)
		Glucose	---	---	---	---	---	

5. Cinética do crescimento

Ensaio comparativos realizados em suspensões celulares de *C. roseus*, cultivadas em meio de cultura com 2% e 6%(p/v) de sacarose, evidenciaram um elevado aumento nos parâmetros medidores da biomassa para o meio de cultura com 6%(p/v) de substrato, comparativamente com o meio nutriente com 2%(p/v), acompanhado de um declínio na taxa específica de crescimento ($0,46 - 0,33 \text{ dia}^{-1}$) (Tabela 5.2.), para os teores mais elevados de substrato (Scragg *et al.* 1990). Idêntico padrão de variação foi obtido para valores das taxas específicas de crescimento da cultura de células de cardo, para 2% e 6% (p/v) de sacarose (Tabela 5.1.). Células em suspensão de *Euphorbia millii* evidenciaram uma maior acumulação de biomassa para um teor em sacarose de 5%(p/v) (Yamamoto *et al.* 1989). Winjnsma *et al.* (1986) obtiveram a maior taxa específica de crescimento com células em suspensão de *Cinchona ledgeriana*, cultivadas em meio de cultura com sacarose 4%(p/v). Em contraste, o crescimento de células em suspensão de *Papaver somniferum* é independente da concentração da sacarose presente no meio de cultura, para o intervalo de concentrações de sacarose 15-60 g/l (Curtis *et al.*, 1991). Segundo estes autores, o rendimento aparente de biomassa em função do substrato consumido é proporcional à quantidade de hidrato de carbono presente, contrariamente ao verificado em células em suspensão de cardo (Tabela 5.1.). A diminuição acentuada do rendimento aparente de biomassa ($Y_{x/S}$), para um teor de 8% (p/v) de sacarose na cultura celular de cardo, pode indicar uma acção inibitória da sacarose, quando esta se encontra em concentrações elevadas.

Tem sido largamente referido, que a cultura de células vegetais em suspensão em meio de cultura com elevadas concentrações de sacarose origina um decréscimo nas taxas específicas de crescimento (Phillips e Henshaw 1977, Drapeau *et al.* 1986, Fowler 1982, Miguel e Barroso 1992). Segundo Fowler (1982), uma concentração elevada de sacarose (6-8% p/v) no meio de cultura, gera uma elevada pressão osmótica, provavelmente responsável pela menor adaptabilidade das células vegetais em suspensão, ao crescimento.

A suspensão celular de *C. cardunculus*, estabelecida em meio de cultura com um baixo teor em hidratos de carbono (1% e 1,5% p/v), apresentou menores taxas específicas de crescimento. No entanto, quando o meio de cultura é suplementado com uma concentração de sacarose 1% (p/v), a produtividade de biomassa e o rendimento aparente são análogos aos valores determinados para 2%, o que sugere uma conversão total do substrato em biomassa sem perdas para a manutenção da célula ou metabolização secundária. Todavia, a fermentação realizada com um meio de cultura com sacarose 1,5% (p/v) mostra acentuada diminuição na produção de biomassa e no rendimento aparente ($Y_{X/S}$), o que poderá estar associado com a diminuição drástica da concentração em oxigênio dissolvido no meio nutriente observada ao longo desta fermentação (<30%), sugerindo limitação do crescimento celular pela diminuta quantidade de oxigênio presente. Este resultado, é concordante com o referido por Pareilleux e Vinas (1983), segundo os quais, existe linearidade entre a taxa respiratória de células em suspensão de *C. roseus* e o rendimento aparente de biomassa em culturas *in vitro*, em que o nutriente oxigênio é limitante.

A análise comparativa dos parâmetros de crescimento da cultura de células em suspensão de cardo (Tabela 5.1) e dos parâmetros de crescimento de células vegetais em suspensão referidos na literatura (Tabela 5.2.), revela que os rendimentos aparentes de biomassa, determinados em função dos hidratos de carbono consumidos da suspensão celular de cardo, se enquadram nos valores referidos por diversos autores, à exceção dos casos em que existem potenciais factores inibitórios (1,5% e 8% p/v), como foi discutido nos parágrafos anteriores. A produtividade máxima de biomassa, obtida para a suspensão celular de *C. cardunculus* (0,600 g p.s./g.l), para um teor em sacarose de 3% (p/v) (Tabela 5.1.), é, duma maneira geral, inferior à produtividade obtida para células em suspensão de *C. roseus* (Scragg *et al.*, 1990), mas situa-se no intervalo de valores referido para a cultura celular de *D. deltoidea* (Robertson *et al.* 1989) e é idêntica à referida por Pareilleux e Vinas (1983) (Tabela 5.2.).

O crescimento da suspensão de células de cardo efectuado em biorreactor munido com duas turbinas, apresenta uma maior taxa respiratória (Tabela 5.1.), e um assinalável aumento na produtividade de biomassa, mantendo-se, no entanto, o rendimento aparente de biomassa e a taxa específica de crescimento nos níveis de valores obtidos em fermentador de monoturbina. Estes resultados atestam a importância do "design" do reactor na produção de metabolitos, situando-se esta afirmação, na linha dos resultados obtidos no capítulo 3. A discrepância entre os resultados obtidos nos dois tipos de reactores, pode residir na diminuição acentuada do crescimento celular observada nas paredes do biorreactor de duas turbinas, devido à posição de uma dessas turbinas se encontrar próxima da superfície da suspensão líquida, dificultando a adesão das células à parede do vaso do biorreactor. Uma outra justificação não menos importante, relaciona-se com a possibilidade de agitar diariamente o vaso do reactor de 2 turbinas (Applikon), facilitando o desprendimento dos agregados celulares, que, entretanto tenham aderido às paredes, operação impossível de realizar no reactor SGI ou LH Fermenter, pela configuração do suporte de base do vaso reaccional. Refira-se ainda, que os valores iniciais do coeficiente de transferência volumétrica de massa $-k_L a$ são idênticos ($6,07 \text{ h}^{-1}$ - $6,4 \text{ h}^{-1}$), em ambos os biorreactores, o que invalida a hipótese do efeito do "stress" hidrodinâmico, como possível responsável pela menor produtividade em biomassa nos fermentadores de monoturbina.

Da Fig.5.6. depreende-se que a depleção da fonte de carbono influencia acentuadamente a actividade respiratória em células de *C. cardunculus* em suspensão, particularmente na situação em que as reservas de glúcidos são mínimas (10 g/l sacarose). Neste caso, observa-se, concomitantemente, uma ligeira diminuição da biomassa produzida (peso fresco, peso seco) de *Cynara cardunculus*..

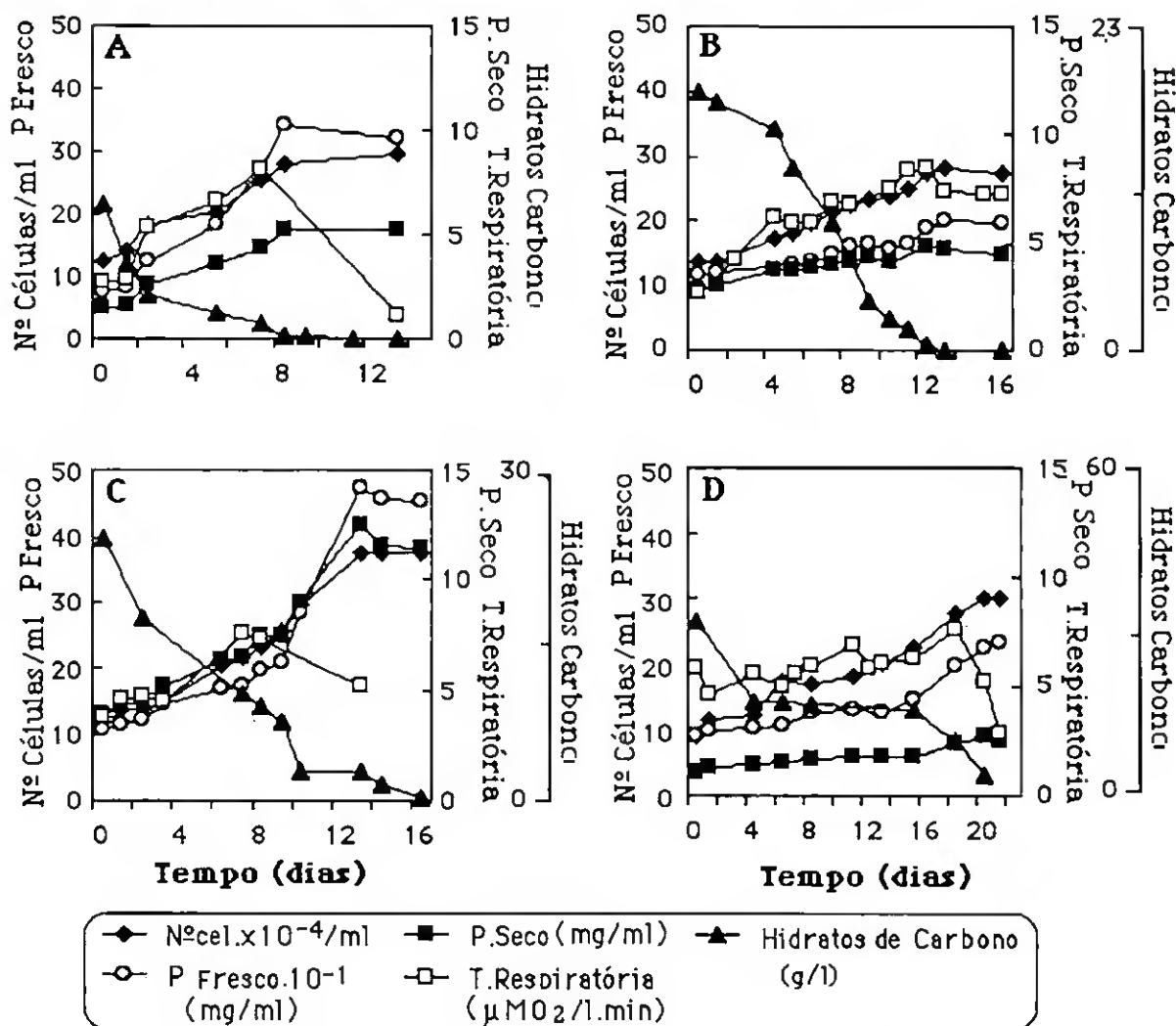


Fig. 5.6 Influência de diferentes teores iniciais de sacarose no crescimento celular da suspensão celular de *Cynara cardunculus* em fermentador descontínuo. Consumo dos hidratos de carbono ao longo do crescimento. A- 1%; B- 2%; C- 3%; D- 4%.

Comportamento bem diferente, foi registado em células em suspensão de *E. californica*, em que o esgotamento dos hidratos de carbono não levou ao decréscimo da actividade respiratória, o que foi justificado pela eventual presença de amido vacuolar (Taticek *et al.* 1990). Contudo, estes autores observaram um decréscimo na acumulação de biomassa, aquando da exaustão dos glúcidos, à semelhança do descrito para células em suspensão de *C. cardunculus*. Pareilleux e Chaubet (1981) referem, igualmente, diminuição no peso seco e no peso fresco, após esgotamento da

5. Cinética do crescimento

sacarose, no meio de cultura de células em suspensão de *Medicago sativa*. Decorrente ainda da Fig. 5.6., verificou-se que para o ensaio realizado com meio nutriente com 2%(p/v) de sacarose, o consumo dos glúcidos ocorre cerca do 12º dia do ciclo de crescimento (Fig.5.6.B), enquanto que no teste efectuado com meio de cultura suplementado com sacarose 3%(p/v), o consumo total de hidratos de carbono do meio extracelular ocorre ao fim de 16 dias, o que conduziu a um prolongamento da fase exponencial-linear (Fig.5.6.C), com o subsequente aumento na produção de biomassa (Tabela 5.1.), como já foi referido.

Nos ensaios realizados em meio de cultura com uma concentração em sacarose de 4%(p/v), o declínio da taxa respiratória observado a partir do 18º dia do ciclo de crescimento da cultura celular de *C. cardunculus*. (Fig.5.D), não corresponde à exaustão da sacarose, o que reflecte, provavelmente, limitações no teor de oxigénio dissolvido no meio de cultura, que apresentou valores da ordem de grandeza dos 15%(v/v) durante o período referido.

Como descrito na introdução deste capítulo, a sacarose apresenta duplicidade de funções no metabolismo celular vegetal. Actua simultâneamente, como fonte de carbono e de energia. Tal, torna difícil a distinção entre o valor do rendimento catabólico e anabólico da fonte de carbono. Diversas abordagens teóricas têm sido feitas nesta perspectiva, em que a definição dos parâmetros cinéticos do rendimento aparente e real de biomassa são parte importante.

O coeficiente de rendimento aparente $Y_{X/S}$, exprime uma taxa global de acumulação de biomassa por unidade de massa de substrato consumido e traduz um conceito de rendibilidade, o que leva muitos autores, mormente micologistas, a denominarem-no por coeficiente económico. Os rendimentos aparentes de biomassa em função do açucares totais consumidos ($Y_{X/S}$) determinados em sistema descontínuo, para células em suspensão de *C. cardunculus*

para concentrações distintas de substrato (Tabela 5.1.), enquadraram-se no conjunto de valores citados na literatura (Tabela 5.2.). Assinale-se, que a maioria dos autores apenas refere o rendimento aparente de biomassa.

O coeficiente de rendimento real de biomassa, calculado em função dos glúcidos consumidos ($Y'_{x/S}$), quantifica a energia necessária ao crescimento celular, enquanto o coeficiente de manutenção celular (m) estima a energia necessária à manutenção da célula de cardo, segundo o modelo de Pirt (1975), em que é pressuposto linearidade entre a taxa específica de consumo de hidratos de carbono e a taxa específica de crescimento μ_g . Na suspensão celular de cardo, a referida linearidade só se verificou para as concentrações 1,5% 2% e 3% (p/v) de sacarose, o que infirma a generalização deste modelo para baixas ou elevadas concentrações de substrato.

Na tabela 5.1. pode ainda observar-se que os valores dos coeficientes de rendimentos reais de biomassa em função dos glúcidos totais, determinados para culturas de células de cardo em suspensão, são mais elevados do que os correspondentes coeficientes de rendimento aparentes de biomassa (Tabela 5.1.), o que está de acordo com o padrão de variação registado por diversos autores para diferentes culturas em suspensão de células vegetais (Tabela 5.2.). Tal, pode ser interpretado como a menor utilização da fonte de carbono na produção de biomassa, disponibilizando assim, energia para a manutenção celular, o que está em concordância com as hipóteses teóricas formuladas pelo modelo de Pirt (1975).

O aumento do coeficiente de rendimento real de biomassa ($Y'_{x/S}$), a que corresponde uma diminuição do coeficiente de manutenção quando a concentração da sacarose no meio de cultura é alterada de 2% (p/v) para 3% (p/v), está de acordo com os resultados de Taticek *et al.* (1990) para culturas em suspensão de *E. californica*, em que um elevado consumo energético para a manutenção celular esteve associado a um menor rendimento global de biomassa.

Muito provavelmente, e segundo interpretação feita por Beeftink *et al.* (1990), a partir do momento em que verifica o consumo total dos hidratos de carbono, a energia necessária para a manutenção celular da suspensão do cardo pode provir da degradação da biomassa, o que pode justificar o decréscimo observado no peso fresco e peso seco, quando a suspensão é mantida em meio de cultura B5, suplementado com 1% e 2%(p/v), após a exaustão da fonte de carbono (Fig. 5.6.A e Fig.5.6.B.).

A disparidade de valores entre o rendimento aparente e o rendimento real de biomassa de células de cardo, encontrada para a fermentação realizada para 1,5% sacarose (Tabela 5.1.), pode ser atribuída ao facto do oxigénio se encontrar em concentração limitante (<30%), como foi discutido em parágrafos anteriores.

Os valores dos rendimentos de biomassa reais determinados para a cultura celular de *C. cardunculus* (Tabela 5.1.) enquadram-se, genericamente, no intervalo de valores referidos na literatura (Tabela 5.2.). O mesmo não se verificou, no entanto, para os coeficientes de manutenção, em que somente, o coeficiente de manutenção determinado para a concentração de substrato 2%(p/v) é análogo aos referidos na literatura (Tabela 5.2.). Este comportamento pode estar relacionado com limitações intrínsecas do modelo de Pirt, em que não é considerado a formação de produtos ou a exaustão de substrato, visto tratar-se de um modelo físico tipo "caixa negra", aplicável a sistemas microbianos, em que a composição celular pode considerar-se invariável durante o ciclo de crescimento, o que não acontece na célula vegetal.

Neste contexto, e atendendo às limitações encontradas ao modelo de Pirt (1975), foi testada a aplicabilidade do modelo não estruturado de Beeftink *et al.* (1990) para o crescimento da cultura de células em suspensão de *C. cardunculus* em meio de cultura com 2%(p/v) de sacarose. Foram calculados o coeficiente de rendimento de biomassa real $Y'_{X/S}$ e o coeficiente de manutenção m_s , de acordo com a expressão matemática (5.30.). Esta equação engloba uma parcela

referente à taxa de consumo de substrato necessário para a formação de produtos finais do metabolismo (van Gulik, 1990).

$$q_s = \frac{\mu_g}{Y'_{X/S}} + \frac{q_p}{Y_{F/S}} + m_s \quad (5.30.)$$

$Y_{F/S}$ - Produção de fenóis por unidade de glúcidos totais consumidos.

q_p Taxa específica de produção de fenóis

A hipótese de que, os metabolitos predominantemente produzidos pelas células em suspensão de cardo seriam os fenóis e que os coeficientes de rendimento de biomassa e de produção de fenóis seriam idênticos ($Y_{X/S} = Y_{F/S}$), permitiu reescrever a expressão 5.30.

$$q_s = \frac{\mu_g + q_p}{Y'_{X/S}} + m_s \quad (5.31.)$$

Os parâmetros cinéticos $Y'_{X/S}$ e m foram determinados para a cultura de células em suspensão de *C. cardunculus*, pela regressão linear das variáveis q_s e $\mu_g + q_p$ e constam da Tabela 5.3. A taxa específica de produção de fenóis (q_p) foi calculada para os ensaios com sacarose 2% (p/v), obtendo-se um valor médio de 0,034 mg fenol/g p.s. dia.

Tabela 5.3. Estimativa dos parâmetros de rendimento real de biomassa e coeficiente da manutenção de células em suspensão de *Cynara cardunculus*, mantidas em meio B5 com 2% sacarose (modelo Beeftink *et al.* 1990). Foram calculados os intervalos de confiança 95% para cada um dos parâmetros.

$Y'_{X/S}$ (g/g)	0,58 ± 0,02
m (g/g peso seco h ⁻¹)	0,0066 ± 0,0011

A coincidência dos intervalos de confiança dos valores de rendimentos reais, calculados através duma abordagem do modelo de Beeftink *et al.*, (1990) (Tabela 5.3.) e do modelo de Pirt, (1975) (Tabela 5.1.) e a similitude dos valores estimados para o coeficiente de manutenção, permite formular a hipótese, de que para o caso estudado (meio de cultura com 2% sacarose), os modelos se equivalem. Assim, e de acordo com o modelo de Beeftink *et al.* (1990), a energia de manutenção celular será fornecida pelo substrato, em situação de não esgotamento deste, e pelo metabolismo endógeno de degradação de biomassa, após o consumo da fonte de carbono.

