



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOCÊNCIAS**

**LUIZ FERNANDO BIANCHINI**

**DESENVOLVIMENTO DE REATOR AIRLIFT PARA PRODUÇÃO DE BIOFILME  
FÚNGICO DE *Cunninghamella elegans* E SEU EMPREGO EM PROCESSOS DE  
BIOTRANSFORMAÇÃO**

**CURITIBA**

**2019**

**LUIZ FERNANDO BIANCHINI**

**DESENVOLVIMENTO DE REATOR AIRLIFT LEITO-FIXO PARA PRODUÇÃO DE  
BIOFILME FÚNGICO DE *Cunninghamella elegans* E SEU EMPREGO EM  
PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO**

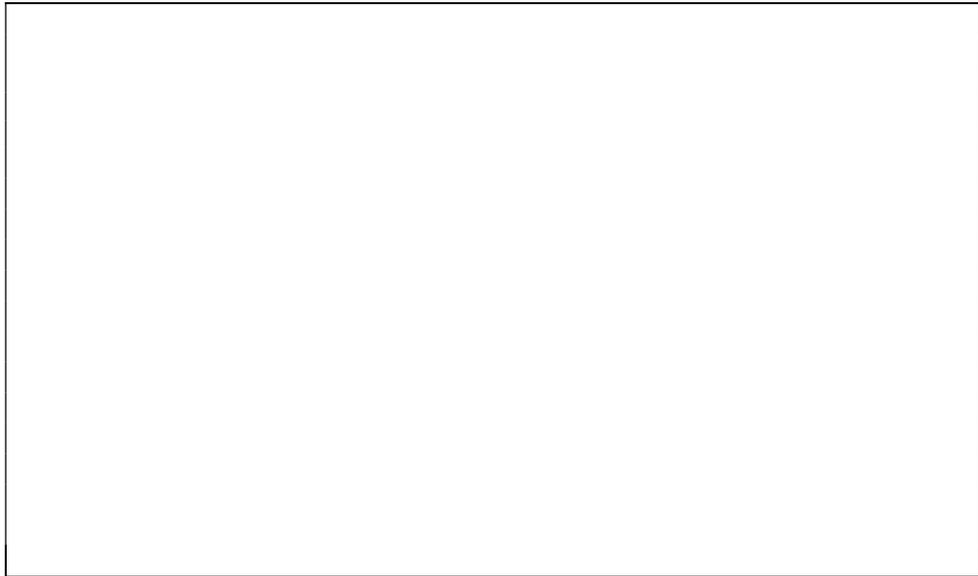
**Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para defesa pública e obtenção do título de Doutor.**

**Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Antonio  
Ribeiro Rosa**

**CURITIBA**

**2019**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central



Dedico esta tese à minha família.  
Sem o apoio e a compreensão dos que amo nada seria possível.

1

## AGRADECIMENTOS

2           À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, que com seus programas de  
3 apoio e incentivo proporcionou-me as condições necessárias para a realização do  
4 doutorado.

5           À CAPES pelo apoio financeiro durante um importante período da tese,  
6 subsidiando minha permanência no programa.

7           Ao meu orientador, Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, por ter aceitado  
8 orientar-me e possibilitar o desenvolvimento de um projeto promissor, que permitirá  
9 inúmeras pesquisas em minha presente e futura carreira de pesquisador. Agradeço a  
10 amizade, consideração e extrema preocupação, não apenas enquanto professor, mas  
11 enquanto pessoa, sempre atento às demandas e necessidades de seus orientados.  
12 Muito obrigado!

13           À técnica da Unidade de Pesquisa em Xenobióticos, M.Sc. Rosemeire Takaki  
14 Rosa, que sem sua dedicação e constantes intervenções nos rumos dos  
15 experimentos, certamente este trabalho não alcançaria os resultados aqui  
16 apresentados. Obrigado pela dedicação e amizade.

17           À minha querida e pouco ajuizada amiga Dra. Marcela Cardoso de Lima Selow,  
18 por apresentar-me ao professor Dr. Edvaldo e indicar-me para o ingresso no  
19 doutorado. Não tenho como agradecer-lá.

20           Agradeço especialmente à graduanda Rafaella de Paula Caldas, que  
21 acompanhou e realizou inúmeras etapas experimentais, tornando-se minha primeira  
22 bolsista. Você tem um futuro brilhante, que suas ideias floresçam. Agradeço por sua  
23 dedicação e empenho.

24           Agradeço também a todos estagiários que, durante o desenvolvimento da tese,  
25 acompanharam e desenvolveram alguma etapa da pesquisa.

26           Não posso deixar de agradecer aos meus colegas doutorandos da Unidade de  
27 Pesquisa em Xenobióticos, Dra. Maria Fernanda Cordeiro Arruda, Dr. Fabiano  
28 Geronasso, M.Sc. Romeu Cassiano Pucci da Silva Ramos e M.Sc. Angela Bonjorno  
29 Arantes, e também à professora Dra. Patricia Maria Stuelp Campelo, pelo  
30 compartilhamento de saberes, boas conversas e companheirismo. A vocês desejo  
31 sucesso em suas carreiras.