É de sublinhar no entanto, que a determinação dos parâmetros cinéticos $Y'_{x/S}$ e m_S teria maior acuidade, se calculados em sistema contínuo, visto permitir fixar o valor da taxa específica de crescimento durante longos períodos de tempo (van Gulik *et al.*, 1992) e, subsequentemente, calcular com maior rigor a taxa específica de consumo de hidratos de carbono para cada uma das taxas específicas de crescimento estipuladas.

Schnapp *et al.* (1991a) propuseram o cálculo de Y'_G e m através de um sistema semi-contínuo. Estes autores realçaram as dificuldades de estabelecimento de culturas contínuas de células vegetais e discutiram as limitações destas determinações em sistema descontínuo, referindo que, na fase de crescimento celular exponencial, a constância da taxa específica de crescimento impossibilita este cálculo e na fase de variação negativa da taxa específica de crescimento, a sua curta duração introduz dificuldades e instabilidade nas determinações.

Note-se ainda, que a interpretação dos parâmetros cinéticos referentes à cultura celular de *C. cardunculus* segundo os modelos de Pirt (1975) ou de Beeftink *et al.* (1990), não considera o consumo de fósforo durante o metabolismo e a sua importante função condicionadora do crescimento celular. Curtis *et al.* (1991) desenvolveram modelos, numa abordagem matemática do

crescimento celular de *Papaver somniferum*, em que a acumulação de biomassa é função da concentração em fósforo inorgânico existente no meio de cultura. Após o desenvolvimento de um modelo estruturado em cultura contínua, Van Gulik *et al.* (1993) concluíram, que o crescimento celular depende, não só da disponibilidade da glucose, mas também do fósforo presente no vacúolo durante o crescimento celular de *C. roseus* em suspensão. O rendimento global de uma fermentação é condicionado pela quantidade de substrato(s) limitante(s) do processo e do oxigênio necessário para produzir biomassa e produtos finais do metabolismo.

Apesar das limitações reconhecidas dos modelos não estruturados e, particularmente, do modelo clássico de Monod, quando aplicado a células vegetais, este modelo tem sido aplicado, com sucesso, em crescimentos de culturas de suspensões celulares distintas (*Dioscorea deltoidea*, *Nicotiana tabacum*, *Acer pseudoplatanus*-Tabela 5.4.), permitindo, através da determinação dos coeficientes cinéticos K_m e μ_{max} , avaliar a afinidade relativa do organismo para o substrato e a taxa específica de crescimento máxima.

Na Tabela 5.4. são comparadas as constantes cinéticas características da utilização da fonte de carbono no crescimento da suspensão celular de *C. cardunculus*, com as constantes cinéticas referidos na literatura. Os coeficientes K_m e μ_{max} foram determinados para teores de sacarose no intervalo 1- 4 % (p/v) de acordo com a representação de Lineweaver- Burk representada na Fig. 5.7. O desvio encontrado para concentrações de substrato 6% e 8% (p/v) sugere, de novo, a introdução de factores inibidores do crescimento celular, quando se utilizam elevadas concentrações de sacarose.

O valor de K_m obtido para células de cardo em suspensão (88 mM) é bastante mais elevado do que os referidas em culturas celulares de *Nicotiana tabacum* e *Acer pseudoplatanus* (Tabela 5.4.) e cerca de

5. Cinética do crescimento

Tabela 5.4. Comparação das constantes cinéticas características da utilização da fonte de carbono no crescimento celular de *C. cardunculus* com outras constantes referidas na literatura.

Espécie Vegetal	Substrato	Km (mM)	μ_{MAX} (dia ⁻¹)	μ_{MAX}/K_m (dia ⁻¹)	Referência
<i>C. cardunculus</i>	Sacarose	88,0	0,88	0,010	Este trabalho
<i>D. deltoidea</i>	Sacarose	20,5	0,35	0,017	Drapeau <i>et al.</i> , (1986)
<i>N. tabacum</i>	Glucose	1,40	0,92	0,657	Kato e Tsuji (1981)
	Frutose	5,20	0,92	0,177	
<i>A. pseudoplatanus</i>	Glucose	0,50	—	—	King, (1977)

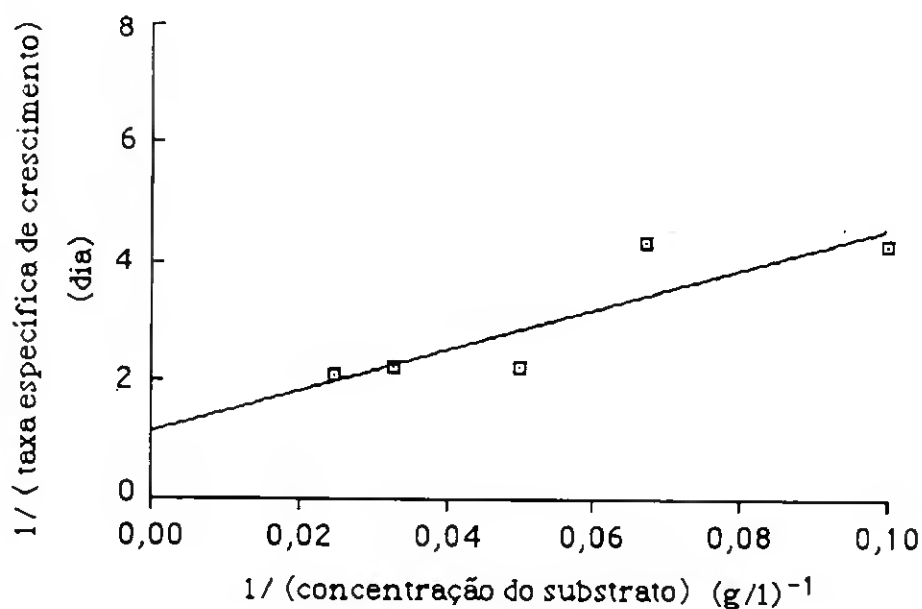


Fig.5.7. Representação de Lineweaver-Burk para a cinética de crescimento da suspensão celular de *Cynara cardunculus*

quatro vezes mais elevado do que o referido para *Discorea deltoidea* (20,5 mM), o que permite supor uma menor afinidade da

sacarose para a invertase ácida, localizada nas paredes celulares de cardo, responsável pela hidrólise da sacarose em glucose e frutose.

Da análise da Tabela 5.4. verifica-se, que embora os parâmetros cinéticos K_m e μ_{max} definidos para *C. cardunculus* sejam diferentes dos referidos para *D. deltoidea*, apresentam uma eficiência catalítica semelhante, visto os quocientes μ_{max}/K_m serem similares.

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

5.4.2. Influência da fonte de carbono na actividade proteolítica e na produção fenólica de células em suspensão de *C. cardunculus* em sistema descontínuo.

Na perspectiva de estudar a influência da fonte de carbono na produção de metabolitos pela suspensão celular de cardo, avaliou-se quantitativamente a actividade proteolítica e a produção fenólica ao longo do ciclo de crescimento, para diferentes concentrações iniciais de sacarose (1%, 2%, 3%, 4%, 6% e 8%).

A análise da Fig. 5.8. mostra que a melhor resposta da actividade azocasenolítica específica, a diferentes teores iniciais da fonte de carbono, foi obtida no 6º dia de crescimento da cultura celular de cardo nos meios de cultura com 4%(p/v) de sacarose (0,0051 U/gp.s.- Fig.5.8D) e com 6% de sacarose (0,0072 U/gp.s.-Fig.5.8.E). Estes valores, são, contudo inferiores aos observados no ensaio realizado em erlenmeyer em meio de cultura B₅ suplementado com fosfato 12,5 mM Pi (0,0095 U/gp.s.) (Fig. 4.13 do capítulo anterior)

5. Cinética do crescimento

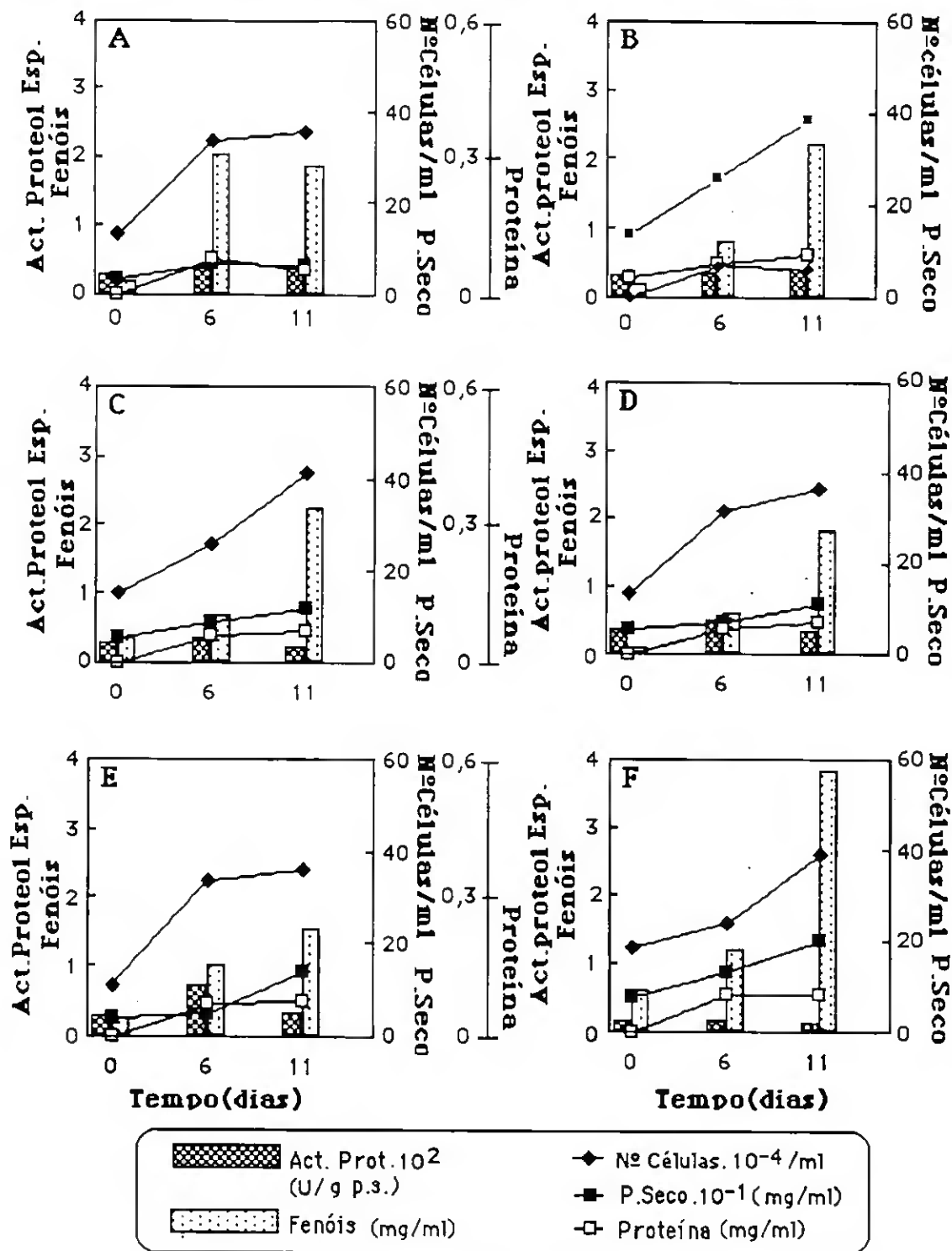


Fig. 5.8. Influência do teor inicial em sacarose no meio basal B₅, na actividade proteolítica específica e na produção fenólica em células em suspensão de *C. cardunculus*, determinadas em "erlenmeyer". A - 1%; B - 2%; C - 3%; D - 4%; E - 6%; F - 8%.

ou nos testes realizados com um maior teor em azoto inorgânico (0,0098 U/g p.s.-meio B_D e 0,0105 U/g p.s.B_F) (Fig. 4.15), o que sugere, que a actividade proteásica da suspensão celular de *C. cardunculus* não depende, particularmente, da disponibilidade da fonte de carbono do meio de cultura.

A actividade azocaseinolítica específica da suspensão celular de *C. cardunculus* (Fig.5.8.) decresce no 11^o dia do ciclo de crescimento, em particular para concentrações iniciais de sacarose 3%, 4%, 6% (p/v). Este facto, poderá estar associado com a alteração do quociente entre a concentração da fonte de carbono e a concentração da fonte de azoto (C/N) e, particularmente, com a exaustão do azoto (nitrato e amónio) que ocorre cerca dos 11^o e 12^o dia em meio de cultura B₅. Como é referido por Rho e André (1991), a relação dos nutrientes fornecedores de carbono e do azoto é determinante no crescimento celular vegetal e no metabolismo primário. A partir do momento em que o azoto se torna inexistente no meio extracelular, as proteases deixariam de ser sintetizadas pela célula de cardo o que é concordante com os resultados descritos no capítulo 4, em que a actividade proteolítica declina rapidamente após o 11^o dia do crescimento.

Na Tabela 5.5. apresentam-se os valores médios das actividades proteolíticas específicas médias e as produtividades proteásicas de culturas celulares de *C. cardunculus* determinadas para as diferentes concentrações de açúcar em "erlenmeyer". A sua análise, revela igualmente, que as maiores actividades azocaseinolíticas específicas se obtêm para as concentrações de 4%(p/v) e 6% (p/v) da fonte de carbono, tendo-se obtido a maior produtividade proteásica para 6%(p/v) de sacarose.

O ensaio realizado em meio de cultura B₅ suplementado com 8%(p/v) sacarose, revelou actividades proteolíticas específicas reduzidas (Fig.5.8F e Tabela 5.5) e uma baixa produtividade proteásica (1,60 U/Kl.dia), em paralelo com um acentuado aumento da produção fenólica (Fig. 5.8F).

5. Cinética do crescimento

Tabela 5.5. Influência do teor em sacarose na actividade proteolítica específica média e na produtividade proteásica em células em suspensão de *C. cardunculus*, mantidas em "erlenmeyer". Foram calculados os intervalos de confiança 95% para as actividades proteolíticas médias.

Sacarose (%)	Produtividade Proteásica (U/Kl. dia)	Act. Proteolítica Específica Média (U/g P.S.)
1	1,54	0,0037 ± 0,0007
2	2,35	0,0036 ± 0,0004
3	2,84	0,0030 ± 0,0006
4	2,33	0,0040 ± 0,0009
6	4,20	0,0044 ± 0,0022
8	1,60	0,0017 ± 0,0002

Estes resultados apoiam a hipótese anteriormente formulada (capítulo 4), em que o aumento da produção de metabolitos secundários é antagónico da produção de proteases. Knoblock e Berlin (1980) referiram igualmente, um aumento da acumulação de fenóis em células em suspensão de *C. roseus* quando mantidas em meio nutriente com 8%(p/v) de sacarose. Do mesmo modo, em células em suspensão de *Cinchona ledgeriana* foi referida uma produção máxima do metabolito secundário, antraquinona, para uma concentração de sacarose 8% (p/v) (Wijnsma *et al.* 1986). Em concordância com estes autores, a quantidade de sacarose presente no meio nutriente seria um factor determinante da produtividade dos metabolitos secundários.

A suspensão celular de *C. cardunculus* em "erlenmeyer" (Fig. 5.8.) evidencia uma acentuada acumulação de fenóis ao longo do crescimento celular, com particular incidência no início da fase estacionária (11^o dia), para qualquer dos ensaios realizados com teores de sacarose entre 2% e 8%(p/v). Para o meio de cultura com a menor concentração em açúcar (1% p/v), constatou-se uma diminuição da produção fenólica a partir do 10^o dia do ciclo de

crescimento. O decréscimo registado na concentração fenólica é, muito provavelmente, devido à exaustão da fonte de carbono observada a partir do 8º dia (Fig.5.6A).

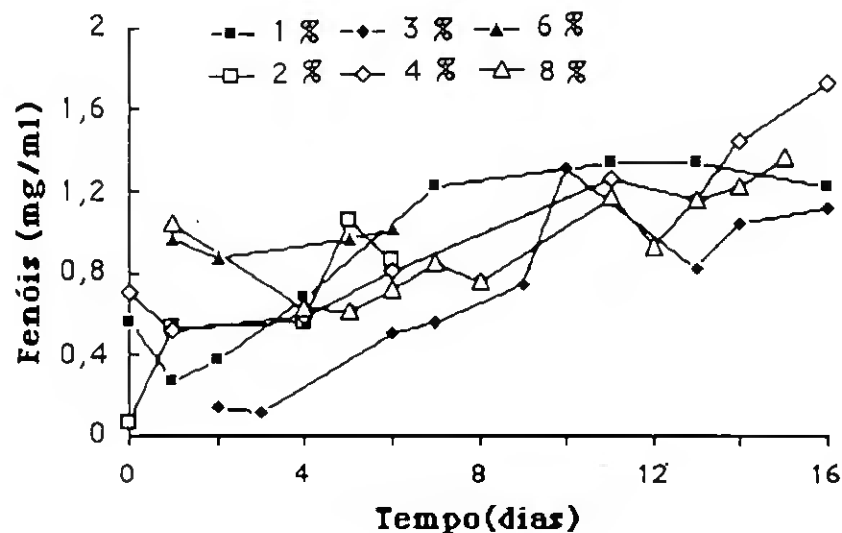


Fig. 5.9. Influência do teor inicial de sacarose (1, 2, 3, 4, 6, 8 % p/v) presente no meio basal B5, na produção fenólica de células em suspensão de *C. cardunculus* durante o ciclo de crescimento em fermentador descontínuo.

Na Fig.5.9. reporta-se, o efeito da quantidade de hidratos de carbono presentes no meio nutriente na síntese de fenóis nas células em suspensão de cardo mantidas em biorreactor. Independentemente da concentração inicial de substrato, verificou-se um perfil de variação temporal semelhante, seguindo um padrão de variação idêntico ao obtido em "erlenmeyer" (Fig.5.8.), ou seja, a acumulação fenólica aumentou ao longo do ciclo de crescimento celular da suspensão de *C. cardunculus*. Phillips e Henshaw (1977) relacionaram a acumulação fenólica com a relação azoto/hidrato de carbono existente no meio de cultura. Assim, na presença da fonte de azoto, os açúcares seriam utilizados preferencialmente na via biossintética de proteínas (metabolismo primário). Em contrapartida, após a depleção da fonte de azoto no meio, os hidratos de carbono seriam metabolizados para a produção fenólica (Sahai e Shuler 1984, Lips *et al* 1987). De uma maneira geral, pode dizer-se, que na maioria das culturas de células em suspensão, o

5. Cinética do crescimento

aumento em teor de hidratos de carbono conduz a um crescimento mais lento (como referido em 5.4.1.) e a uma maior produção de fenóis (Phillips e Henshaw 1977, Daie *et al.* 1987, Miguel e Barroso 1992, Figueiredo 1992), o que está em concordância com os resultados obtidos para a cultura de células em suspensão de *C. cardunculus*.