1           À toda equipe do Lapiagro, em especial, a Dra. Keliani Bordini, que  
2 acompanhou todas as etapas pré-analíticas e analíticas da pesquisa. Seu  
3 conhecimento e empatia foram essenciais para chegarmos até aqui. Aceite meus  
4 sinceros agradecimentos.

5           Às mais recentes (umas nem tanto) membros da Unidade de Pesquisa com  
6 Xenobióticos, M.Sc. Nicolý Subtil, Dra. Lorena Carolina Pena e M.Sc. Patrícia  
7 Tolentino da Rosa de Souza, que, juntamente com M.Sc. Romeu, muito contribuíram  
8 para o texto final desta tese. Obrigado pelo carinho e companheirismo.

9           A todos os professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em  
10 Odontologia da PUCPR, por compartilharem seus saberes ou dedicarem seu tempo  
11 para auxiliar-me na caminhada. Obrigado!

12           Ao Professor Dr. Saulo Henrique Weber, que sem sua inestimável colaboração,  
13 os dados desta tese seriam apenas números sem significado.

14           Aos meus pais e irmãos, que sempre me incentivaram e me apoiaram em  
15 minhas escolhas. Sou um felizardo por ter nascido e crescido em tão amável berço.

16           À minha querida esposa Andrea, que com seu amor permaneceu em meu lado,  
17 em todos os momentos de dificuldades e conquistas. Sem seu apoio nada seria  
18 possível. Te amo!

19           Às minhas princesas, Luiza e Sofia, perdoem-me pelo tempo que não dediquei  
20 a vocês por causa dos meus estudos. Compensarei em dobro pelo tempo que Deus  
21 me permitir. Amo vocês!

22           À Deus, pela nossa existência.

**Se algo não é obviamente impossível, então deve haver uma maneira de ser  
feito.”**

Sir Nicholas Winton

## RESUMO

1 Fungos demonstram enorme habilidade de biotransformação, sendo possível  
2 direcionar a sua aplicação a processos de biorremediação e síntese de novas  
3 moléculas. Para tornar tais processos escaláveis, foi desenvolvido um reator híbrido  
4 *airlift*-leito fixo (RAL-LF), cujos parâmetros hidrodinâmicos e reológicos [tempo de  
5 mistura ( $t_M$ ), velocidade linear de gás ( $U_G$ ), velocidade linear de líquido ( $U_L$ ) retenção  
6 geral de gás ( $\epsilon_G$ ), viscosidade ( $\nu$ )], de transferência de massa ( $k_{LA}$ ), de formação de  
7 biomassa e de biotransformação foram comparados com reator *airlift* (RAL) e reator  
8 de coluna de bolhas (RCB). Como modelo fúngico foi empregada a *Cunninghamella*  
9 *elegans* DSM1908. Para determinação das propriedades biológicas, os sistemas  
10 foram inoculados e deixados para formar biomassa por 72 h. Os caldos foram  
11 substituídos por solução contendo diclofenaco (DCF)  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e deixados por 48  
12 h nos reatores. As biomassas foram determinadas por gravimetria. As taxas de  
13 biotransformação foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho  
14 (HPLC). As diferenças nos parâmetros hidrodinâmicos justificaram o melhor  
15 desempenho de RAL e RAL-LF na obtenção de biomassa e de biotransformação.  
16 Sugerimos que RAL-LF apresenta maior desempenho pela melhora no processo de  
17 oxigenação, além do *baffle* ser utilizado pelo fungo como meio de adesão e  
18 proliferação em forma de biofilme. A formação do biofilme fúngico, além de reduzir o  
19 viscosidade do sistema, favoreceu a retenção do DCF no leito-fixo, facilitando assim,  
20 os processos de biotransformação. Análises em HPLC demonstraram que o biofilme  
21 apresenta tanto atividade biotransformadora como bioacumuladora, tornando o RAL-  
22 LF o sistema de maior rendimento em biotransformação.

24 **Palavras-chave:** reatores *airlift*; biofilme; biotransformação; *Cunninghamella elegans*.

## ABSTRACT

1 Fungi demonstrate an enormous ability of biotransformation, being possible to direct  
2 its application to processes of bioremediation and synthesis of new molecules. In order  
3 to make such processes scalable, a fixed-bed hybrid airlift (RAL-LF) reactor was  
4 developed whose hydrodynamic and rheological parameters [(mixing time ( $t_M$ ), linear  
5 gas velocity ( $U_G$ ), liquid linear velocity ( $U_L$ ), gas hold-up ( $\epsilon_G$ ), viscosity ( $\nu$ )], mass  
6 transfer ( $k_{L,a}$ ), biomass formation and biotransformation were compared with airlift  
7 reactor (RAL) and bubble column reactor (RCB). As a fungal model *Cunninghamella*  
8 *elegans* DSM1908 was used. To determine the biological properties, the systems were  
9 inoculated and left to form biomass for 72 h. The broths were replaced by solution  
10 containing diclofenac (DCF) 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and left for 48h in the reactors. The  
11 biomasses were determined by gravimetry. Biotransformation rates were determined  
12 by high performance liquid chromatography (HPLC). The differences in the  
13 hydrodynamic parameters justified the better performance of RAL and RAL-LF in  
14 obtaining biomass and biotransformation. We suggest that RAL-LF shows higher  
15 performance due to the improvement in the oxygenation process, besides the baffle  
16 being used by the fungus as a medium of adhesion and proliferation in the form of a  
17 biofilm. The formation of the fungal biofilm, besides reducing the viscosity of the  
18 system, favored the retention of the DCF in the bed-fixed, thus facilitating the  
19 processes of biotransformation. HPLC analysis has demonstrated that biofilm presents  
20 both biotransforming and bioaccumulating activity, making RAL-LF the highest yielding  
21 biotransformation system.

22 **Key-words:** airlift reactors; biofilm; biotransformation; *Cunninghamella elegans*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema de formação do biofilme fúngico.....	16
Figura 2: Reatores empregados no estudo.....	24
Figura 3: Descrição técnica dos componentes do RAL de circulação interna..	25
Figura 4: RAL-LF em funcionamento após inoculação do meio M3.....	35
Figura 5: RAL-LF após 72h de incubação e 28 °C e aeração de 0,5 vvm.....	36
Figura 6: <i>Baffles</i> com biofilme de <i>C. elegans</i> DSM 1908.....	37
Figura 7: Padrão de desenvolvimento de biomassa em RAL.....	37
Figura 8: Cromatograma correspondente ao meio (planctônico) do sistema controle sem fungo com DCF em RAL-LF.....	38
Figura 9: Cromatograma correspondente ao biofilme do sistema tratamento com DCF em RAL-LF.....	39
Figura 10: Cromatograma correspondente à fase líquida do sistema tratamento com DCF em RAL-LF.....	39

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros hidrodinâmicos e de transferência volumétrica de massa para os três tipos de reator empregados no estudo, para um fluxo de gás de 0.50 vvm ( $0.0005 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$ ).....	34
<b>Tabela 2.</b> Dados sobre biotransformação de DFC em produto por <i>C. elegans</i> DSM1908 nos três tipos de reatores empregados, para um fluxo de gás de 0.50 vvm ( $0.0005 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$ ) e meio de cultura M3.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E GLOSSÁRIO

- 1 BR: *baffle* rígido
- 2 BT: *baffle* tela
- 3 C\*: concentração de saturação de oxigênio dissolvido
- 4 C: concentração instantânea de oxigênio dissolvido
- 5 C<sub>0</sub>: concentração inicial de oxigênio dissolvido
- 6 CMC: Carboximetilcelulose
- 7 CYP: citocromo P450
- 8 DCF: Diclofenado
- 9 NaDCF: Diclofenaco de sódio
- 10 3-OH-DCF: 3-hidroxi-diclofenaco
- 11 4-OH-DCF: 4-hidroxi-diclofenaco
- 12 4-OH-lactum-DCF: 4-hidroxi-lactum-diclofenaco
- 13 E: Fração aproximada do equilíbrio
- 14 EPS: Exopolissacarídeo
- 15  $h_D$ : Altura da dispersão gás-líquido
- 16  $h_L$ : é a altura do líquido livre de gás
- 17 HPLC: Cromatografia líquida de alto desempenho
- 18  $k_{La}$ : Coeficiente volumétrico de transferência de massa
- 19 ln: Logaritmo natural
- 20 RAL: Reator *airlift*
- 21 RAL-LF: Reator *airlift* leito fixo
- 22 RCB: Reator câmara de bolhas
- 23 RPA: Reator perfeitamente agitado
- 24  $U_G$ : Velocidade linear do gás
- 25  $U_L$ : Velocidade linear do líquido
- 26 vvm: volume de ar por minuto
- 27  $\epsilon_G$ : Retenção de gás
- 28 UPX: Unidade de Pesquisa em Xenobióticos