Sahai e Shuler (1984) referem que a maior ou menor produção fenólica pode ser um importante indicativo do estado de viabilidade celular, estando normalmente associados ao "stress" nutricional (Lima Costa, 1987). Todavia, e segundo Knobloch e Berlin (1980), a influência positiva de elevadas concentrações de sacarose no metabolismo secundário pode ser de natureza osmótica ou pode dever-se a alterações metabólicas.

Em células em suspensão de *C. cardunculus* não se verificou interdependência da acumulação proteica em função do substrato, à excepção do meio de cultura com sacarose 1% (p/v), em que se constatou uma diminuição do teor proteico a partir do 6º dia de crescimento (Fig. 5.8.A). Este facto pode ser atribuído à limitação de fonte de carbono, tal como observado relativamente a outros parâmetros de crescimento, o que sugere a existência de necrose celular, a partir do esgotamento da fonte de carbono, na situação de baixa concentração inicial de sacarose (1% p/v) (Fig. 5.8.A).

CAPÍTULO 6

Crescimento da cultura de células em suspensão de *C. cardunculus* em sistemas contínuo e semi-contínuo

6.1. Metodologia e Objectivos

6.2. Cinética de Crescimento em Cultura Contínua e Semi-contínua

6.2.1. Aspectos gerais

6.2.2. Desvios à idealidade do sistema contínuo

6.2.3. Cultura semi-contínua

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* em quimiostato modificado e em fermentador semi-contínuo.

6.3.2. Actividade proteolítica e produção fenólica das células em suspensão de *Cynara cardunculus*.

6.1. METODOLOGIA e OBJECTIVOS

Realizaram-se ensaios em quimiostato modificado (Van Gulik *et al.* 1989) para diferentes taxas de diluição, tendo como nutriente limitante a sacarose (8 g/l) (Fig.6.1.). Pretende-se com este estudo, verificar a adequação de células em suspensão de *Cynara cardunculus*, ao sistema contínuo de cultura e determinar os parâmetros cinéticos de crescimento da referida cultura celular.

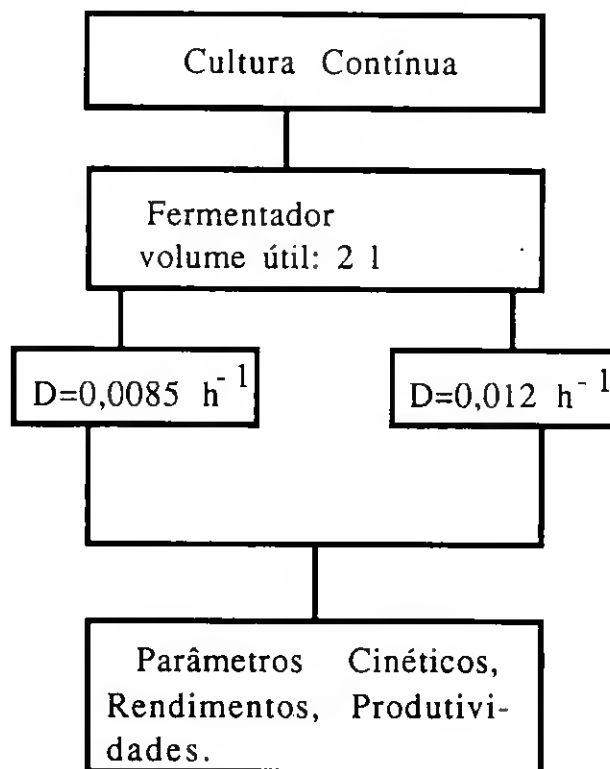


Fig. 6.1. Esquema organizativo dos ensaios realizados em cultura contínua de células em suspensão de *Cynara cardunculus*.

Caracterizaram-se dois estados de crescimento estacionário fisiológico em função dos parâmetros de crescimento, (peso fresco, peso seco, n^o de células/ml), consumo dos nutrientes (fosfato, sacarose, nitrato, amónia), consumo de oxigénio e produção de

fenóis. As actividades proteolíticas da suspensão celular foram determinadas durante cada uma dessas fases. Foram calculados os rendimentos de biomassa em função de cada um dos nutrientes estudados e as produtividades de biomassa e proteásicas.

A cultura semi-contínua foi estabelecida em fermentador de monoturbina, com o intuito de averiguar o comportamento cinético da suspensão celular de cardo e prolongar a fase exponencial de crescimento numa perspectiva de aumentar o período de produção associado ao crescimento. Foram quantificados parâmetros de produção de biomassa, de fenóis, de proteases e de consumo de nutrientes, tal como referido no parágrafo anterior.

6.2. CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM CULTURA CONTÍNUA E SEMI-CONTÍNUA.

6.2.1. Aspectos gerais

O crescimento celular em cultura contínua permite que as populações celulares atinjam um estado de equilíbrio, caracterizado pela ausência de alterações metabólicas e pela constância da taxa específica de crescimento. Este estágio celular é denominado fase estacionária e é apenas limitado pela concentração de um ou vários nutrientes do meio de crescimento -nutriente limitante-. É atingível, porque à remoção contínua da suspensão celular e a subsequente reposição do meio nutriente se efectua com taxas iguais.

Num processo descontínuo, os parâmetros quantificadores da biomassa (peso seco, peso fresco, n^o de células/ml), o pH, a concentração dos nutrientes e dos produtos metabólicos, a taxa de consumo de oxigénio e a produção de dióxido de carbono variam

durante a fermentação. O crescimento cessa quando ocorre a exaustão de nutrientes ou devido à acumulação de produtos tóxicos. Num processo contínuo, as células são mantidas em ambiente inalterado, em que, quer os parâmetros internos quer os exteriores à célula, se mantêm constantes durante a fase estacionária. Este facto, permite que o sistema de cultura contínua constitua um importante instrumento teórico de abordagem ao estudo do metabolismo celular, cinética de crescimento e sua modelização. A produção de biomassa e de metabolitos primários ou secundários em contínuo, poderá ser uma vertente de aplicação industrial da técnica de quimiostato.

A taxa de crescimento celular, em sistemas contínuos, pode ser controlada pelo fluxo do nutriente -quimiostato- ou pela manutenção da densidade celular, controlada por um sistema fotoeléctrico -turbidostato-. A abordagem matemática em ambos as situações é descrita por balanços de massa (Pirt.1975)

A - Balanço de massa da densidade celular

Acumulação celular no reactor = Quantidade de células no meio nutriente - Quantidade de células no efluente + Crescimento celular - Morte celular

Matematicamente exprime-se pela seguinte expressão:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{F X_0}{V} - \frac{F X}{V} - \mu X - \alpha X \quad (6.1.)$$

em que:

- F- Fluxo de meio nutriente (l. h⁻¹)
- V- Volume útil do reactor (l)
- X₀- Concentração celular no meio nutriente (g/l)
- X- Concentração celular no meio reactor (g/l)
- μ_g- Taxa específica de crescimento (h⁻¹)
- α- Taxa específica de morte (h⁻¹)

$$\text{Como } \frac{FX_0}{V} = 0 \quad \text{e} \quad \mu \gg \alpha \quad (6.2.)$$

6. Cultura contínua

A expressão (6.1) pode escrever-se :

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{F}{V}x + \mu_g x \quad \text{em que } D = F/V$$

$$\frac{dx}{dt} = x \cdot (\mu_g - D) \quad (6.3.)$$

Em fase estacionária : $\frac{dx}{dt} = 0$ e $\mu_g = D$

B - Balanço de massa relativo ao nutriente limitante.

Acumulação= nutriente	Concentração- nutriente reactor	Concentração- nutriente no efluente	Consumo do nutriente pelas células em crescimento	consumo do - nutriente para manutenção	consumo do nutriente para formação do produto
--------------------------	---------------------------------------	---	--	--	--

$$\frac{dS}{dt} = \frac{FS_0}{V} - \frac{FS}{V} - \frac{\mu_g X}{Y_{x/S}} - m_x - \frac{q_p X}{Y_{P/S}} \quad (6.4.)$$

em que:

- S_0 - Concentração inicial do nutriente limitante (g/l)
- S - Concentração do nutriente limitante no reactor (g/l)
- $Y_{x/S}$ - Rendimento de biomassa (g peso seco formado/g nutriente consumido)
- $Y_{P/S}$ - Rendimento do produto formado (g produto formado/g nutriente consumido)
- m - Coeficiente de manutenção (g nutriente consumido/g peso seco.hora)
- μ_g - Taxa específica de crescimento (h^{-1})
- q_p - Taxa específica de formação do produto (g produto formado/l.h)

Na situação de $m_x \ll \frac{\mu_g X}{Y_{x/S}}$ e sem formação de produto

a expressão 6.4 pode escrever-se sob a seguinte forma:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{FS_0}{V} - \frac{FS}{V} - \frac{\mu_g X}{Y_{x/S}} \quad (6.5.)$$

Como em fase estacionária:

$$\frac{F}{V} = D \quad \text{e} \quad \frac{dS}{dt} = 0 \quad (6.6)$$

a expressão (6.5) toma a forma:

$$\frac{\mu_x}{Y_{x/S}} = D (S_0 - \bar{S}) \quad (6.7)$$

$$\bar{X} = Y_{x/S} (S_R - S) \quad (6.8)$$

\bar{X} - Densidade celular em fase estacionária

\bar{S} - Concentração do nutriente limitante em fase estacionária

As equações (6.3) e (6.8) descrevem matematicamente a fase estacionária fisiológica de crescimento de uma cultura celular em sistema contínuo (Pirt, 1975)

6.2.2. DESVIOS À IDEALIDADE DO SISTEMA CONTÍNUO.

Os modelos teóricos de abordagem ao estudo da cultura de células em suspensão pressupõem a homogeneidade morfológica, bioquímica, biofísica celular em ambiente completamente controlado, ou seja, aproximação ao modelo ideal. Agregação celular, crescimento celular na parede do reactor, sensibilidade das células à agitação mecânica e formação de depósito no biorreactor são os parâmetros referidos por Sahai e Shuler (1982) como indicadores da não idealidade da cultura de células vegetais em sistema contínuo. Os mesmos autores, definiram o coeficiente C_e/C_{av} como indicativo da maior ou menor homogeneidade conseguida na agitação da cultura celular em reactor (C_e -Concentração celular no efluente; C_{av} -Concentração celular média no reactor). Segundo os mesmos os autores, quando $C_e = C_{av}$, a situação experimental está próxima da ideal.

Um dos efeitos do crescimento celular na parede do fermentador é a redução da possibilidade de "wash-out" para elevadas taxas de diluição e a introdução de um erro por excesso, na determinação das taxas específicas de crescimento. Takayma *et al.* (1977) observaram

6. Cultura contínua

que o íon cálcio ($0,1 \text{ mM Ca}^{2+}$) diminuía a adesão às paredes do reactor.

Segundo van Gulik *et al.* (1990), as condições de aplicabilidade do sistema de crescimento em contínuo a uma cultura de células vegetais, são as seguintes:

- * Agitação homogénea
- * Composição do efluente igual à composição da cultura no interior do reactor
- * Identificação do nutriente limitante
- * Caracterização de todos os fluxos de entrada e saída do fermentador.
- * Comportamento de fase estacionária após, pelo menos, 3 tempos de residência.

Apesar de, no actual estágio dos conhecimentos, a idealidade do sistema contínuo não ser atingível do ponto de vista experimental, foram caracterizadas com sucesso, diversas fases de crescimento estacionário em cultura de células vegetais (Tabela 6.1)

Como se referiu anteriormente o estágio de crescimento celular caracterizado por uma taxa específica de crescimento constante, pode depender apenas da concentração de um dos nutrientes do meio ambiente- nutriente limitante-. Este varia com a cultura celular e respectivo meio de crescimento. Têm sido referidos na literatura, crescimentos limitados pela fonte de carbono, fonte de azoto, fonte de fósforo (Tabela 6.1). Todavia, nem sempre foram referidos os rendimentos de biomassa, as constantes cinéticas K_m e V_{max} , as características da agitação e a eficiência do sistema de recolha do efluente.

Tabela 6.1. Sistemas de cultura contínuas e semi-contínuas para diferentes espécies, diferentes taxas de diluição e diferentes nutrientes limitantes

Espécie vegetal	Tipo de sistema	Taxa de diluição (h ⁻¹)	Composição do meio nutriente	Temperatura e pH	Fonte de carbono	Nutriente Limitante	μ MAX (h ⁻¹)	Ks (mM)	Yx/s g/g	Referências
<i>Acer pseudoplatanus</i>	Balho 5l Quickfit	0,0027 0,0077 0,0088	Stuart e Street(1969)	pH=6,2	Sacarose	Sacarose 20g/l.	—	—	—	Wilson <i>et al</i> (1971)
<i>Acer pseudoplatanus</i>	Balho Quickfit (Wilson,1971)	0,0081	Stuart Street(1969)		Sacarose	Sacarose 20g/l.	0,0094	0,1	—	King <i>et al</i> (1973)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Reactor arejado 1500L	0,0129 0,0254	Linsmaier e Skoog(1965)	pH=6.3 t=28° C	Sacarose	Sacarose 20-30g/l.	—	—	0.420 0.360	Kato <i>et al</i> (1976)
<i>Acer pseudoplatanus</i>	Frasco 5 l agitado e arejado (Wilson, 71)	0,0055 0,0055	Stuart Street(1969)	pH=6.2 t=25° C	Glucose	Glucose 55l Azoto 6,6mM ureia 19,6 mM ureia	—	0.5	0.320 14.00* 17.70*	King (1977) King, (1976)
<i>Galium mollugo L</i>	Erlenmeyer invertido (Wilson, 76)	0,0276 0,0276	B5- Gamburg (1968)	pH=5.5 t=22° C	Sacarose	0,354 mM Fosfato 0,532 mM Fosfato	—	—	445,0** 357,0**	Wilson e Marron, (1978)
<i>Phaseolus Vulgaris L.</i>	Biorreator 2l agitado	0,0022 0,0110	Bertola e Klis. (1979)	pH=4.8 t=27° C	Glucose	Glucose 20g/l	—	—	0.400	Bertola, (1979)
<i>Catharantus roseus</i>	Erlenmeyer invertido (Wilson, 76)	0,0077	Murashige e Skoog (1962)	—	Sacarose	Sacarose 5g/l	0.30	—	0.460	Halagué e Wilson (1982)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Erlenmeyer invertido (Wilson, 76)	0,0270	Linsmaier e Skoog(1965)	t=26° C	sem fonte de carbono e de azoto	—	—	—	—	Sabat and Shuler (1985)
<i>Galium mollugo</i>	Erlenmeyer invertido (Wilson, 76)	0,0173 0,0193 0,0277	B5 - Gamburg (1968)	pH=5.5	Sacarose	Sacarose 2g/l	0.0276	—	1.200 1.100 1735	Wilson e Halagué (1985)
<i>Galium mollugo</i>	Erlenmeyer invertido (Wilson, 76)	0.0173	B5-Gamburg	pH=5.5	Sacarose	Fosfato 0,12 mM	—	—	—	Wilson e Halagué (1985)
<i>Catharantus roseus</i>	Fermentador 2 l agitado e arejado	0,0060 0,0081	Linsmaier e Skoog (1965)	pH=5.0 t=25° C	Glucose	Glucose 8g/l	0.0195	0.212	0.310 0.350	Van Gulik, (1989)

- * Rendimento de biomassa em função do consumo da fonte de azoto (g peso seco/g ureia)
 ** Rendimento de biomassa em função do consumo de fonte de fósforo (g peso seco/g fosfato)

6.2.3. CULTURA SEMI-CONTÍNUA

Na cultura semi-contínua, sistema intermédio entre o processo descontínuo e o sistema aberto contínuo, uma fracção da cultura é removida periodicamente e substituída por uma quantidade equivalente de meio fresco, de forma a manter constante o nível total do meio nutriente. Este sistema permite o alargamento da fase exponencial-linear, mas, dificilmente é atingido o equilíbrio no crescimento celular ($\mu = D$). A cultura celular em sistema semi-contínuo é utilizada, normalmente, na produção de inóculo homogéneo necessário para iniciar novo crescimento com maior volumetria. Na célula vegetal, este sistema tem sido aplicado, igualmente, em estudos fundamentais de fisiologia e metabolismo.

Desde a década de 60, que sistemas semi-contínuos têm sido experimentados. Num fitostato de 10 l munido de um sistema de arejamento, células de rosa de Paul's Scarlet foram mantidas em crescimento durante 55 dias, não atingindo contudo, a fase estacionária ("steady-state"), devido à irregularidade na colheita das amostras (Tulecke, 1966).

Wilson *et al* (1971) desenvolveram um sistema semi-contínuo com células de *Acer pseudoplatanus* L., em reactor de 4 l, como primeira tentativa para prolongar a manutenção de elevadas taxas de crescimento. Ulteriormente, foi desenvolvido pelos mesmos autores um quimiostato e um turbidostato (Tabela 6.1). Foi proposta por Veliky e Martin (1970) uma unidade de produção de células vegetais *in vitro*, rudimentar, constituída por um frasco cónico arejado e com agitação magnética para sistemas semi-contínuos, com a finalidade de minimizar o crescimento celular nas paredes do reactor.

Importante investigação foi desenvolvida por Dalton (1980) em sistema semi-contínuo, utilizando células fotoheterotróficas e fotoautotróficas de *Spinacea Oleracea* L., na perspectiva de induzir

crescimento sustentado fotossinteticamente. Este autor verificou, que a diminuição da concentração da frutose no meio celular produzia um aumento na actividade fotossintética e que na ausência total da fonte de carbono, as células cresciam fotoautotróficamente.

A suspensão celular de *Daucus carota* foi desenvolvida num sistema semi-contínuo muito rudimentar, tendo o fosfato como nutriente limitante. As células foram mantidas em "erlenmeyers" de 500 ml. Foi removida periodicamente (24 h) uma fracção de suspensão e adicionada igual quantidade de meio nutriente (Dougall e Weyrauch, 1980). Estes autores referem que as taxas de diluição foram obtidas, pela variação da razão entre a quantidade de células retiradas e a quantidade de meio adicionado, (extrema simplificação do conceito de taxa de diluição). Foi igualmente evidenciado por estes investigadores, que o rendimento de biomassa relativo ao consumo de fosfato dependia da taxa de diluição utilizada, o que contraria o postulado de Monod (1942), mas está de acordo com o modelo desenvolvido por Nyholm (1976) para substratos conservativos (capítulo 5, ponto 5.3.1)

A produção em fermentador semi-contínuo do glicosídeo β -metildigoxina, por uma cultura de células de *Digitalis lanata*, foi efectuada em "erlenmeyer" de 1 l e em fermentador de 20 l por Reinhard *et al.* (1989), após indução pela adição dos iões fosfato e amónio. O aumento da escala de produção foi realizado com um fermentador "air-lift" de 300 l.