## SUMÁRIO

1		
2	1. INTRODUÇÃO .....	13
3	1.1 Biofilmes .....	14
4	1.2 Biorreatores .....	17
5	1.2.1 Parâmetros hidrodinâmicos.....	19
6	1.3 <i>Cunninghamella elegans</i> DSM1908 .....	21
7	1.4 Biotransformação do diclofenaco pela <i>C. elegans</i> .....	22
8	2. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
9	2.1 Reatores experimentais .....	24
10	2.2 Parâmetros hidrodinâmicos .....	26
11	2.2.1 Fase líquida.....	26
12	2.2.2 Regime de fluxo de ar .....	26
13	2.2.3 Tempos de mistura ( $t_m$ ) .....	26
14	2.2.4 Velocidade linear do gás ( $U_G$ ) .....	26
15	2.2.5 Velocidade linear do líquido ( $U_L$ ).....	27
16	2.2.6 Retenção de gás ( $\epsilon_G$ ) .....	27
17	2.3 Coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ).....	27
18	2.4 <i>Cunninghamella elegans</i> DSM 1908 .....	28
19	2.5 Preparo dos inóculos .....	28
20	2.6 Formação de biomassa .....	28
21	2.7 Biotransformação do DCF .....	29
22	2.7.1 Preparo da curva padrão para o diclofenaco de sódio (NaDCF).....	29
23	2.7.2 Ensaio de biotransformação do DCF.....	30
24	2.7.3 Preparo das amostras para HPLC .....	30
25	2.7.3.1 Extração de diclofenaco e do seu biotransformado da fase líquida .....	30
26	2.7.3.2 Extração de DCF e seu biotransformado do biofilme .....	31
27	2.7.4 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	31
28	2.7.5 Robustez.....	31
29	2.7.6 Determinação das concentrações de DCF e do seu biotransformado nas	
30	extrações.....	31
31	2.8 Determinação das viscosidades dos bulks .....	32
32	2.9 Análise estatística.....	32
33	3. RESULTADOS .....	34
34	4. DISCUSSÃO .....	41

1	5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	48
2	6. REFERÊNCIAS.....	49
3	ANEXO 1: RAL montado com seus componentes principais. ....	55
4	ANEXO 2: Detalhe da porção superior do RAL. ....	56
5	ANEXO 3: Detalhe do fundo do jarro com o <i>baffle</i> e sistema de aeração com	
6	aspersor.....	57
7	ANEXO 4: Gráficos utilizados para determinação do $k_La$ . ....	58
8	Gráfico 1: Parâmetros para determinação do coeficiente de transferência	
9	volumétrico de oxigênio em água osmosificada.....	58
10	Gráfico 2: Parâmetros para determinação do coeficiente de transferência	
11	volumétrico de oxigênio em CMC 0,25% .....	58
12	Gráfico 3: Parâmetros para determinação do coeficiente de transferência	
13	volumétrico de oxigênio CMC 0,5% .....	59

## 1 1. INTRODUÇÃO

2 Em virtude da alta demanda por produtos com elevado valor agregado, novas  
3 atribuições dos microrganismos são requeridas. Essas variam desde processos  
4 industriais para produção de alimentos, compostos farmoquímicos e de química pura,  
5 até aplicações em processos de despoluição e de biorremediação. Logo,  
6 microrganismos funcionam como “pequenas fábricas” ou “pequenos agentes  
7 conversores de matéria” (1).

8 A biotransformação compreende modificações estruturais em xenobióticos  
9 (alterações químicas) por sistemas enzimáticos que levam a formação de moléculas  
10 relativamente mais polares, e que podem: a) ser excretadas pelo organismo (2,3,4)  
11 ou; b) que não serão capazes de atravessar com facilidade as membranas, tornando  
12 menos tóxicas para a célula, mas em alguns casos, à despeito da função protetiva  
13 detoxicante de algumas reações, c) tornam-se tóxicas. Ainda, reações de  
14 biotransformação podem resultarem em d) metabólitos quimicamente estáveis com  
15 atividade farmacológica desejável (5).

16 Tais processos fisiológicos, considerados mecanismos de adaptação às  
17 mudanças ambientais, quando delineados para as demandas industriais, podem ser  
18 úteis em uma diversificada gama de processos biotecnológicos (6).

19 A utilização de organismos biotransformadores é classificada como  
20 Biotecnologia Branca (White Biotechnology), que é um campo emergente entre as  
21 biotecnologias modernas que servem a indústria (7). Ela emprega células vivas  
22 (animais, plantas, algas, fungos filamentosos, leveduras, actinomicetos ou bactérias),  
23 assim como enzimas produzidas por esses, na geração de produtos de interesse.  
24 Células vivas podem ser empregadas em seu estado original (*wild-strains*) ou  
25 melhoradas para trabalhar como “fábricas celulares” na produção de enzimas ou de

1 moléculas (8). Apesar do potencial de utilização, o número e diversidade de  
2 aplicações é ainda modesto. Existe uma grande disponibilidade de microrganismos  
3 viáveis, uma quantidade ainda maior de reações que eles podem realizar, e não  
4 menos importante, as reações de biotransformação são consideradas  
5 economicamente e ecologicamente competitivas (9).

6 Um importante desafio na biotransformação industrial é o desenvolvimento de  
7 bioprocessos que otimizem a taxa de bioconversão com redução de gastos e de  
8 passivos ambientais. Nossa proposta é de utilizar biofilmes fúngicos crescidos em  
9 biorreatores pneumaticamente agitados (biorreatores *airlift*) para otimização de  
10 processos de biotransformação.

11 O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um modelo de reator híbrido  
12 *airlift*-leito fixo (RAL-LF) para desenvolvimento de biomassa fúngica em forma de  
13 biofilme, que permita escalabilidade e aplicação do biofilme formado em processos de  
14 biotransformação.

15 Para demonstrar a hipótese de ganho de capacidade biotransformadora, os  
16 dados do RAL-LF foram comparados com o reator *airlift* (RAL) e o reator de câmara  
17 de bolhas (RCB).

## 18 **1.1 Biofilmes**

19 Biofilmes são comunidades microbianas vivendo na interface de ecossistemas.  
20 São amplamente distribuídos no ambiente. As células estão geralmente embebidas  
21 em uma matriz secretadas por elas próprias, composta por polissacarídeos, proteínas,  
22 DNA, entre outras moléculas, usualmente chamadas de substâncias poliméricas  
23 extracelulares (SPE). Esta matriz é responsável pela adesão ao substrato e pela  
24 coesão celular, serve como uma camada de proteção contra adversidades do meio  
25 ambiente, um estoque de nutrientes para pequenos períodos de privação, uma rede  
26 para difusão de metabolitos e nutrientes, além de proporcionar a comunicação celular.

1 Donlan e Costerton<sup>10</sup> descreve biofilmes como sendo uma comunidade sésil,  
2 microbialmente derivada, caracterizada por células que se ligam irreversivelmente a  
3 um substrato ou interface ou entre si, embebidas em uma matriz de substâncias  
4 poliméricas extracelulares que eles produziram e exibem um fenótipo alterado com  
5 relação a a taxa de crescimento e transcrição gênica.

6 Segundo Cheng<sup>11</sup> biofilmes também podem ser definidos como lâminas  
7 celulares microbianas de ocorrência natural, as quais são irreversivelmente ligadas a  
8 superfícies sólidas. As células microbianas, por estarem envolvidas por uma matriz de  
9 exopolissacarídeo (EPS), exibem crescimento e bioatividade diferentes das células  
10 em suspensão. Para Boari<sup>12</sup>, o EPS também é capaz de adsorver cátion, metais e  
11 toxinas e conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos  
12 e dessecação.

13 Cerca de 90% da massa de um biofilme é água, e o EPS e glicoproteínas  
14 correspondem a mais de 70% da massa seca de um biofilme. Sua espessura pode  
15 variar de alguns micrometros até vários centímetros, dependendo da espécie do  
16 microrganismo, a idade do biofilme, disponibilidade de nutrientes e o estresse de  
17 cisalhamento a qual esteja submetido.(11)

18 Fungos filamentosos também são hábeis na produção de biofilmes. Segundo  
19 Harding *et. al.*<sup>13</sup>, os biofilmes de fungos filamentosos são formados conforme as  
20 seguintes etapas:

21 1) adsorção do propágulo, etapa que depende do contato do organismo com a  
22 superfície (envolve esporos ou fragmentos de hifas, relacionada com as forças  
23 hidrofóbicas dos esporos fúngico);

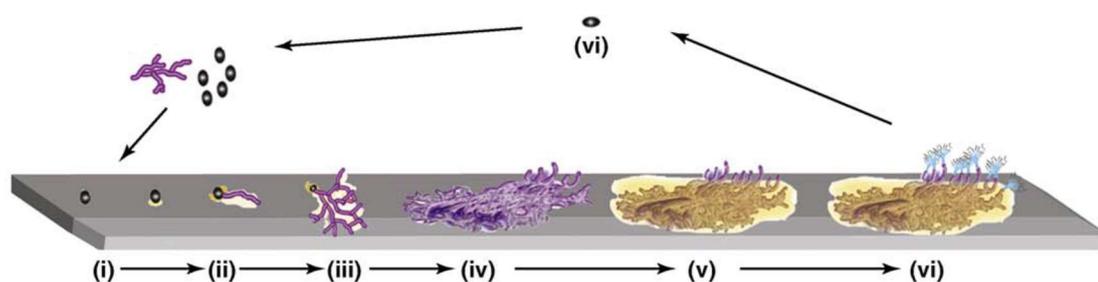
24 2) adesão ativa à superfície tanto pelo esporo ou fragmento de hifa (liberação  
25 de substâncias de adesão);

1           3) formação de microcolônias, processo que envolve o crescimento inicial pela  
2 germinação dos esporos, alongamento apical e ramificação das hifas, causando a  
3 colonização da superfície (envolve a produção de SPE para fortalecer a adesão ao  
4 substrato);

5           4) maturação inicial onde a biomassa fúngica aumenta, com a formação de  
6 compacta rede de hifas, ou micélio por hifa-hifa (envolve formação de canais que  
7 permitem o fluxo de substâncias através da biomassa);

8           5) maturação caracterizada por formação de corpos de frutificação e;

9           6) Fase de dispersão, onde tanto esporos quanto fragmentos do biofilme podem  
10 ser liberados. As células destacadas agirão como novo propágulo para reiniciar o  
11 ciclo.