Células de *Cephalotaxus harringtonia* foram cultivadas em "erlenmeyers" de 1 l alimentadas continuamente, e com recolha periódica do efluente. Foram caracterizadas duas fases estacionárias com glucose 3% e frutose 3%, respectivamente (Westgate *et al.*, 1991). Não foram referidos valores para as taxas de diluição nem foi identificado o nutriente limitante. As constantes cinéticas $\mu_{Max} = 0.11 \text{ dias}^{-1}$ e $K_m = 0,50 \text{ g/l}$ foram calculadas de acordo com o modelo de Monod (1942).

6. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* em quimiostato modificado e em sistema semi-contínuo.

A cultura contínua de *Cynara cardunculus* foi iniciada, após 4 dias de cultura descontínua, com taxas de diluição de $0,0085 \text{ h}^{-1}$ e $0,012 \text{ h}^{-1}$. O elevado grau de homogeneização conseguido na suspensão celular de cardo foi atribuído à diminuta agregação celular e ao não significativo crescimento celular nas paredes do reactor, o que permitiu atingir rapidamente os estados estacionários fisiológicos de crescimento destas células em sistema contínuo. Os tempos de residência necessários à obtenção dum crescimento celular balanceado foram de 1,6 dias para $D=0,0085 \text{ h}^{-1}$ (fase estacionária 1) e 2,3 dias para $D=0,0012 \text{ h}^{-1}$ (fase estacionária 2). No estabelecimento de uma cultura contínua de células em suspensão de *C. roseus* são normalmente necessários 3-4 tempos de residência para atingir a fase estacionária do crescimento celular (van Gulik *et al.* 1989), cerca de 2 vezes o tempo determinado na cultura de células de *C. cardunculus*, o que indicia um grau superior de adaptação ao crescimento em quimiostato, no tipo de células em estudo.

As fermentações em contínuo foram realizadas para diferentes coeficientes de transferência de massa iniciais de oxigénio, $6,4 \text{ h}^{-1}$ e $8,6 \text{ h}^{-1}$ respectivamente para $D=0,0085 \text{ h}^{-1}$ e $D= 0,012 \text{ h}^{-1}$. Em fermentador descontínuo, o valor de $k_L a$ inicial (meio nutriente sem células) óptimo, foi de $6,07 \text{ h}^{-1}$ (capítulo 3), valor similar aos utilizados em cultura contínua e semi-contínua ($k_L a=6,04 \text{ h}^{-1}$). Todavia, os valores dos coeficientes de transferência volumétrico de oxigénio, calculados no decorrer da fermentação, apresentaram valores inferiores ($3,2 \text{ h}^{-1}$ e $6,8 \text{ h}^{-1}$ para $D= 0,0085 \text{ h}^{-1}$ e $D= 0,012 \text{ h}^{-1}$, respectivamente) aos estimados para o meio de cultura na

ausência de células. Este decréscimo está de acordo com o observado em sistema descontínuo para elevadas densidades celulares e deve-se, provavelmente, ao efeito do aumento de viscosidade do meio de cultura durante o ciclo de crescimento, na transferência de massa (Rols e Goma 1991, Leckie *et al.* 1991). A concentração do oxigênio dissolvido na suspensão celular foi mantida entre 25% e 50% do nível de saturação, por pequenos ajustes do caudal de arejamento.

Tabela 6.2. Parâmetros cinéticos de crescimento de células em suspensão de *Cynara cardunculus* em sistema contínuo, para as taxas de diluição 0,0085 h⁻¹ e 0,012 h⁻¹ e em sistema semi-contínuo.

D	S ₀	X	Produtividade Biomassa	Y _{X/S}	Y _{X/P}	Y _{X/N}	P.F./P.S.
(h ⁻¹)	(g/l)	(g/l)	(g/l.dia)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	
0.0085	8	5,3	1,104	0,713	136,8	21,51	69,8
0.012	8	4,6	1,320	0,692	134,8	24,60	64,7
Semi- contínuo	20	2,9	0,680	—	168,2	15,00	20,0*

S₀- Concentração inicial de sacarose; X- Concentração média de biomassa em fase estacionária; BioPr- Productividade de biomassa Y_{X/S}- Rendimento de biomassa em função de sacarose consumida; Y_{X/P}-Rendimento de biomassa em função do fosfato consumido; Y_{X/N}- Rendimento de biomassa em função do azoto consumido; P.F./P.S- razão peso fresco/peso seco em condições estacionárias;*- razão peso fresco/peso seco correspondente à concentração máxima de biomassa.

A cultura semi-contínua de células em suspensão de *C. cardunculus* foi estabelecida pela adição periódica da fonte de carbono ao 7^o, 15^o e 28^o dias e de meio B₅ completo no 23^o dia da fermentação, de molde a evitar limitação nutricional. Foi iniciada para uma transferência volumétrica de oxigênio, idêntica à estipulada em fermentador descontínuo (k_La= 6,07 h⁻¹).

Na Tabela 6.2. estão reunidos os valores dos coeficientes de rendimentos de biomassa, produtividade de biomassa e a razão peso fresco/peso seco, determinadas em quimiostato, para as taxas de diluição de $0,0085 \text{ h}^{-1}$, de $0,012 \text{ h}^{-1}$ e em sistema descontínuo. Como pode ser observado na referida Tabela 6.2, registaram-se ligeiros acréscimos nos rendimentos de biomassa em azoto e na produtividade de biomassa para a fase estacionária 2. Porém o rendimento em sacarose e em fósforo apresentaram valores semelhantes para ambas as fases estacionárias 1 e 2. O modelo clássico de Pirt (1965) pressupõe, que para taxas específicas de crescimento diminutas, a energia é consumida principalmente na manutenção da célula, o que está de acordo com o aumento na produtividade de biomassa para maiores taxas específicas de crescimento.

Constatou-se, por comparação dos valores da Tabela 6.2. e das Tabelas 4.1. e 4.2., que o melhor rendimento de biomassa, determinado em função do fósforo consumido, da suspensão celular de *C. cardunculus* se obtém em sistema descontínuo. Estes coeficientes de rendimento de biomassa são marcadamente inferiores aos referidos para células de *Gallium mollugo* L. (1105 g/g), por Wilson e Marron (1978). Células em suspensão de *Daucus carota*, cultivadas em sistema semi-contínuo apresentaram um rendimento em biomassa em função do fósforo consumido (187g/g) (Dougall e Weyrauch, 1980), semelhante ao obtido na fermentação semi-contínua de células em suspensão de cardo e da mesma ordem de grandeza, dos valores determinados nas fermentações de células de cardo em sistemas contínuo e descontínuo (Tabela 4.2).

Analisando as produtividades de biomassa expressas nas Tabelas 6.2., 4.1. e 4.2. verificou-se, que o maior valor de produtividade de biomassa registado em quimiostato (1,32 g/l.dia) é semelhante ao referido por Scragg *et al.* 1990, para células de *C. roseus* cultivadas em sistema semi-contínuo (1,46 g/l.dia). Verificou-se, igualmente, um ligeiro acréscimo na produção de biomassa em fermentador semi-contínuo (0,68 g/l.dia) relativamente ao sistema descontínuo

(0,61 g/l. dia). Ao invés, em células em suspensão de *C. roseus* foram referidos menores valores de produtividade de biomassa em sistema semi-contínuo do que em descontínuo (Scraag *et al.* 1990).

O fósforo inorgânico -Pi- não foi detectado no efluente, durante as fases estacionárias fisiológicas de crescimento, estabelecidas para $D=0,0085\text{ h}^{-1}$ e $D=0,012\text{ h}^{-1}$ (Figs 6.2 e 6.3.). O crescimento de células de *C. cardunculus* em sistema descontínuo evidenciou o esgotamento do ião fosfato no início da fase exponencial, sugerindo que o fósforo é armazenado intracelularmente, sendo consumido durante a fase de crescimento (ver discussão em 4.4.1.) Idênticos resultados foram assinalados durante o crescimento celular de *C. roseus* em fermentador descontínuo, em que a mobilização do fósforo inorgânico do meio extracelular, ocorreu durante a fase de latência de crescimento celular (Van Gulik *et al.* 1992). Segundo Bielecki e Ferguson (1983), o fósforo intracelular localiza-se em vacúolos ou no citoplasma, permanecendo o fósforo citoplásmico constante durante o ciclo de crescimento, enquanto que o fósforo vacuolar diminui.

Os coeficientes de rendimento de biomassa obtidos em função do consumo da fonte de carbono (Tabela 6.2.), são bastante elevados quando comparados com os coeficientes referidos por Van Gulik *et al.* (1989), para células de *C. roseus* em cultura contínua (0,31 g/g para $D=0,0060\text{ h}^{-1}$ e 0,350 g/g para $D=0,0081\text{ h}^{-1}$). Células em suspensão de *Acer pseudoplatanus*, cultivadas em quimiostato com glucose como nutriente limitante, apresentaram um coeficiente de rendimento de biomassa de 0,32 g/g (King, 1977). Uma cultura de *C. roseus*, em quimiostato, com sacarose como nutriente limitante e taxa de diluição de $0,0077\text{ h}^{-1}$, revelou um coeficiente de rendimento de biomassa em função da sacarose consumida de 0,47 g/g (Balagué e Wilson, 1982).

Os glúcidos foram detectados em quantidades reduzidas no efluente, durante a fase estacionária 1 ($D=0,0085\text{ h}^{-1}$), de acordo com o registado na Figura 6.2.

6. Cultura contínua

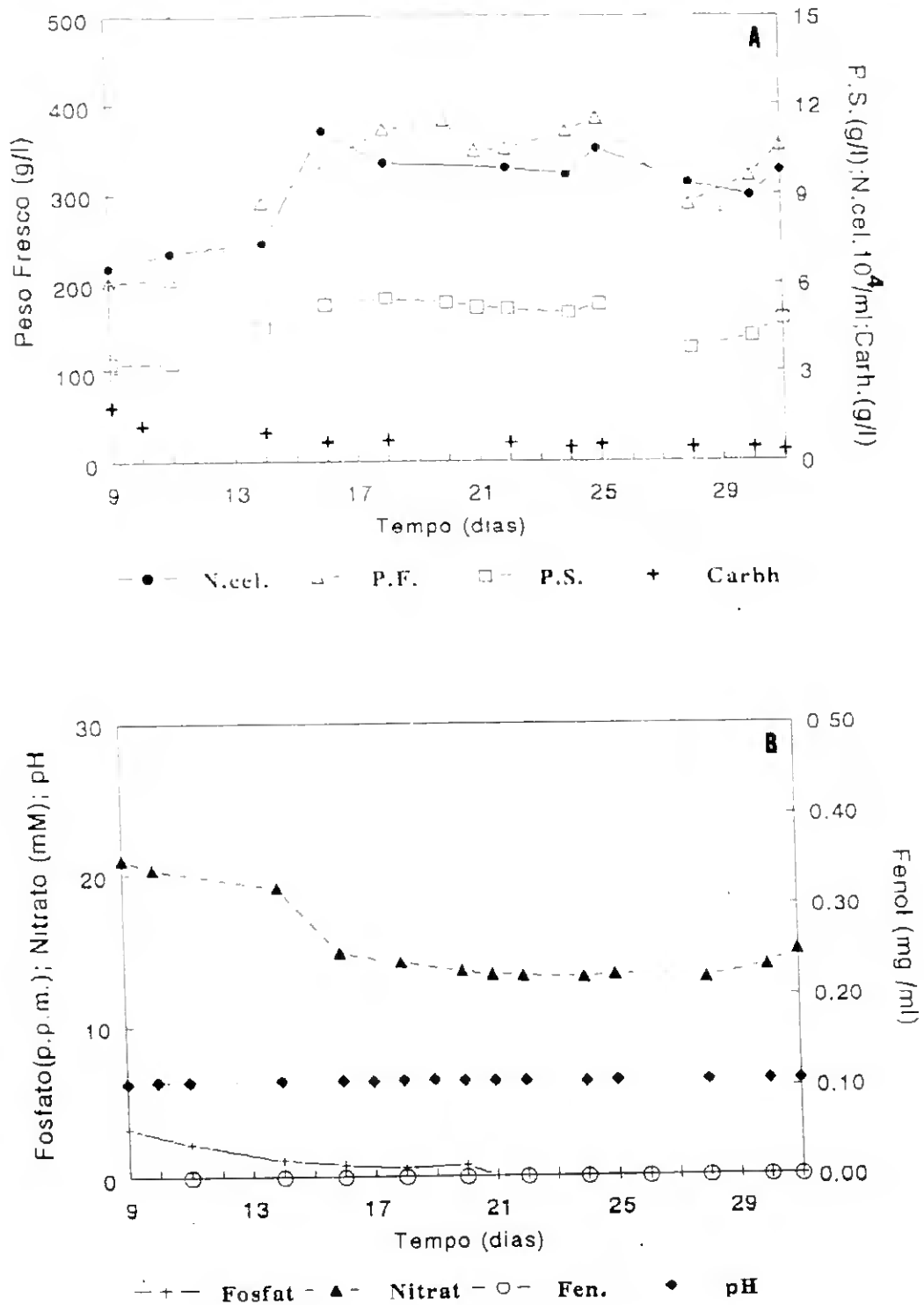


Fig.6.2. Parâmetros de crescimento (A) e nutrientes consumidos (B) de células em suspensão de *Cynara cardunculus* cultivadas em quimiostato. O estado estacionário localiza-se entre o 16º e o 25º dia, após início da diluição, para $D=0,0087\text{ h}^{-1}$ (fase estacionária 1)

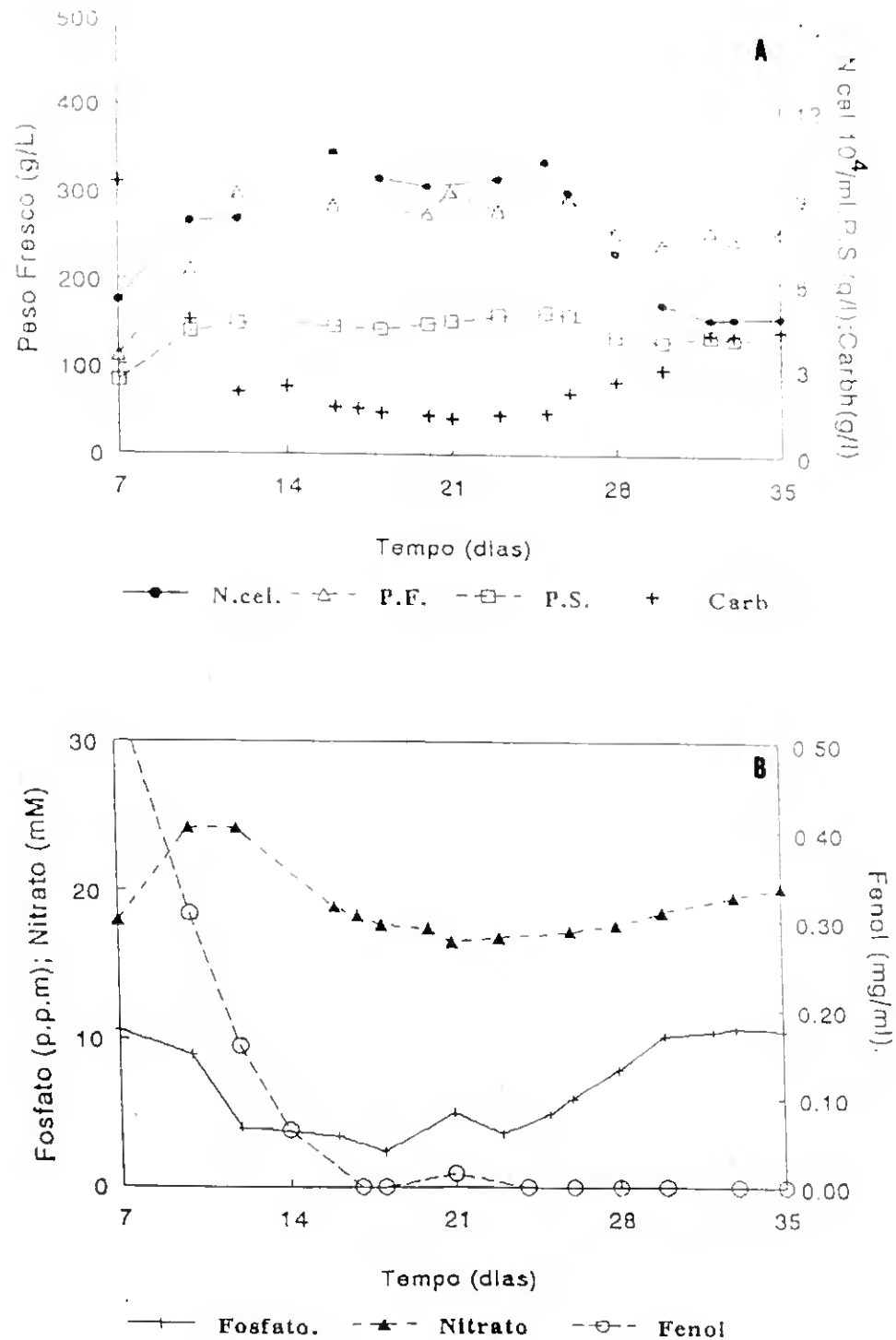


Fig.6.3. Parâmetros de crescimento (A) e nutrientes consumidos (B) de células em suspensão de *Cynara cardunculus* cultivadas em quimiostato. O estado estacionário localiza-se entre o 12º e o 26º dia, após início da diluição, para $D = 0,012 \text{ h}^{-1}$

Para a taxa de diluição mais elevada $0,012 \text{ h}^{-1}$, foi encontrada uma maior quantidade de hidratos de carbono ($1,4 \text{ g/l}$) presentes no meio efluente durante a fase estacionária fisiológica de crescimento 2 (Fig. 6.3).

Estes resultados permitem considerar a sacarose ($0,08\% \text{ p/v}$) como nutriente limitante do crescimento celular de *C. cardunculus* em sistema contínuo. Os coeficientes de rendimento de biomassa em função do azoto consumido, determinados para a cultura de células em suspensão de cardo, em sistema contínuo e em descontínuo (Tabela 6.2.), são superiores ao valor referido por King (1976) para uma suspensão celular de *Acer pseudoplatanus* ($17,7 \text{ g/g}$), mas são semelhantes ao rendimento de biomassa (23 g/g) referido por Young (1973) para uma cultura celular de *Acer pseudoplatanus*, cultivada em meio de cultura com nitrato como única fonte de azoto. Em fermentador semi-contínuo, as células em suspensão de cardo revelaram o menor rendimento de biomassa em função do azoto consumido, embora da mesma ordem de grandeza dos valores calculados para as fermentações realizadas em contínuo e descontínuo.

Ambas as fermentações contínuas, realizadas para diferentes taxas de diluição evidenciaram a assimilação total do catião amónio pelas células de *C. cardunculus* durante a fase inicial de crescimento em sistema descontínuo (4 dias), sendo o radical nitrato a fonte de azoto utilizada durante os estados estacionários fisiológicos de crescimento 1 e 2 (Figs. 6.2 e 6.3.). Assinale-se, que tal como em sistema descontínuo, a amónia é preferencialmente consumida relativamente ao nitrato, o que está de acordo com a exigência de redução do nitrato a amónia, previamente a ser assimilado pela célula vegetal como referido, em 4.3.

A proporção ponderal peso fresco/peso seco em sistema contínuo apresentou uma ligeira diminuição com o aumento da taxa de diluição (Tabela 6.2), sugerindo uma menor retenção de água

intracelular e subsequentemente menor dimensão celular. Todavia, é patente um acentuado decréscimo na razão P.F./P.S. calculada para o sistema semi-contínuo (Tabela 6.2.), o que pode estar associado ao aumento do teor em hidratos de carbono no meio de cultura, como referido por Drapeau *et al.* (1986) e por Kim *et al.* (1993). Tal, está de acordo com os resultados anteriormente obtidos no estudo da influência da concentração da fonte de carbono na proporção peso fresco/peso seco, da suspensão de *C. cardunculus* em fermentador descontínuo (Tabela 5.1).

De acordo com a Fig. 6.4A constatou-se, que a adição periódica da fonte de carbono ao longo do ciclo de crescimento causou um prolongamento da fase exponencial-linear de cerca de 8 dias para 14 dias, relativamente ao observado em sistema descontínuo. Ainda, através da análise da Fig. 6.4A e B foi observado, que apesar da glucose se manter disponível ao longo da fermentação, as células de cardo não mantêm a exponencialidade do crescimento, o que sugere uma limitação nutricional da fonte não carbonada. A depleção dos compostos azotados e fosfatados no meio extracelular expressa na Fig. 6.4B vêm corroborar esta hipótese, embora se deva considerar que o fosfato possa permanecer no interior da célula como nutriente de reserva, o que foi discutido no capítulo 4, ponto 4.4.1. A adição do meio nutriente B₅ completo, ao 23^o dia de fermentação, permitiu obviar esta situação de deficiência em nutrientes e a subsequente degenerescência celular. Contudo, não foi possível constatar uma nova fase exponencial de crescimento a partir daquele dia, como era pressuposto, tendo-se registado paralelamente uma acentuada diminuição da taxa respiratória, (Fig. 6.4A), muito provavelmente, devido a uma deficiente transferência volumétrica de oxigénio, associada a um aumento na viscosidade da suspensão celular. Curtis e Emery (1993) verificaram numa cultura de células em suspensão de papoila, que o incremento da concentração de biomassa e da viscosidade do meio de cultura aumentavam paralelamente durante a fermentação

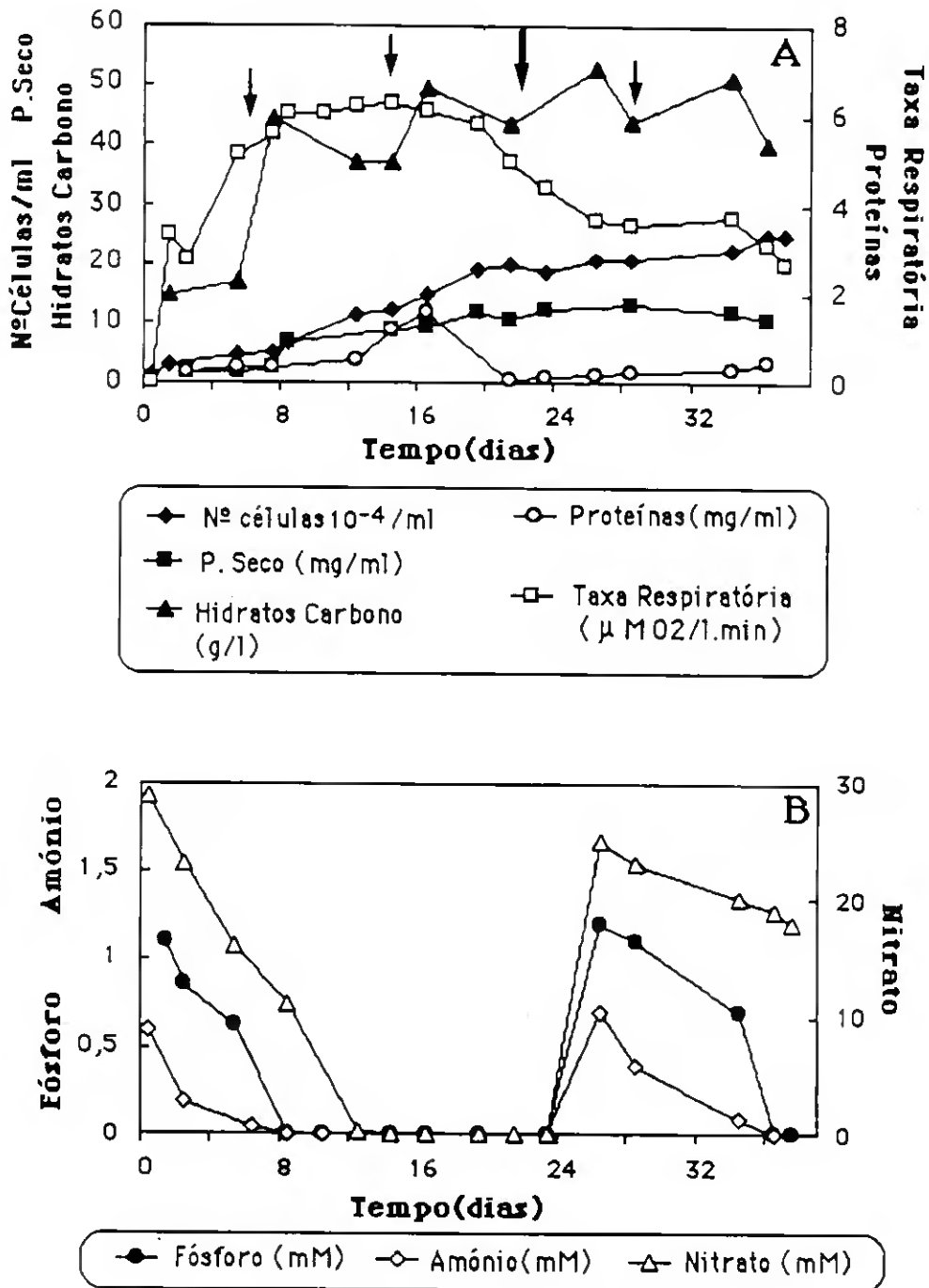


Fig. 6.4. Parâmetros de crescimento (A) e nutrientes consumidos (B) de células em suspensão de *C. cardunculus* em cultura semi-contínua. As setas de menor dimensão indicam a adição de sacarose 1% (p/v) e a seta de maior dimensão significa a adição de meio B5 completo.

O exposto nos parágrafos anteriores, permite que se discuta sobre o valor de cada um dos sistemas de fermentação abordados, em termos da produção de biomassa, ou seja, da produção associada ao crescimento celular e em função dos rendimentos estimados no modelo cinético de crescimento de células em suspensão de *C. cardunculus*. Apesar do sistema contínuo proporcionar uma maior produção de biomassa e maiores rendimentos de biomassa em função dos açúcares consumidos, outros factores terão que ser ponderados criteriosamente na produção em larga escala, como seja a dificuldade de manutenção da assépsia, neste tipo de sistemas e ainda a sua complexidade. Embora o reactor biológico semi-contínuo apresente menores valores de produtividade e de rendimento do que o reactor descontínuo, é de considerar aquela via de produção em larga escala, porque permite alargar o período de produção associado ao crescimento, relativamente ao fermentador descontínuo e diminuir a fase de pré-produção, isto é, o tempo necessário para atingir a escala de produção industrial (Reinhard *et al.* 1989). Refira-se, no entanto, que o sistema semi-contínuo estabelecido para a suspensão celular de cardo, carece de uma maior investigação, particularmente, no que se refere à optimização das condições de transferência volumétrica de massa.

6.3.2. Actividades proteolíticas e produção fenólica das células em suspensão de *C. cardunculus* em sistema contínuo e semi-contínuo.

Os compostos fenólicos, metabolitos secundários, normalmente produzidos em "stress" nutricional ou hidrodinâmico (Phillips e Henshaw 1977, Lima Costa *et al.* 1987), decresceram ao longo do ciclo de crescimento celular de *C. cardunculus* em quimiostato, observando-se, durante os estados estacionários 1 e 2, a ausência total de produção fenólica (Fig.6.5.), o que contrasta com o observado em sistema descontínuo (Fig.4.13 e 4.14). Tal facto,

6. Cultura contínua

sugere a inibição da via metabólica secundária em sistema contínuo, favorecendo o metabolismo primário. De igual modo, na cultura em contínuo, de células de *Gallium mollugo*, a biossíntese de antraquinonas (metabolitos secundários) é inibida, ao contrário do que acontece em sistema descontínuo, em que ocorre a produção dos referidos metabolitos (Wilson e Balagué, 1985).

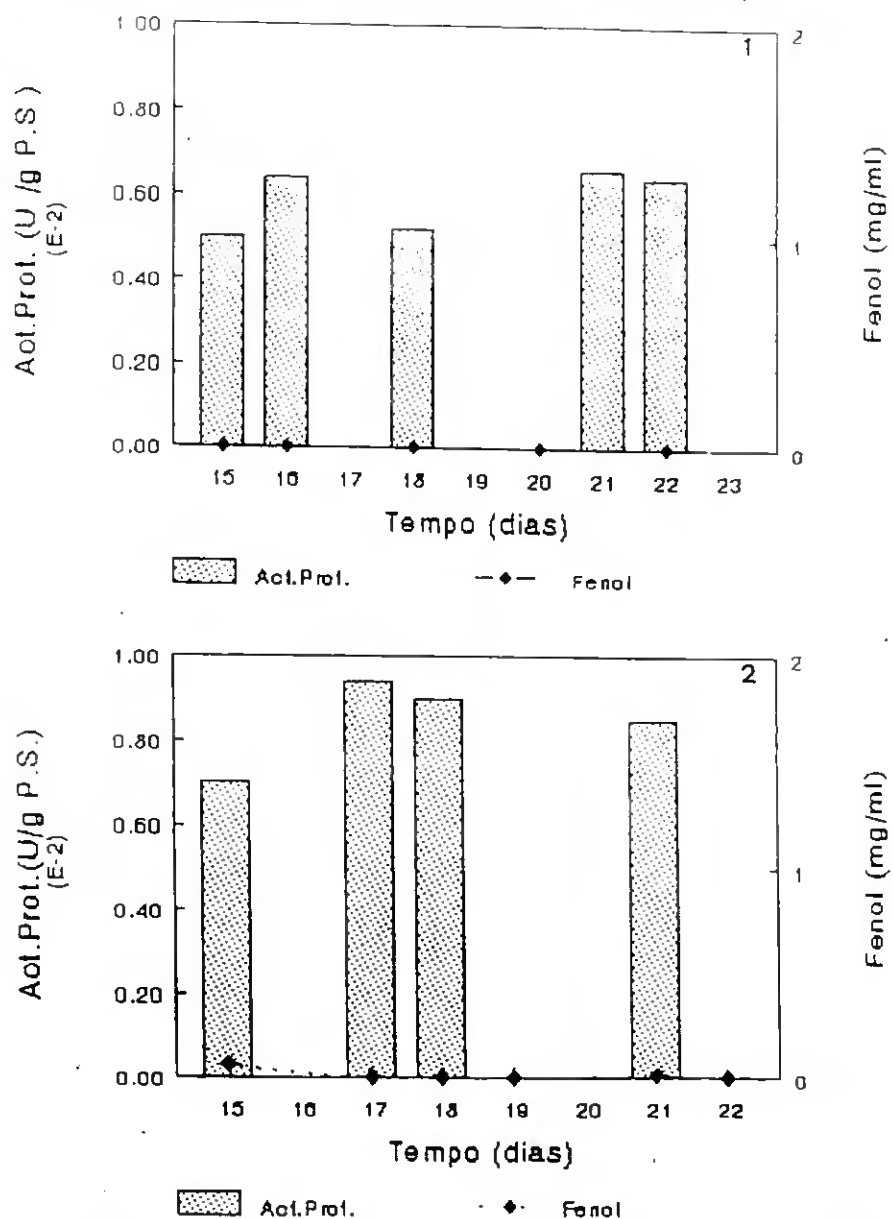


Fig.6.5. Atividades proteolíticas específicas e produção fenólica determinada durante os estados estacionários obtidos durante a cultura contínua de células em suspensão de *C. cardunculus* para $D = 0,087 \text{ h}^{-1}$ (fase estacionária 1) e $D = 0,012 \text{ h}^{-1}$ (fase estacionária 2).

É hoje reconhecido, que a síntese dos metabolitos secundários apenas se inicia, após paragem da divisão celular, o que acontece, ou por esgotamento dos nutrientes ou por "stress" ambiental atribuído a factores abióticos.

A análise da Fig. 6.5. revela estabilidade das actividades proteolíticas específicas das células de cardo, durante os estados estacionários 1 e 2, em contraste com o obtido em sistema descontínuo (Fig.4.13 e Fig. 4.14). A determinação das actividades proteolíticas específicas médias para os estados estacionários 1 e 2, revelou uma maior actividade azocaseinolítica para a taxa específica de crescimento mais elevada. Esta correlação permite revalidar a sugestão enunciada no capítulo 4, de que as proteases, presentes nas células em suspensão de *C. cardunculus*, são metabolitos primários, cuja síntese é favorecida em condições favoráveis de crescimento celular.

Tabela 6.3. Produtividades proteásicas e actividades proteolíticas específicas médias determinadas durante os estados estacionários de crescimento de *Cynara cardunculus* em cultura contínua e semi-contínua. Foram calculados os intervalos de confiança 95% para as actividades proteolíticas médias.

	D=0,0087 h ⁻¹	D= 0,012 h ⁻¹	Semi-contínua
Produtividade Proteásica (U/Kl.dia)	6,53	10,86	8,36
Actividade Prot. Específica Média (U/g.P.S.)	0,0059± 0,0006	0,0088± 0,0004	0,0045± 0,0034

De acordo com a Tabelas 6.3 e Tabelas 4.5 e 5.6, a maior produtividade das proteases em meio de cultura B₅, não modificado, foi encontrada para o estado estacionário D= 0,012 h⁻¹, o que torna a

cultura contínua interessante do ponto vista industrial. Heijnen *et al.* 1992, questionaram os pontos críticos da cultura contínua, aplicada a culturas de células vegetais, quando encarada como modo de produção industrial. Segundo estes autores, a produtividade do produto é apenas um dos múltiplos parâmetros a considerar na escolha de um processo. A cinética do processo, os aspectos económicos e de mercado, a maior ou menor complexidade de instalação da unidade de fabrico, são outros factores a considerar na opção por um determinado processo de fabrico. A este respeito, Ten Hoopen *et al.* 1993 excluem o sistema de cultura contínua, quando se trata de processos de produção associados ao metabolismo secundário, normalmente desencadeado na fase estacionária de crescimento. Ainda segundo estes autores, embora as culturas descontínuas e as semi-contínuas de células vegetais sejam adequadas à produção industrial de metabolitos, os reactores biológicos semi-contínuos apresentam vantagens. Para além da diminuição da fase de pré-produção, é ainda referida a não limitação pela concentração inicial do substrato e a facilidade de adicionar meio de cultura para induzir determinado processo metabólico.

Contudo, é de sublinhar que a fermentação em contínuo aparece como instrumento relevante na investigação fundamental das vias metabólicas da célula vegetal, ou na abordagem ao estudo da biotransformação por células vegetais e, particularmente, na Engenharia Metabólica.

CAPÍTULO 7

Conclusões e Perspectivas

7.1. CONCLUSÕES

No âmbito desta tese, a cultura de células em suspensão de *Cynara cardunculus* foi utilizada como sistema modelo para o estudo do "stress" hidrodinâmico, da cinética de crescimento e da produção de metabolitos em fermentador de 2 l agitado mecânicamente e em "erlenmeyer". Foi estabelecida a cultura em contínuo, com o intuito de avaliar a capacidade de adaptação da suspensão celular em estudo, ao crescimento em quimiostato. Testou-se um sistema semi-contínuo de crescimento celular, numa tentativa para aumentar, temporalmente, a fase exponencial de crescimento celular.

Na perspectiva de verificar a adequação do projecto do reactor biológico de monoturbina de pequena escala (2 l), optimizou-se a transferência de massa volumétrica do oxigénio para valores distintos dos parâmetros agitação-arejamento, constatando-se que valores iniciais de $k_L a$ elevados ($>14 \text{ h}^{-1}$) limitam o crescimento celular e a actividade metabólica, designadamente a produtividade de biomassa, os rendimentos de consumo de oxigénio, a actividade azocaseinolítica e a taxa respiratória celular máxima. Ao invés, os valores mais baixos do coeficiente $k_L a$, são os mais favoráveis ao crescimento de células de *C. cardunculus* neste tipo de biorreactor. Contudo, elevadas densidades celulares requerem um aumento na transferência de massa afim de que a oxigenação da suspensão celular se mantenha em níveis satisfatórios de viabilidade celular.

A análise de regime de fluídos efectuada pelo cálculo dos tempos característicos dos processos metabólicos e dos mecanismos físicos em função do $k_L a$, permitiu observar que:

- o oxigénio não é um nutriente limitante do processo de crescimento, mesmo em condições de ensaio supostamente desfavoráveis à homogeneização da suspensão celular.

7. Conclusões e Perspectivas

- os processos físicos relacionados com a transferência e homogeneização de gás no seio do líquido e com o consumo de oxigénio não são limitantes dos processos biológicos de produção e de crescimento, o que indica que, a limitação do sistema reside na indisponibilidade de nutrientes no meio de cultura.

As células em suspensão de cardo revelaram sensibilidade ao "stress" hidrodinâmico, apresentando, contudo, uma elevada capacidade de recuperação da viabilidade celular, após estarem sob a acção de severo "stress" hidrodinâmico.

Após estabelecimento das condições operacionais de maior estabilidade hidrodinâmica, investigou-se a influência ponderal dos macronutrientes na cinética de crescimento, em sistema descontínuo (fermentador e "erlenmeyer"). Este estudo comprovou a essencialidade da função do fosfato nos processos metabólicos do crescimento vegetal e evidenciou igualmente a sua importância na actividade proteolítica da suspensão celular de *Cynara cardunculus*. Não foi, no entanto, observado o efeito supressor da via metabólica secundária de produção fenólica pela presença de fósforo inorgânico. Verificou-se, que o arejamento forçado da suspensão celular, quando associado a uma elevada concentração em fosfato favorece a actividade azocaseinolítica. Tal, indica que as proteases activas neste sistema celular vegetal são metabolitos primários.

A maior actividade endopeptidásica obtida ao longo do ciclo de crescimento celular corresponde ao início da fase estacionária da curva de crescimento, seguindo-se uma desactivação drástica das enzimas proteolíticas presentes na suspensão celular. Utilizou-se como critério de avaliação comparativa da actividade endopeptidásica, a produtividade proteásica expressa em unidades enzimáticas por unidade de volume e por dia e a actividade proteolítica específica expressa em unidades enzimáticas por grama de peso seco de células.