TRENDS in Microbiology

12

13           Figura 1: Esquema de formação do biofilme fúngico. Fonte: Harding *et al.*<sup>13</sup>.

14           Uma importante propriedade atribuída aos biofilmes nos processos de  
15 descontaminação de ambientes aquáticos é a bioadsorção. Segundo Michalak *et al.*<sup>14</sup>,  
16 bioadsorção é uma subcategoria de adsorção, onde o sorbente é uma matriz biológica.  
17 É um processo de ligação rápida e reversível de íons em soluções aquosas pelos  
18 grupos funcionais que estão presentes na superfície da biomassa. Esse processo é  
19 independente do metabolismo celular.

20           Fomina e Gadd<sup>15</sup>, em artigo de revisão relatam que biofilmes são compostos  
21 majoritariamente de polissacarídeos, assim como cápsulas, camada limosa e parede

1 celular que podem ser importantes componentes bioabsortivos em sistemas de  
2 células vivas, especialmente os biofilmes, dependendo da natureza dos  
3 polissacarídeos e dos componentes associados.

4 No entanto, as propriedades de bioissorção não apresentam ainda vasta  
5 aplicação industrial pela dificuldade de recuperação da matriz e pela necessidade de  
6 produção de material biológico em larga escala. (14)

## 7 **1.2 Biorreatores**

8 Os processos de biotransformação de xenobióticos envolvendo fungos, e entre  
9 eles a *C. elegans*, são normalmente conduzidos em condições de agitação em  
10 Erlenmeyer (16). Estudos que empregaram biorreatores com células planctônicas  
11 reportaram melhor desempenho (17, 18). Por outro lado, foi proposto que biofilmes  
12 fúngicos serviriam melhor aos processos de biotransformação (19).

13 Com sua excepcional estabilidade e menor necessidade de nutrientes, os  
14 reatores de biofilme demonstram seu potencial para o desenvolvimento de  
15 fermentação contínua e as aplicações na produção em larga escala de produtos de  
16 valor agregado (11).

17 Reatores produtores de biofilmes podem ser classificados em dois grupos, leito-  
18 fixo (fixed-bed) e leito-expandido (expanded-bed). Os reatores com leito-fixado podem  
19 a) possuir a superfície de crescimento totalmente submersa no meio de cultivo; b) ser  
20 do tipo biofiltro no qual o líquido escorre no substrato de crescimento, enquanto o gás  
21 flui em sentido contrário; c) o contator biológico rotativo em que o biofilme se  
22 desenvolve na superfície de um disco vertical parcialmente submerso e gira dentro  
23 do líquido; e d) reatores de biofilmes de membrana, no qual a camada microbiana é  
24 formada em uma membrana porosa permeável ao gás. Por sua vez, reatores com  
25 leito-expandido utilizam leitos fluidizados nos quais as partículas se movem para cima

1 e para baixo dentro do leito expandido em área definida do reator, e leitos móveis nos  
2 quais todo o leito expandido circula pelos reatores, como reatores *airlift* e reatores de  
3 leito circulante (20, 11).

4 Biorreatores tipo “perfeitamente agitados” (RPA) normalmente permitem o  
5 crescimento de células planctônicas em condições monitoráveis e controláveis de pH,  
6 concentração de nutrientes e de oxigênio dissolvido, além de temperatura. O  
7 crescimento se dá pela dispersão de nutrientes/O<sub>2</sub> por agitação com propulsores. Em  
8 biorreatores tipo *airlift* essa agitação é conseguida com a injeção de gases  
9 (normalmente ar ou O<sub>2</sub> estéreis) na parte inferior, com conseqüente efeito misturador  
10 (21).

11 Os Reatores de Câmara de bolhas (RCB) e Reatores *Airlift* (RAL) são  
12 classificados como biorreatores pneumáticos, nos quais a fase líquida é movida por  
13 bombeamento de ar. Esses reatores são geralmente cilíndricos e seus aspersores  
14 encontram-se na base do sistema para manter um nível adequado de agitação e  
15 transferência de oxigênio, sendo operados com alto fluxo de ar. As principais  
16 vantagens são os baixos custos de operação e manutenção devido a ausência de  
17 partes móveis, além de serem fáceis de operar. No entanto, o uso de fluidos viscosos  
18 não-Newtonianos é considerado um fator limitante na escolhas destes equipamentos,  
19 desde que a alta viscosidade decresce a retenção de gás, evitando a formação e  
20 estabilização do leito de bolhas homogêneas, o que também possui impacto negativo  
21 na transferência de massa entre gás e líquido (21).

22 Tratando-se especificamente de reatores RAL, existem dois tipos de reatores,  
23 com circulação interna ou externa (22). Os RAL contam com uma região aspergida  
24 por gás; esta região é chamada de *riser*, ou subida. A outra região é responsável pela  
25 decida, onde o meio é retornado. Sendo assim, tem o nome de decida, ou *downcomer*.