Culturas descontínuas de *C. cardunculus* mantidas em concentrações limitantes de fósforo, evidenciaram um crescimento linear, uma menor produtividade de biomassa e uma menor taxa específica de crescimento. Ao contrário, o anião fosfato, presente em excesso no meio extracelular, conduziu a um crescimento em exponencial, até ao momento em que a fonte de carbono ou de azoto do meio de cultura se esgotaram. A exaustão total dos hidratos de carbono e dos compostos azotados, do meio extracelular, coincidiu com o início da fase estacionária.

Conclui-se que o fósforo inorgânico é um substrato conservativo, tornando possível a manutenção celular, mesmo em circunstâncias de esgotamento do fósforo extracelular. A taxa de crescimento celular não depende apenas da disponibilidade em hidratos de carbono, mas também do nível do fosfato intracelular presente no meio nutriente. Foi observado um aumento do volume celular ao longo do ciclo de crescimento, independentemente do teor em fósforo existente no meio extracelular, o que indica um aumento na retenção de água vacuolar durante o ciclo de crescimento.

Verificou-se, que o catião amónio influi negativamente na actividade metabólica, o que se traduz por uma menor produtividade e menor taxa específica de crescimento, independentemente da concentração inicial em amónio ou do teor do nitrato em presença. Este comportamento pode ser justificado pela repressão da principal via de assimilação do azoto, pela redução da actividade da glutamina sintetase, pela redução da biossíntese dos ácidos cetónicos, por diminuição do fluxo electrónico através do ciclo do ácido cítrico ou por alteração do valor do pH. Ao invés, foi registado uma indução na activação enzimática proteolítica pelo aumento da concentração em amónio no meio de cultura.

Em contraste com o referido por diversos autores, a nitrato redutase presente na suspensão celular de cardo e responsável pela redução do ião nitrato a amónio, não foi inibida na presença deste catião, o

que permite a metabolização simultânea, pela célula, dos iões nitrato e amónio.

A proporção ponderal entre o ião nitrato e o ião amónio igual a 30, afigurou-se como o valor óptimo para produção de biomassa de células em suspensão de cardo, o que leva a identificar o nitrato como o principal recurso azotado da célula de *C. cardunculus*, remetendo o amónio para uma função metabólica complementar, embora necessária.

Os coeficientes de rendimento aparente de biomassa, calculados em função do fósforo inorgânico e do azoto consumidos, não foram afectados pela alteração de escala ou das condições operacionais de reacção, apresentando valores similares para os dois tipos de vasos reaccionais ("erlenmeyer" e fermentador). Este facto delimita as vantagens do uso de fermentadores descontínuos à facilidade de operação, à maior reprodutibilidade dos ensaios e, finalmente, ao maior número de parâmetros mensuráveis, como seja, a determinação da taxa respiratória, quer em função do oxigénio consumido ou do dióxido de carbono produzido. Constatou-se, que este parâmetro substitui, com vantagem, a avaliação quantitativa do peso seco, do peso fresco e do nº de células/ml, exceptuando situações de extrema densidade celular. Por outro lado, a apreciação das alterações dos valores da taxa respiratória durante uma fermentação, possibilita a percepção imediata de condições de inviabilidade celular, mormente, de limitação nutricional. Em sistema semi-contínuo, esta avaliação é imperativa na manutenção da fase exponencial de crescimento ou na correcção do fluxo do arejamento necessária à utilização bem sucedida daquele sistema.

Os estudos de optimização da influência da concentração da fonte de carbono e de energia do meio basal B₅ (sacarose), revelaram uma melhor resposta metabólica global para a concentração de 3%(p/v) e, que, elevadas concentrações de substrato são desfavoráveis à produção de biomassa. Ainda que, os valores mais elevados da actividade azocaseinolítica tenham sido obtidos para 4 e 6% (p/v) de

sacarose, não se verificou uma marcada dependência desta actividade, relativamente à concentração inicial em substrato.

Com o objectivo de contribuir para uma maior compreensão do modelo de crescimento celular da suspensão de cardo e de avaliar o modo como a cinética de crescimento é afectada pela concentração do substrato, foram abordados alguns modelos não estruturados. Verificou-se a linearidade entre a taxa específica de crescimento e a taxa específica de consumo dos glúcidos no intervalo de concentrações de sacarose de 1,5 % e 3% (p/v), o que está em concordância com o modelo de Pirt (1965), dentro do intervalo de valores referidos. Os rendimentos reais de biomassa, calculados para a suspensão celular de cardo, apresentaram valores superiores aos rendimentos aparentes de biomassa, o que se enquadra nas interpretações de Pirt (1975), segundo o qual, maiores requisitos energéticos para a manutenção celular conduzem a um menor rendimento global de biomassa. Os parâmetros cinéticos de crescimento da suspensão celular de *C. cardunculus*, estimados por aplicação do modelo de Pirt (1965) e do modelo não estruturado de Beeftink *et al.* (1990), apresentaram valores similares para o teor em sacarose de 2% (p/v), o que traduz a equivalência entre os modelos referidos. O modelo de Beeftink *et al.* (1990), mais lato do que o de Pirt (1965), prevê a situação de que a energia para a manutenção celular seja fornecida pela degradação da biomassa, aquando da deplecção dos hidratos de carbono, enquanto o modelo de Pirt (1965) apenas prevê a utilização do substrato como fonte energética do metabolismo celular.

A cinética de utilização do substrato pelas cultura celular de *C. cardunculus* foi satisfatoriamente descrita pelo modelo de Monod (tipo Michaelis-Menten) para teores de sacarose entre 1-4%(p/v).

A importância do projecto do biorreactor foi averiguada através da comparação de ensaios realizados em reactor de monoturbina e de 2 turbinas. Este tipo de reactor apresentou uma maior produtividade de biomassa e uma maior actividade respiratória, indicando uma

melhor adequação ao crescimento desta suspensão celular vegetal *in vitro*.

Foi possível estabelecer com sucesso a cultura contínua de células em suspensão de *C. cardunculus*, utilizando um quimiostato modificado, que tornou possível a obtenção de um efluente homogéneo. A cultura celular evidenciou elevada capacidade de adaptação a novas condições ambientais, elevado grau de homogeneização, reduzida agregação celular e um crescimento celular não significativo nas paredes do reactor. Foram caracterizados dois estados estacionários fisiológicos de crescimento, obtendo-se valores de rendimentos e de produtividades de biomassa maiores do que os determinados em fermentador descontínuo. Do mesmo modo, as actividades proteolíticas e produtividades proteásicas determinadas em cultura contínua, são mais elevadas do que em cultura descontínua ou semi-contínua, tendo-se obtido as maiores produtividades proteásicas para as taxas de diluição mais elevadas, o que indica o sistema contínuo como a opção correcta a utilizar, do ponto de vista industrial. Todavia, diversos pontos críticos têm sido assinalados neste sistema como modo de produção, não podendo ser considerada a produtividade, como único factor determinante para a selecção do processo.

O fermentador semi-contínuo prolongou a fase exponencial de crescimento de células de *C. cardunculus*, relativamente aos ensaios realizados em reactores descontínuos ("erlenmeyer" e fermentador) e tornou possível a adição de meio de cultura ao longo do processo, de modo a suprir as carências nutricionais geradas ao longo do ciclo de crescimento celular. Neste sistema obtiveram-se produtividades proteásicas e actividades proteolíticas superiores aos valores determinados em descontínuo. Nestas circunstâncias, o fermentador descontínuo apresentou vantagens, que deverão ser ponderadas no projecto do reactor. Todavia, a cinética do processo, aspectos económicos e de mercado, a maior ou menor facilidade na exequibilidade da operação, são outros factores pertinentes numa

análise, que se pretende criteriosa na escolha de uma unidade de produção industrial.

A dependência das produtividades proteásicas das taxas específicas de crescimento em sistema contínuo, o antagonismo verificado entre a via metabólica de produção dos fenóis (metabolitos secundários) e o metabolismo de formação de proteases, tal como a obtenção das maiores taxas de proteólise no final da fase exponencial de crescimento em reactores descontínuos ("erlenmeyer" e fermentador) são factos que comprovam que a síntese das proteases está associada ao metabolismo primário.

7.2. PERSPECTIVAS PARA TRABALHO FUTURO

O sistema modelo de células em suspensão de *Cynara cardunculus* demonstrou elevada adequação ao crescimento em reactor descontínuo agitado mecânicamente, concebido à escala laboratorial e, em particular, ao crescimento celular em sistema contínuo. Este sistema tem sido um importante instrumento para investigação da cinética de crescimento, em culturas de microorganismos. São raros os trabalhos que utilizam esta técnica para concretizar tal objectivo em culturas de células em suspensão de plantas dicotiledóneas. A aplicação da técnica de quimiostato à cultura de células em suspensão de cardo aparece como uma importante opção e merece um maior aprofundamento. Os parâmetros a estudar incluem a variação da composição elemental da biomassa em função da taxa de diluição, o que possibilita a efectivação de balanços de massa expressos em termos dos compostos de carbono presentes ao longo do processo. Para além da contribuição relevante na compreensão do metabolismo vegetal, permitiria a determinação dos coeficientes de rendimentos reais de biomassa com maior rigor, fundamentais para a elaboração do projecto de reactor, adequado a um processo de produção. Deverão ser planeados novos ensaios em quimiostato para maiores taxas de diluição, de forma a que o "wash-out" da

suspensão celular fosse atingido, com a finalidade de determinar experimentalmente a taxa específica de crescimento máxima.

Da mesma forma, o crescimento de células em suspensão de cardo em fermentador semi-contínuo revelou potencialidades que deverão ser aprofundadas, quer em termos do modelo cinético de abordagem do crescimento, quer na caracterização do ambiente hidrodinâmico, designadamente, na fase de crescimento de elevada concentração celular.

O estudo do comportamento reológico da cultura de células vegetais em suspensão é particularmente importante para populações com elevada densidade celular, cujo interesse reside na necessidade de aumentar a produtividade dos processos de produção, de molde a torná-los economicamente viáveis. Todavia, têm sido dispersas as abordagens de investigação realizadas, até hoje, neste domínio. Ainda que, uma viscosidade elevada não seja uma característica intrínseca deste tipo de culturas *in vitro*, mas antes o resultado da capacidade das culturas de células vegetais atingirem uma elevada concentração celular devido a um reduzido requisito em oxigénio, esta propriedade das culturas tem sido limitante na definição do "design" de um biorreactor, para culturas em larga escala. Neste contexto, e numa perspectiva de obtenção de um conhecimento mais profundo sobre a reologia do fluído em estudo, retomar-se-ão medições das viscosidades ao longo do ciclo de crescimento; para diferentes densidades celulares iniciais da suspensão de *C. cardunculus*, quer em sistema descontínuo quer em sistema semi-contínuo. A análise quantitativa do "stress" laminar e do "stress" associado à turbulência no fluído é passível de ser realizada, utilizando diferentes modelos de viscosímetros munidos de torniquete ou de cilindros concêntricos ligados ao rotor do viscosímetro.

Na prossecução do estudo físico do sistema e, em complementaridade com o conhecimento da reologia da suspensão celular, a definição do ambiente hidrodinâmico de células em

suspensão de *C. cardunculus* em biorreactor requiere um maior desenvolvimento. Para além da caracterização do regime de fluxo no seio do fermentador agitado mecânicamente e com arejamento forçado, que poderia ser efectuada por determinação dos números adimensionais de Reynolds, Schmidt, Froude ou outros, seria de estudar o efeito da adição de agentes tensioactivos e de compostos imiscíveis em fase aquosa e com elevada capacidade de solubilizar oxigénio (hidrocarbonetos e perfluorcarbonetos) ao meio de cultura, numa tentativa de optimização da capacidade de transferência de massa volumétrica de oxigénio da suspensão celular.

Na sequência do estudo da cinética de crescimento em fermentador descontínuo realizada neste trabalho, seria útil prosseguir com estudos da taxa respiratória expressa quer em função do oxigénio fornecido, quer do dióxido de carbono constituinte do gás efluente, possibilitando o balanço de massas do processo, para subsequente modelização do sistema em estudo. Para um maior rigor na definição da estequiometria do processo, seria importante a quantificação dos caudais dos gases efluentes do reactor, designadamente do dióxido de carbono e do oxigénio.

A influência de uma maior oxigenação da cultura, o aumento do teor do dióxido de carbono presente na fase gasosa no interior do fermentador e na variação da proporção dos elementos considerados essenciais na composição do ar, deverá ser igualmente estudada em sistema descontínuo, com a finalidade de otimizar produtividades e rendimentos de biomassa ou de metabolitos. A verificação da influência do dióxido de carbono no crescimento celular vegetal, carece de ser comprovada neste tipo de culturas, visto estarem em discussão comportamentos antagónicos, registados em culturas de células vegetais distintas.

O desenvolvimento de uma proposta de um modelo estruturado, em que a constituição da biomassa seria definida em função de dois ou mais compostos diferentes, intervenientes na dinâmica do crescimento da célula, com base na estequiometria do crescimento

7. Conclusões e Perspectivas

celular, na hidrodinâmica do sistema possibilitaria uma mais correcta descrição do comportamento da suspensão celular em condições dinâmicas de crescimento.

Embora numa perspectiva mais lata e distinta da abordada neste trabalho, o estudo da célula de cardo, considerada como biocatalisador modelo, potencializará a investigação na área da transformação e metabolização bioquímica de produtos abióticos e facilitará uma abordagem dos fluxos metabólicos e seu controlo sob o ponto de vista actual da Engenharia Metabólica.

REFERÊNCIAS

- Alfermann** AW, Spieler H, Reinhard E (1985). *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures* (Deus-Neuman B., Barz W. and Reinhard E. eds.) Springer-Verlag, Berlin pp.315-322.
- Allan** EJ, Scraag AH, Pugh K (1988). Cell Suspension Culture of *Picrasma quassioides*: The Development of a rapidly Growing, Shear Resistant Cell Line Capable of Quassin Formation. *J.Plant Physiol.* **132**:176-183.
- Anselmo** AM, Mateus M, Cabral JMS, Novais JM (1985). Degradation of Phenol by Immobilized Cells of *Fusarium flocciferum*. *Biotechnol. Letters* **7**(12):889-894.
- Ashihara** H, Tokoro T (1984). Metabolic Fate of Inorganic Phosphate Absorbed by Suspension Cultured Cells of *Catharanthus roseus* *J.Plant Physiol* **118**:227-235.
- Atkinson** B, Mavituna F (1985). *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, (MacMillan Publishers Ltd, eds) The Nature Press, New York pp.772.
- Bader** FG (1987) Modelling Mass Transfer and Agitator Performance in Multiturbine Fermenters. *Biotechnol. Bioeng.* **30**:37-51.
- Balley** CM, Nicholson H (1989). A New Structured Model for Plant Cell Culture. *Biotechnol. Bioeng.* **34**:1331-1336.
- Balley** CM, Nicholson H (1990) Optimal Temperature Control for a Structured Model of Plant Cell Culture. *Biotechnol. Bioeng.* **35**:252-259.
- Balagué** C, Wilson G (1982). Growth and Alkaloid Biosynthesis by Cell Suspensions of *Catharanthus roseus* in a Chemostat under Sucrose and Phosphate Limiting Conditions. *Physiol. Veg.* **20**:515-522.
- Ballica** R, Ryu DD, Powel RL, Owen D (1992). Rheological Properties of Plant Cell Suspensions. *Biotechnol. Prog.* **8**:413-420.
- Beefink** HH, van der Heijden RTJM, Heijnen JJ (1990). Maintenance Requirements: Energy Supply from Simultaneous Endogenous Respiration and Substrate Consumption. *FEMS Microbiol. Ecology* **73** : 203-210.

Referências

- Behrend J, Mateles-RL (1975)** Nitrogen Metabolism in Plant Cell Suspension Cultures I- Effect of Amino-acids on Growth. *Plant Physiol.* **56**:584-589.
- Berlin J, Wray V, Forche E, Reng H-G, Schuler H, Luckinger R, Muhlbach H-P (1985)** Production of Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV) by Large Scale Fermentation of PSTV-Infected Potato Cell Suspension Cultures. *J. Exp. Bot.* **36** (173):1985-1995.
- Bertola MA, Klis FM (1979)**. Continuous Cultivation of Glucose-Limited Bean Cells (*Phaseolus vulgaris* L.) *J. Exp. Bot.* **30**(119):1123-1231.
- Bieleski RL, Ferguson IB (1983)**. Physiology and Metabolism of Phosphate and its Compounds In: *Enc. of Plant Physiol*, vol.15 A,(Lauchli and Bieleski eds.) Springer-Verlag, Berlin pp.422- 449.
- Bishop PE, Guevara JG, Enzelke J A, Evans HJ (1976)** Relation Between Glutamine Synthetase and Nitrogenase Activities in the Symbiotic Association Between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. *Plant Physiol.* **57**: 542-546.
- Bond JS, Butler PE (1987)** Intracellular Proteases. *Ann. Rev. Biochem* **57**: 333-364.
- Bond PA, Fowler MW, Scragg AH (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**(10):713-718.
- Boon M, Meeder TA, Heijnen JJ, Luyben KChAM (1992)**. Influence of Oxygen Adsorption on the Dynamic $K_L a$ Measurement in Three-Phase Slurry Reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **40**:1097-1106.
- Borzani W, Almeida Lima U, Aquarone E (1975)** Agitação e Aeração em Fermentadores In: *Engenharia Bioquímica* Vol. 3 (Edgard Blucher, Lda. eds) São Paulo. pp.137 - 167.
- Bradford 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.

- Bramble** JL, Graves DJ (1991). Calcium and Phosphate Effects on Growth and Alkaloid Production in *Coffea arabica*. Experimental Results and Mathematical Model. *Biotechnol. Bioeng.* **37** : 859-869.
- Buitelaar** RM, Tramper J (1992) Strategies to Improve the Production of Secondary Metabolite with Plant Cell Cultures: A Literature Review *J. Biotechnol.* **23** : 111-141.
- Cameron** DC, Tong I-T (1993) Cellular and Metabolic Engineering. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **38** : 105 - 140.
- Castro e Miranda**, MM (1992). Influence of P_i and Growth Parameters and Alkaloids Production in *Catharanthus roseus* Cells Suspension. *Estágio de licenciatura*. Division of Pharmacognosy, Center for Bio-Pharmaceutical Sciences, Leiden University.
- Chagvardieff** P, Péan M, Carrier P, Dimon B, (1990). Oxygen Exchange Capacities in a Photoautotrophic Batch Culture of *Euphorbia characias* Cell Suspension. *Plant Physiol. Biochem.* **28** (2) : 231-238.
- Cherry** RS, Papoutsakis ET (1986). Hydrodynamic Effects on Cells in Agitated Tissue Culture Reactor. *Bioprocess Eng.* **1** : 29-41.
- Cliffe** K (1988) Bioreactors. In: *Biotechnology for Engineers*. (Screag A, Horwood E Limited, eds.) John Wiley & Sons New York, Chechester, Brisbane, Toronto.
- Courtois** D, Guern J (1980) Temperature Response of *Catharanthus roseus* Cells Cultivated in Liquid Medium. *Plant Science Lett.* **17** : 473-482.
- Cordelro** M., Pais MS, Brodelius PE (1993) Proteases from Cell Suspension Cultures of *Cynara cardunculus* .(submetido a Phytochemistry).
- Curtis** WR, Hasegawa PM, Emery AH (1991) Modeling Linear and Variable Growth in Phosphate Limited Suspension Cultures of Opium Poppy. *Biotechnol. Bioeng.* **38** : 371-379.
- Curtis** WR, Emery AH (1993). Plant Cell Suspension Culture Rheology. *Biotechnol. Bioeng.* **42** : 520-526.

Referências

- Dalton** CC (1980) Photoautotrophy of Spinach Cells in Continuous Culture: Photosynthetic Development and Sustained Photoautotrophic Growth *J. Exp. Bot.* **31**: 791-804.
- Dalton** CC, (1983) Photosynthetic Development of *Ocimum basilicum* Cells on Transition from Phosphate to Fructose Limitation *Physiol. Plant* **59** : 623 - 626.
- Dalton** CC (1984) The Effect of Sugar Supply Rate on Photosynthetic Development of *Ocimum basilicum* (sweet basil) Cells in Continuous Culture. *J. Exp. Bot.* **35** : 505-516.
- Dale** J, Chinc- K, Pitcher L (1987). Differential Rates of Sucrose and Hexose Transport by *Asparagus* Cell Culture. *Plant Science* **53** : 101-107.
- Dawson** RMC, Elliott DC, Elliott WH, Jones KM (1969) Data for *Biochemical Research* (Oxford Clarendon Press eds.) pp. 609.
- Dong-II** Kim, Heon Cho G, Pedersen H, Chin C- K (1991) A Hybrid Bioreactor for High Density Cultivation by Plant Cell Suspension *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34** : 726-729.
- Dougall** DK, Weyrauch KW (1980) Growth and Anthocyanin Production by Carrot Suspension Cultures Grown under Chemostat Conditions with Phosphate as the Limiting Nutrient. *Biotechnol. Bioeng.* **22** : 337-352.
- Draths** KM, Pompiano DL, Conley DL, Frest JW, Berry A, Disborow GL, Stavers KYRJ, Lievenue JC (1992) *J. Am Chem. Soc.* **114** : 3956-3962
- Drapeau** D, Blanch HW, Wilke CR (1986) Growth Kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in Batch Culture. *Biotechnol. Bioeng.* **28** : 1555-1563.
- Ducos** JP, Pareilleux A (1986). Effect of Aeration Rate and Influence of pCO₂ in Large Scale Cultures of *Catharanthus roseus* Cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25** : 101-105.
- Ducos** JP, Feron G, Pareilleux A. (1988) Growth and Activities of Enzymes of Primary Metabolism in Batch Cultures of *Catharanthus roseus* Cell Suspension under Different pCO₂ Conditions *Plant Cell Tissue Org. Culture* **13** : 167-177.

- Esquível G** (1987) Cultura de Células de *Cynara cardunculus* e sua Utilização na Coagulação do Leite. *Tese de Mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Fevereiro MP** (1991) Produção de Proteases e Metabolitos Secundários em Culturas de Células em Suspensão de *Silybum mairanum* Gaertn. *Tese de doutoramento*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Figueiredo AC**, Fevereiro P, Cabral JMS, Novais J, Pais MS (1987) *Callus* and Cell Suspension Cultures for Biomass Production of *Cynara cardunculus* (compositae) *Biotechnol. Lett.* **9** : 213-218.
- Figueiredo AC** (1992) *Achillea millefolium* ssp. Metabolitos Secundários *in vivo* e *in vitro*. *Tese de Doutoramento*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Filner P** (1966) Regulation of Nitrate Reductase in Cultured Tobacco Cells *Biochim. Biophys. Acta* **118** : 299-310.
- Fonseca MMR**, Mavituna F, Brodelius P Engineering Aspects of Plant Cell Culture (1988) In: *Plant Cell Biotechnology* (Pais MSS, Mavituna F, Novais JM eds.) Nato ASI Series Vol.18 pp. 389.
- Fowler MW** (1982) Substrate Utilisation by Plant Cell Cultures *J. Chem. Tech. Biotechnol* **32** : 338-346.
- Fowler MW** (1987) *Plant Tissue and Cell Culture* (Green, C.E. et al. eds.) Alan R. Liss. New York, pp. 459-479.
- Frazier G C** (1989) A Simple, Leaky Cell Growth Model for Plant Cell Aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* **33** : 313-320.
- Fukushima Y**, Itoh H , Fukase T , Motai H (1991) Stimulation of Protease Production by *Aspergillus oryzae* with Oils in Continuous Culture. *Appl. Microb. Biotechnol.* **34** : 586 - 590.
- Gamborg OL**, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient Requirements of Suspension Culture of Soy Bean Root Cells. *Exp. Cell Res.* **50** : 151-158.

Referências

- Gamborg** OL (1970) The Effects of Amino-acids and Ammonium on the Growth of Plant Cells in Suspension Culture. *Plant Physiol.* **45** : 372-375.
- Gamborg** OL, Shyluk JP (1970) The Culture of Plant Cells with Ammonium Salts as the Sole Nitrogen Source. *Plant Physiol.* **45** : 598-600.
- Gérard** J, Antoine P, Lepoivre Ph, Thonart Ph (1991) Uptake Kinetics and Medium Constituents During Batch Growth of Potato Cell Cultures. *Biotechnol. Lett.* **13** (5) : 381-384.
- Givan** CV (1979) Metabolic Detoxification of Ammonia in Tissues of Higher Plants. *Phytochemistry* **18** : 375-382.
- Goldblum** SB, Hink WF, Chalmers J (1990). Protective Effect of Methylcellulose and Other Polymers on Insect Cells Subjected to Laminar Shear Stress. *Biotech. Prog.* **6**: 383-390.
- Goldner** W, Thom M, Marezki A (1991) Sucrose Metabolism in Sugarcane Cell Suspension Cultures. *Plant Sci.* **73** : 143-147.
- Gomes Guerreiro** M (1981) *Ecologia dos Recursos da Terra*. (Comissão Nacional do Ambiente ed.).
- Heijnen** JJ, Terwisscha van Scheltinga AH, Straathof AJ (1992). Fundamental Bottlenecks in the Application of Continuous Bioprocesses. *J. Biotechnol.* **22** : 3-20.
- Hegarty** PK, Smart NJ, Scraag AH, Fowler MW (1986). The Aeration of *Catharanthus roseus* L.G. Don Suspension Culture in Airlift - Bioreactor. The Inhibitory Effect at High Aeration Rates on Culture Growth. *J. Exp. Bot.* **37**: 1911-1920.
- Herbert** D (1958) Some Principles of Continuous Culture In: *Recent Progress in Microbiology* Vol 7 (Tunevall G ed) Almquist and Wilsell, Stockholm.pp. 381.
- Hooker** BS, Lee JM (1992) Application of a New Structured Model to Tobacco Cell Cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **39** : 765-774.

Hong YC, Labuzza PT, Harlander SK (1989) Growth Kinetics of Strawberry Cell Suspension Cultures in Shake Flask, Airlift, Stirred - Jar and Roller Bottle Bioreactors *Biotechnol. Progress* **5** (4): 137-143.

Jones MGK, Outlaw JrWH, Lowry OH (1977) Enzymic Assay of 10^{-7} to 10^{-14} Moles of sucrose in Plant Tissues. *Plant Physiol.* **60** : 379-383.

Jordan DB, Fletcher JS (1980) Nitrate Assimilation in Suspension Cultures of Paul's Scarlet Rose *Can. J. Bot.* **58** : 1088-1094.

Kanamori T, Konishi S, Takahashi E (1972) Inducible Formation of Glutamate Dehydrogenase in Rice Plant Roots by the Addition of Ammonia to the Media. *Physiol. Plant.* **26** : 1 - 6.

Kato K, Shiozawa Y, Yamada A, Nishida K, Noguchi M (1972) A Jar Fermenter Culture of *Nicotiana tabacum* L. Cell Suspensions. *Agr. Biol. Chem.* **36** : 899-902.

Kato A, Shimizu Y, Nagai S (1975) Effect of Initial $k_L a$ on the Growth of Tobacco Cells in Batch Culture *J. Ferm. Technol.* **53** (10) : 744-751.

Kato A, Hasimoto Y, Soh Y (1976). Effect of Temperature on the Growth of Tobacco Cells. *J. Ferm. Technol.* **54** : 754-757.

Kato A, Fukasawa A, Shimizu Y, Soh Y, Nagai S (1977) Requirements of PO_4^{3-} , NO_3^- , SO_4^{2-} , K^+ , Ca^{2+} for the Growth of Tobacco Cells in Suspension Culture. *J. Ferm. Technol.* **55** (33): 207-212.

Kato A, Kawazoe S, Soh Y (1978) Viscosity of the Broth of Tobacco Cells in Suspension Culture. *J. Ferment Technol.* **56** (3): 224-228.

Kato A, Nagai S (1979) Energetics of Tobacco Cells, *Nicotiana tabacum* L., Growing on Sucrose Medium. *European J. Appl. Microb. Biotechnol.* **7** : 219-225.

Kato A, Tsuji K (1981) Growth-Substrate Relationship of Tobacco Cells in Suspension Culture. *J. Ferment. Technol.* **59** : 33-36.

Referências

- Kauppinen V**, Mannonen L, Kurten U (1987) Plant Cell Cultures in Biotechnology, *Chimica Oggi* Aprile: 73-76.
- Kim D**, Cho GH, Pedersen H, Chin C-K (1991) A Hybrid Bioreactor for High Density Cultivation of Plant Cell Suspensions. *Appl. Microb. Biotechnol.* **34** : 726 - 729.
- Kim D-II**, Park I-S (1993) Significance of Fresh Weight to Dry Weight Ratio in Plant Cell Suspension Cultures. *Biotechnol. Techniq.* **7(9)** : 627-630.
- King PJ**, Mansfield KJ, Street HE (1973) Control of Growth and Cell Division in Plant Cell Suspension Cultures. *Can J. Bot.* **51**: 1807-1823.
- King J** (1976) Growth Characteristics of *Acer pseudoplatanus* L. Cells Grown in Chemostat Culture in the Presence of Urea Alone as a Source of Nitrogen. *Plant Science Letters* **6** : 409-418.
- King PJ** (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.
- Kirby EG**, Luestekt, Lee M(1987) Nitrogen Nutrition. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry* (Bonga J, Deuzan DJ, eds) Vol. **1** Martinus Nijhoff Publishers.
- Knobloch KH**, Berlin J (1980) Influence of Medium Composition on the Formation of Secondary Compounds in Cell Suspension Cultures of *C. roseus* (L.) G. Don. *Z. Naturforsch* **35** : 551-556.
- Knobloch K H**, Beutnagel G, and Berlin J (1981) Influence of Accumulated Phosphate on Culture Growth and Formation of CinnamoYL Putrescines in Medium-Induced Cell Suspension Cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **153**: 582-583.
- Knobloch KH**, Berlin J (1983). Changes in Levels of Cellular Constituents in Suspension Culture of *Catharanthus roseus* Associated with Inorganic Phosphate Depletion. *Z. Naturforsch.* **41 C**: 1045-1051.
- Knorr D**, Miazga SM (1987). Production of Proteases from Cell Cultures of Common Milkweed (*Asclepias syriaca* L.) *J. Agric. Food Chem.* **35** : 621-624.

- Larkin P** (1976) Purification and Viability Determination of Plant Protoplasts. *Planta* **128**: 213-216.
- Leckle F, Scraag AH** (1991). An Investigation into the Role of Initial $k_L a$ on the Growth and Alkaloid Accumulation by Cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* **37** : 364-370.
- Leckle F, Scraag AH, Cliffe KC** (1991). Effect of Impeller Design and Speed on the Large-Scale Cultivation of Suspension Cultures of *Catharanthus roseus* *Enzyme Microb. Technol.* **13** : 801-810.
- Luedeking R, Piret E** (1959) Transient and Steady States in Continuous Fermentation. Theory and Experiment. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1** : 431-459.
- Lima Costa E, Novais J, Pais MS, Cabral JS** (1987). Effect of Aeration on *Cynara cardunculus* L. Plant Cell Culture. *Plant Cell Biotechnology*. Nato ASI Series. Vol 18(Pais MSS, Mavituna F, Novais JM eds) pp. 343-352.
- Lima Costa E** (1988). Cultura de Células Vegetais em Fermentador - Optimização do Crescimento da Cultura de Celulas em Suspensão de *Cynara cardunculus* L. *Tese de Mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Lips SH, Soares MIM, Kaiser JJ, Lewis OAM** (1987). K^+ Modulation of Nitrogen Uptake and Assimilation in Plants. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism* (Ullrich WR; Aparicio PJ, Syrett PJ; Castillo F eds.) Springer - Verlag.
- Lobo AM** (1976) *Biossíntese de Produtos Naturais. Metabolismo Secundário*. (Universidade Nova de Lisboa ed.)
- Loyla-Vargas VM, Gomez J, Eugenia Lopez M** (1986) Changes in the Activity of the Enzymes Involved in Nitrogen Metabolism in *Catharanthus roseus* depending on Different Nitrogen Sources. *Can J. Bot.* **64** : 2052-2056.
- Märkl H, Bromnenmeier R** (1986) Mechanical Stress and Microbial Production. In: *Biotechnology* (Rehm H-J, Reed G. eds.) **2**: 369-392

Referências

Markx GH, ten Hoopen HJG, Meijer JJ, Vinke KL, (1991) Dielectric Spectroscopy as a Novel and Convenient Tool for the Study of the Shear Sensitivity of Plant Cell in Suspension Cultures *J. Biotechnol.* **19**: 145-158.

Martin JF (1977) Control of Antibiotic Synthesis by Phosphate. In: *Adv. Biochem Eng.* Vol. 6 (Ghose T K, Fiechter A, Blakchrough N, eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp:105-127.

Martin SM, Rose D (1976) Growth of Plant Cell (*Ipomoea*) Suspension Cultures at Controlled pH Levels. *Can. J. Bot.* **54** : 1264-1270.

Martin SM, Rose D, Hui V (1977) Growth of Plant Cell Suspension Cultures with Ammonium as the Sole Source of Nitrogen. *Can J. Bot.* **55** : 2838-2843.

Martinez A, Galindo E, Salvador M (1989) Sparger Position Effect over k_La in Bench and Pilot Stirred - Tank Fermentors *J. of Ferm. Bioeng.* **68** (1) : 71-73.

Maurel B, Pareilleux A (1985) Effect of Carbon Dioxide on the Growth of Cell Suspension of *Catharanthus roseus* *Biotechn. Lett* **7** (5): 313-318.

Mavituna F (1988) Introduction to Plant Biotechnology. *Plant Cell Biotechnology.* Nato ASI Series. (Pais MSS, Mavituna F, Novais JM eds) Vol.18 pp. 1-14.

Meijer JJ (1989) Effects of Hydrodynamic and Chemical /Osmotic Stress on Plant Cells in a Stirred Bioreactor *Ph.D. Thesis.* Technical Universiteit Delft. The Netherlands

Meijer JJ, Ten Hoopen HJG, Luyben KChAM, Libbenga KR (1993) Effects of Hydrodynamics Stress on Cultured Plant Cells: A Literature Survey *Enzyme Microb. Technol.* **15** : 234-238.

Merchuk JC, Yona S, Siegel MH, Ben Zvi A (1990) On the First-Order Approximation to the Response of Dissolved Oxygen Electrodes for Dynamic k_La Estimation. *Biotechnol. Bioeng.* **35** : 1161-1163.

Mifflin BJ, Lea PJ (1976) The Pathway of Nitrogen Assimilation in Plants *Phytochemistry* **15** : 873-885.

- Miguel** MG, Barroso JG (1992) Cell Suspension Cultures of *Ononis matrix* L. Subspecies ramosissima: Establishment and Culture Conditions. *Biotechnol. Lett.* **14** (13) : 223-226.
- Mohanty** B, Fletcher JS (1978) Influence of Ammonium on the Growth and Development of Suspension Cultures of Paul's Scarlet Rose. *Physiol. Plant.* **42** : 221-225.
- Mohanty** B, Fletcher JS (1980) Ammonium Influence on Nitrogen Accumulation in Suspension Cultures of Paul's Scarlet Rose. *Physiol. Plant* **48** : 453-459.
- Monod** J (1942) *Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes* (Herman et Cie eds.) Paris.
- Moon** S-H, Parulekar SJ (1993) Some Observations on Protease Production in Continuous Suspension Cultures of *Bacillus firmus* *Biotechnol. Bioeng.* **41** : 43-54.
- Moreno** PRH, Schlatmann JE, Heijden, Van Gulik WM, Ten Hoopen HJG, Verpoorte R, Heijnen JJ (1993) Introduction of Ajmalicine Formation and Related Enzyme Activities in *Catharanthus roseus* Cells: Effect of Inoculum Density, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32** : 42-47.
- Morris** PA (1986) Regulation of Product Synthesis in Cell Cultures of *Catharanthus roseus* II- Comparison of Production Media. *Planta Med.* **50** : 905-912.
- Murashige** T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Biomass with Tobacco Tissue Cultures *Physiol. Plant* **15** : 473-497.
- Nover** L, Kranz E, Scharf KD (1982) Growth Cycle of Suspension Cultures Conditions on the Growth Cycle of Suspension Cultures of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **177** : 483-499
- Nyholm** N (1976) A Mathematical Model for Microbial Growth under Limitation by Conservative Substrate. *Biotechnol. Bioeng.* **28** : 1043-1056.
- Panda** AK, Mishra S, Bisaria VS (1992) Alkaloid Production by Plant Cell Suspension Cultures of *Hollarrhena antidysenterica*: I. Effect on Major Nutrients. *Biotechnol. Bioeng.* **39** : 1043 - 1051.

Referências

Pareilleux A, Chaubet N (1980). Growth Kinetics of Apple Plant Cell Culture *Biotechnol. Lett.* **2** (6) : 291-296

Pareilleux A, Chaubet N, (1981) Mass Cultivation of *Medicago sativa* Growing on Lactose: Kinetics Aspects. *European J. Appl. Biotechnol.* **11** : 222-225.

Pareilleux A, Vinas R (1983). Influence of the Aeration Rate on the Growth Yield in Suspension Cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J. Ferm. Technol.* **61** (4): 429-433.

Peel E (1982). Photoautotrophic Growth of Suspension Cultures of *Asparagus officinalis* (L.) in Turbidostats *Plant Science Lett.* **24** : 145-155.

Phillips R, Henshaw G (1977) Regulation of Synthesis of Phenolics in Stationary Phase Cell Cultures of *Acer pseudoplatanus* *J. Exp. Bot.* **28**: 785-794.

Pirt SJ (1965). The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures. *Proc. Royal London.* (Biol.) **163** : 224-234

Pirt SJ (1975) Energy and Carbon Source Requirement. In : *The Principles of Microbe and Cell Cultivation.* (Blackwell Scient. Publications, London U.K) pp. 63 - 80.