1 As duas regiões são interligadas no reator e, por apresentarem um ciclo, promovem  
2 uma diferença na densidade de dispersão. Por causa desta divisão, setor de subida e  
3 descida, somado com a placa vertical no meio reator, este tipo se configura como *airlift*  
4 *split-cylinder*. Por isso, em RAL, o movimento de subida e decida faz com que o meio  
5 de cultura seja deslocado através do impulsionamento das bolhas de ar. A soma  
6 destes fatores traz ambiente propício para que todas células e/ou microrganismos  
7 entrem em contato com o meio de cultura (23, 24).

8 A placa vertical que separa o *riser* do *downcomer* é também o suporte para  
9 adsorção das células para formação do biofilme. As características deste suporte são  
10 importantes para a formação do biofilme. As forças de cisalhamento são muito  
11 pequenas em poros ou reentrâncias da superfície mesmo em condições onde a  
12 velocidade do meio é alta. Poros garantem um ambiente protegido para a adesão das  
13 células e seu crescimento. A formação do biofilme tende a aumentar com o aumento  
14 da hidrofobicidade da superfície do material. Biofilmes formam mais rapidamente no  
15 Teflon e outros plásticos do que vidro ou metal, possivelmente devido às diferenças  
16 de hidrofobicidade das superfícies e das cargas iônicas (20). A tela de aço inox AISI  
17 304 também apresenta importante hidrofobicidade, além de apresentar a porosidade  
18 necessária para permitir o ancoramento das células e posterior formação de biofilme  
19 (12).

#### 20 1.2.1 Parâmetros hidrodinâmicos

21 A determinação dos parâmetros hidrodinâmicos são bases experimentais  
22 importantes para a definição da eficiência de um sistema *airlift*. Determinar a taxa de  
23 circulação gasosa e de sólidos, além de avaliar o coeficiente volumétrico de  
24 transferência de massa, diâmetro de bolha e taxa de cisalhamento são importantes  
25 fatores para o design e operação de tais reatores. (21, 25)

1            Para fins de comparação, o Reator *airlift* de leito fixo (RAL-LF) desenvolvido foi  
2    testado comparando seus parâmetros com RAL e RCB. Os RCB são dispositivos  
3    simples e estão ganhando grande aceitação em aplicações envolvendo contato gás-  
4    líquido em bioprocessos, na indústria de processos químicos e no tratamento de água  
5    residual. Apesar do aspecto favorável é preciso ter cautela com a taxa de aeração  
6    elevada que provoque cisalhamento, ou baixa aeração que promova a estagnação de  
7    células no fundo do reator (26).

8            Mirón<sup>26</sup> apresenta importantes fundamentos da hidrodinâmica do sistema: 1) a  
9    circulação de gás é necessariamente relacionada com a velocidade superficial do gás  
10   e o aumento médio da velocidade da bolha; 2) para um dado fluido e regime de fluxo,  
11   a velocidade média da bolha depende somente do diâmetro da bolha; 3) em condições  
12   pré-estabelecidas, o tamanho da bolha é controlado pelo fornecimento de energia no  
13   reator; 4) em sistemas *airlift*, o coeficiente volumétrico de transferência de massa de  
14   oxigênio depende da contribuição das regiões de *riser* e *downcomer*.

15           Os meios de cultura líquido contendo células e produtos da excreção dos  
16   microrganismos comportam-se como flúidos não-newtonianos, por tal motivo, o  
17   cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de massa do oxigênio é testado  
18   em água (líquido newtoniano) e solução de carboximetilcelulose (CMC) (flúido não  
19   newtoniano) (27).

20           Centenas de processos biológicos ocorrem na presença de microrganismos  
21   aeróbios e em meios com alta viscosidade, o que implica em grandes mudanças para  
22   os sistemas de aeração, agitação e mistura, com o propósito de suprir de oxigênio  
23   gasoso em sua forma dissolvida para o crescimento celular e formação de produtos  
24   de interesse. Para uma adequada transferência de oxigênio da fase gasosa para a  
25   fase líquida, a geração de regiões de alto cisalhamento devem ser evitadas,

1 considerando que afetam as células e produzem alterações morfológicas irreversíveis  
2 nos microrganismos. (28)

### 3 **1.3 *Cunninghamella elegans* DSM1908**

4 O fungo, *C. elegans* pertence ao reino Fungi, filo Zygomycota, ordem  
5 Mucorales, família Cunninghamellaceae e gênero *Cunninghamella*. O gênero  
6 *Cunninghamella* contem espécies com importância médica e para processos  
7 biotecnológicos. É um fungo encontrado em solo e produtos vegetais, particularmente  
8 no Mediterrâneo e zonas subtropicais. (29)

9 O gênero *Cunninghamella* tem sido objeto de estudos em inúmeras áreas. Por  
10 possuírem inúmeras isoformas da enzima P450 (família CYP) pode ser aplicada em  
11 estudos de biotransformação de medicamentos, poluentes, substâncias químicas  
12 bioativas e corantes (29, 30, 31, 32, 33, 34), substituindo o tecido hepático para  
13 produção de metabólitos secundários em testes farmacodinâmicos, contribuindo com  
14 o campo da bioética por possibilitar a redução do uso de animais de laboratórios para  
15 tais testes.