Ravishankar GA (1991) Development of Media for Growth of *Dioscorea deltoidea* Cells and *in vitro* Diosgenin Production: Influence of Media Constituents and Nutrient Stress *Biotechnol. Lett.* **13**(2) : 125-130.

Rebelle F, Bligny R, Douce R (1982) Regulation of P_i Uptake by *Acer pseudoplatanus* Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **219** (2) : 371-378.

Reinhard E, Kreis W, Barthlen U, Helmbold U (1989) *Ianata* Cells : Production of β -Methylidigoxin in a 300-l Air-Lift Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **34** : 502-508.

Rho D, André G, (1991). Growth and Stoichiometry of a *Catharanthus roseus* Cell Suspension Culture, Grown Under Nitrogen-Limiting Conditions *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 579-587.

Rhodes D, Leal L, Haworth P, Jamieson G, Reuter CC, Ericson M (1986) Amino Acid Metabolism of *Lemna Minor* L. I. Responses to Methionine Sulfoximine. *Plant Physiol.* **82**: 1057-1062.

- Robertson** GH, Doyle LR, Sheng P, Pavlath AE, Goodman N (1989) Diosgenin Formation by Freely Suspended and Entrapped Plant Cell Cultures of *Discorea Deltoidea* *Biotechnol. Bioeng.* **34** : 1114-1125.
- Rols** JL, Goma G (1991) Enhanced Oxygen Transfer Rates in Fermentation Using Soybean Oil-in-Water Dispersions. *Biotechnol. Lett.* **13** (1) : 7-12.
- Rose** D, Martin SM (1975) Effect of Ammonium on Growth of Plant Cells *Ipomoea sp.* in Suspension Cultures. *Can J. Bot.* **53** : 1975-1979.
- Ryan** W, Parulekar SJ, Stark BC (1989) Expression of Lactamate by Recombinant *E. coli* Strains Containing Plasmid of Different Sizes-Effects of pH Phosphate, and Dissolved Oxygen. *Biotechnol Bioeng.* **34**: 309-319.
- Ryan** W, Parulekar SJ (1990) Effects of Culture Conditions on Plasmid Stability and Production of a Plasmid-Encoded Protein in Batch and Continuous Culture of *Escherichia coli* JM 103. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **589** : 91-110.
- Sahal** OP, Shuler ML (1982). On the Nonideality of Chemostat Operation Using Plant Cell Suspension Cultures. *Can. J. Bot.* **60** : 692-700
- Sahal** OP, Shuler ML (1984) Multistage Continuous Culture to Examine Secondary Metabolite Formation in Plant Cells: Phenolics from *Nicotiana tabacum*. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 27 - 36.
- Sakano** K (1990) Proton/Phosphate stoichiometry in Uptake of Inorganic Phosphate by Cultured Cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiol.* **93** : 479-483
- Salonen** M-L, Simola LK (1989) Effect of Nitrate, Ammonium and Some Amino Acids on Growth and Nitrate Reductase Activity in Suspension Cultures of *Atropa belladonna* (1989) *Plant Cells Physiol.* **30** (8) : 1177-1181.
- Salonen** M-L (1980) Glutamate and Aspartate-Derived Amino Acids as Nitrogen sources for the callus of *Atropa belladonna* L. *Ann. Bot. Fennice* **17**: 357-358.

Referências

Schlatmann JE, Nutila AM, Van Gulik WM, ten Hoopen HJG, Verporte R, Heijnen JJ. (1993) Scaleup of Ajmaciline Production by Plant Cell Cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 253-262.

Schmidt AJ, Lee JM, An G (1989) Media and Environmental Effects on Phenolics Production from Tobacco Cell Cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 1437-1444.

Schnapp SR, Curtis WR, Bresson RA, Hasegawa PM (1991a) Growth Yields and Maintenance Coefficients of Unadapted and Na Cl Adapted Tobacco Cells Grown in Semi- Continuous Culture. *Plant Physiol.* **96** : 1289-1293.

Schnapp SR, Curtis WR, Bresson RA, Hasegawa PM (1991b) Estimulation of Growth Yield and Maintenance Coefficient of Plant Cell Suspensions. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 1131-1136.

Schlei O, Berlin J (1987) Large Scale Fermentation and Alkaloid Production of Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tissue Org. Cultures* **8** : 153- 161.

Scragg AH, Allan EJ, Bond PA, Smart NJ (1986) In: *Plant Cell Cultures* (Morris P et al. eds.) Cambridge University Press: Cambridge, England pp.178-194.

Scragg AH, Morris P, Allan EJ, Bond P, Fowler MW (1987) Effect of Scale-up on Serpentine Formation by *Catharanthus roseus* Suspension Cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 619-624.

Scragg AH, Allan EJ, Leckie F (1988) Effect of Shear on the Viability of Plant Cell Suspensions. *Enzyme Microbiol. Technol.* **10**: 361-367.

Scragg AH, Ashton S, York A, Bond P, Sephan-Sarkissian G, Grey D (1990) Growth of *Catharanthus roseus* Suspension for Maximum Biomass and Alkaloid Accumulation *Enzyme Microbiol. Technol.* **12** : 292-298.

Shimazaki A, Hirose F, Ashihara H (1982) Changes in Adenine Nucleotide Levels and Adenine Salvage During the Growth of *Vinca rosea* Cells in Suspension Culture. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **106** : 191-198.

Shuler ML (1986) Production of Secondary Metabolites from Plant Tissue Culture - Problems and Prospects. *Ann. N. Y. Acad. Sciences* **469** : 65-78.

Shuler ML (1988) In: *Plant Cell Biotechnology* Nato ASI Series (Pais MSS *et al.* eds) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo pp. 329-351.

Slater S, Gallahert T, Dennis D (1992) Production of Ploy-(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain. *Appl. Environ. Microb.* **58** : 1089-1094.

Smart NJ, Fowler MW (1981) Effect of Aeration on Large-Scale Cultures of Plant Cells. *Biotechnol. Lett.* **3** : 171-176.

Snape JB, Thomas NH (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.

Sonsbeek HM, Gielen SJ, Tramper J (1991) Steady-state Method for Ka Measurements in Model Systems. *Biotechnol. Techniq.* **5** (3): 157-162.

Soule JC, Wilhelm AM, Riba JP, Ambid C (1987) Bioreacteur à Contraintes Mecaniques Controleés. Application à la Culture *in vitro* de Cellules Végétales. *Entropie* **23** (136): 24-31.

Stephanopoulos G, Sinskey AJ (1993) Metabolic Engineering Methodologies and Future Prospects. *Tibtech* September : 392-396.

Stitt M, MacLilley R, Gerhardt R, Heldt HW (1989) Determination of Metabolite Levels in Specific Cells and Subcellular Compartments of Plant Leaves. *Meth. Enzym.* **174**: 518-552.

Street HF (1966) *Cells and Tissue in Culture* Academic Press, London.

Taras MJ (1971). Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater, (American Public Health Association eds), N.Y. pp. 874

Referências

- Takayama S, Misawa M, Misato K, Ko T, (1977)** Effect of Cultural Conditions on the Growth of *Agrostemma githago* Cells in Suspension Culture and the Concomitant Production of an Anti-plant Virus Substance *Physiol. Plant* **41**: 313-320.
- Tanaka H (1981)** Technological Problems in Cultivation of Plant Cells at High Density. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 1203-1218.
- Tanaka H, (1982)** Oxygen Transfer in Broth of Plant Cells at High Density. *Bioeng. Biolog.* **24**: 425-442.
- Tanaka H (1987)** Large-Scale Cultivation of Plant Cells at High Density : A Review *Process Biochem.* **22** (8): 106-113.
- Tanaka H, Semba H, Jitsufuchi T, Harada H (1988)** The Effect of Physical Stress on Plant Cells in Suspension Cultures. *Biotechnol. Lett.* **10** (7): 485-490.
- Tanaka O, Takeba G, Izawak Mera T (1990)** Inhibition of Flower Induction by some Inhibitions of Protease in the Short - day Plant *Lemna paucicostata* 6746 and the Long - Day Plant *Lemna Gibba* 63. *Plant Cell Physiol.* **31** : 383-389.
- Tanaka H, Aoyagi H, Jitsufuchi T (1992)** Turbidimetric Measurement of Cell Biomass of Plant Cell Suspensions. *J. Ferm. Bioeng.* **73** : 130 - 134.
- Taticek RA, Moo-Young M, Legge RL (1990)** Effect of Bioreactor Configuration on Substrate Uptake by Cell Suspension Cultures of the Plant *Eschscholtzia californica* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33** : 280-286.
- Taussky H, Shorr E (1953)** A Microbromimetric Method for the Determination of Inorganic Phosphate. *J. Biol. Chem.* **202** : 675-685.
- Ten Hoopen HJG, van Gulik WM, Heijnen JJ (1992)** Continuous Culture of Suspended Plant Cells *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28 P**: 115-120.
- Tomarelli R, Charney M, Harding M (1949)** The Use of Azoalbumin as a Substrate in the Colorimetric Determination of Peptic and Tryptic Activity. *J. Lab. Clin Med.* **34** : 428 - 433.

- Treat WJ, Engler CR (1989)** Culture of Photomixotrophic Soybean and Pine in a Modified Fermentor Using a Novel Impeller (1989) *Biotechnol. Bioeng.* **34** : 1191-1202.
- Tulecke W, Nickell LG (1956)** Methods, Problems and Results of Growing Plant Cells under Submerged Conditions. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **22**: 196-206.
- Tulecke W, Nickell LG (1959)** Production of Large Amount of Plant Tissue by Submerged Culture. *Science* **130** : 863-864.
- Tulecke W (1966)**. Continuous Culture of Higher Plant Cells in Liquid Media : The Advantages and Potential Use of a Phytostat. *Ann N.Y. Acad. Sc.* **139** : 162-175.
- Turner C, Howell JA (1984)** On Line Estimation of the Time Constant of Oxygen Electrodes by Time Series Analysis. *Biotechnol. Lett.* **6 (4)** : 215-220.
- Ukaji T, Ashihara H (1986)** Changes in Levels of Cellular Constituents in Suspension Culture of *Catharanthus roseus* Associated with Inorganic Phosphate Depletion. *Z. Naturforsch.* **41 c**: 1045-1051.
- Ukaji T, Ashihara H (1987)**. Effect of Inorganic Phosphate on the Levels of Amino-Acids in Suspension-Cultured Cells of *Catharanthus roseus*. *Annals Bot.* **60** : 109-114.
- Ulbrich B, Wiesner W, Arens H (1985)** In : *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, (Newman *et al.* eds) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York.
- Van Gulik WM, Meijer JJ, ten Hoopen HJG, Luyben K, Libbenga KR (1989)**. Growth of a *Catharanthus roseus* Cells Suspension Culture in a Modified Chemostat under Glucose-Limiting Conditions. *Applied Microbiol. Biotechnol.* **30** : 270-275.
- Van Gulik W (1990)** Growth Kinetics of Plant Cells in Suspension Culture. *Ph.D. Thesis*. Technical Universiteit Delft. The Netherlands.
- Van Gulik WM, ten Hoopen HJG, Heijen JJ (1992)** Kinetics and Stoichiometry of Growth of Plant Cell Cultures of *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* in Batch and Continuous Fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **40** : 863- 874.

Referências

Van Gulik WM, ten Hoopen HJG, Heijen JJ (1993). A Structured Model Describing Carbon and Phosphate Limited Growth of *Catharanthus roseus* Plant Cell Suspension in Batch and Chemostat Culture. *Biotechnol. Bioeng.* **41** : 771-780.

Van Uden N (1971) Kinetics and Energetics of Yeast Growth In : *The Yeasts* (Rose HA, Harrison JS eds.) London: Academic Press pp.75-118.

Veliky IA, Martin SM (1970) A Fermenter for Plant Cell Suspension Cultures. *Can J. Microbiol.* **16** (4) : 223-226.

Veliky IA, Rose D (1973) Nitrate and Ammonium as Nitrogen Nutrients for Plant Cell Cultures *Can J. Bot.* **51** : 1837-1844.

Wagner F, Vogelmann H (1977) In : *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application* (Barz W, Reinhard E, Zenk MH eds.) Springer-Verlag, Berlin pp. 245-252.

Westgate PJ, Curtis WR, Emery AH, Hasegawa PM, Heinsteins PF (1991) Approximation of Continuous Growth of *Cephalotaxus harringtonia* Plant Cell Cultures Using Fed-Batch Operation. *Biotechnol. Bioeng.* **38** : 241-246 .

Weatherburn MW (1967) Phenol-Hypoclorite Reaction for Determination of Ammonia. *Anal. Chem.* **39** : 971-974.

Wilson SB, King PJ, Street HE (1971). Studies on the Growth in Culture of Plant Cells XII: A Versatile System for the Large Scale Batch or Continuous Culture of Plant Cell Suspensions. *J. Exp. Bot.* **22** : 177-207.

Wilson G, Marron P (1978) Growth and Anthraquinone Biosynthesis by *Galium mollugo* L. Cells in Batch and Chemostat Culture. *J. Exp. Bot.* **29** (111) : 837-851.

Wilson G (1979) In : *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Thorpe, TA ed.) Cargary, The International Association for Plant Tissue Culture. pp. 169.

Wilson G, Balagué C (1985). Biosynthesis of Anthraquinone by Cells of *Galium mollugo* L. Grown in a Chemostat with Limiting Sucrose or Phosphate *J. Exp. Bot.* **36** (164) : 485-493.

- Wilson G.** (1987) On-Line Estimation of Biomass Using Dynamic Oxygen Balancing *Biotechnol. Techniq.* **1** (3) : 151-156.
- Winjnsma R, Verpoorte R, Harkes P, van Viliet T, ten Hoopen H, Svendsen AB** (1986) The Influence of Initial Sucrose and Nitrate Concentration on the Growth of *Cinchona ledgeriana* Cell Suspension Cultures and the Production of Alkaloids and Anthraquinones *Plant Cell, Tissue Org.Cultures* **7** : 21-29.
- Yamamoto Y, Kinoshita Y, Watanabe S, Yamada Y** (1989) Anthocyanin Production in Suspension Cultures of High - Producing Cells of *Euphorbia millii* . *Agric. Biol. Chem.* **53** (2) : 417-423.
- Yokoi H, Koga J, Yamamura K, Seike Y, Tanaka H** (1993) High Density Cultivation of Plant Cells in a New Aeration-Agitation Type Fermentor, Maxblend Fermentor. *J. of Ferm. Bioeng.* **75** (9): 48-52.
- Yoon MY, Yoo YJ, Cadman TW** (1989) Phosphate Effects in the Fermentation of α -Amilase by *Bacillus amyloliquefaciens* . *Biotechnol. Lett.* **11**: 57-60.
- Young M** (1973) Studies on the Growth in Culture of Plant Cells. XVI. Nitrogen Assimilation During Nitrogen-Limited Growth of *Acer pseudoplatanus* L. Cells in Chemostat Culture. *J. Exp. Bot.* **24**(83) : 1172-1185.
- Zenk MH, El-Shagi H, Arens H, Stockigt J, Werler EW, Deus B** (1977) Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmaciline in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. In: *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Applications*, (Barz W, Reinhard E, Zenk MH eds) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 27-43.
- Zink MH** (1982) Regulation of Nitrate Reductase by Various Nitrogen Sources in Cultured *Ipomoea* sp. *Can J. Bot.* **60** : 386 - 396.
- Zurhake F, Wander M** (1985) High Pressure Liquid Plant Material, *Gartenbauwissenschaft*, **50**: 91-93.

ANEXO

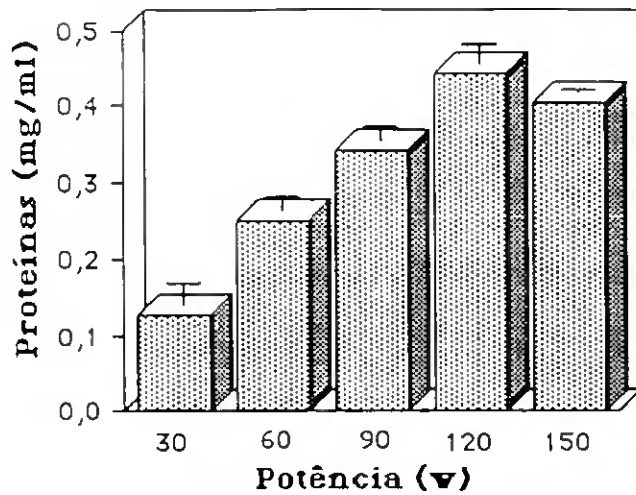


Fig. IA. Variação do teor proteico total da suspensão celular de *C. cardunculus*, com a potência de vibração ultra-sónica.

Fig. IB. Variação do teor proteico total da suspensão celular de *C. cardunculus*, com o tempo de incidência de vibração ultra-sónica.

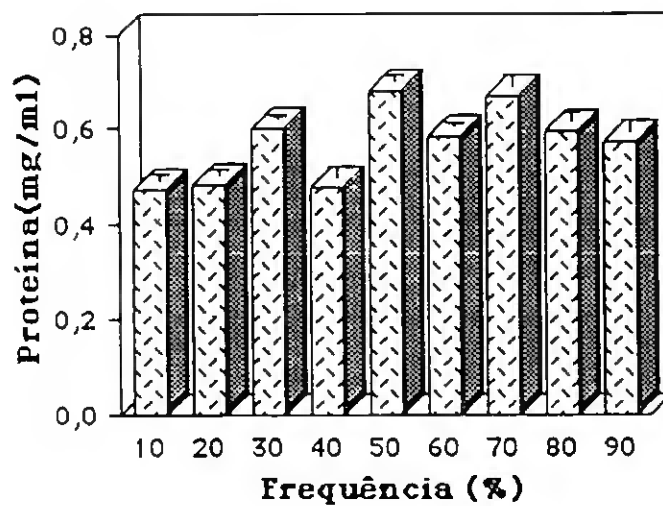
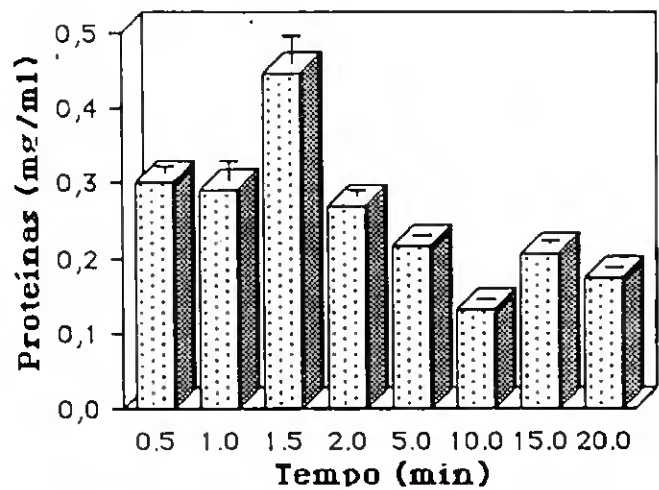


Fig. IC. Variação do teor proteico total da suspensão celular de *C. cardunculus*, com a frequência de vibração ultra-sónica.