16 Por serem fungos filamentosos produtores de biofilme, também participam de  
17 processos de biossorção de corantes e metais pesados (35, 36, 37, 38). Tigini<sup>39</sup>  
18 enfatiza a versatilidade da *C. elegans* em adsorver corantes, sais, metais pesados e  
19 surfactantes, tornando-a um promissor biossorvente para aplicações biotecnológicas.  
20 Ainda é possível, com alterações no meio de cultivo, modular a composição do  
21 biofilme, alterando suas propriedades enquanto adsorvente, fazendo com que o fungo  
22 produza biofilmes com maior ou menor hidrofília, favorecendo a adsorção de  
23 moléculas com diferentes naturezas químicas. (40)

#### 1 **1.4 Biotransformação do diclofenaco pela *C. elegans***

2 O diclofenaco (DCF) é o anti-inflamatório não-esteroidal mais utilizado na  
3 Europa. Possui atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória. É metabolizado no  
4 fígado por um membro da subfamília CYP2C a 4-hidroxiclofenaco (4-OH-DCF), seu  
5 principal metabólito, além de outras formas hidroxiladas. Depois da glucoronização e  
6 sulfatação os metabólitos são excretados na urina (65%) e bile (35%). (41)

7 Pertence ao grupo de produtos químicos de preocupação emergente e possui  
8 elevada relevância ambiental. Apresenta efeitos tóxicos em abutres, além de ser  
9 hepato e nefrotóxico em alguns peixes. Como consequência de sua importância  
10 ambiental, foi incluído na *Watch List* do *European Water Framework Directive*. (42)

11 A biotransformação de xenobióticos em mamíferos é similar à realizada pelas  
12 células da *Cunninghamella spp.* em virtude da presença de enzimas da família CYP.  
13 O DCF pode ser convertido para 3-hidroxi-diclofenaco (3-OH-DCF) e 4-hidroxi-lactum-  
14 diclofenaco (4-OH-lactum-DCF) pela *C. elegans*. (4, 29)

15 Amadio<sup>19</sup> demonstrou a capacidade biotransformadora do flurbiprofeno pela *C.*  
16 *elegans* em biofilme, demonstrando que, imobilizada em sua matriz extracelular, o  
17 fungo é mais eficiente nos processos biotransformadores que em sua forma  
18 planctônica. Quinn<sup>3</sup>, desafiou células de *C. elegans* para a biotransformação de DCF,  
19 tanto com células imobilizadas em alginato quanto em biofilmes. Seus resultados  
20 demonstraram que o biofilme apresenta resultados superiores de biotransformação,  
21 além do biofilme poder ser rejuvenescido e reutilizado em ao menos 2 ciclos de 72  
22 horas de biotransformação. No entanto, todos os processos foram realizados em  
23 frascos de erlenmeyer agitados ou em placas de 96 poços.

1            Desta forma, reconhecendo a habilidade de biotransformação da *C. elegans*  
2   para a molécula de DCF, decidiu-se pela molécula como desafio teste ao biofilme  
3   desenvolvido no RAL-LF.

## 1 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2 2.1 Reatores experimentais

3 Para determinação dos parâmetros hidrodinâmicos e formação de biomassa  
4 foram empregados reatores de vidro borossilicato de 1000 mL (55×500 mm), com as  
5 seguintes arquiteturas (Figura 2 e 3):

- 6 • Reator *Airlift*-Leito Fixo (RAL-LF), com *baffle* de tela de aço inoxidável AISI304
- 7 • Reator *Airlift* (RAL), com *baffle* de vidro
- 8 • Reator Coluna de Bolhas (RCB) sem *baffle*.

9

10

11

12

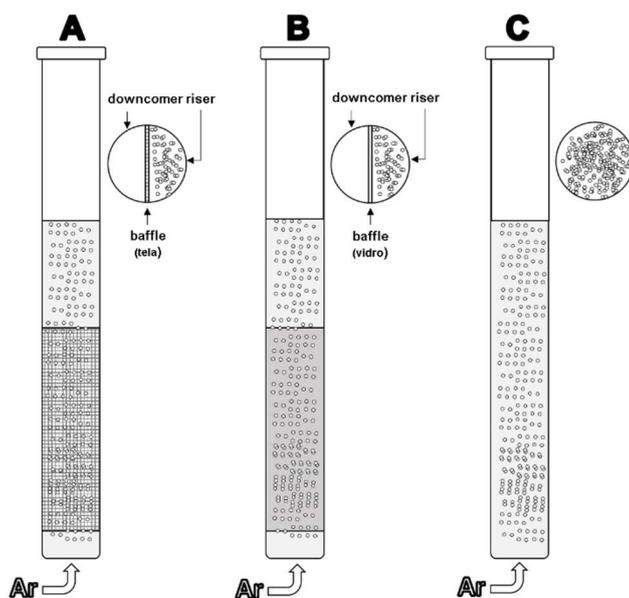
13

14

15

16

17



18

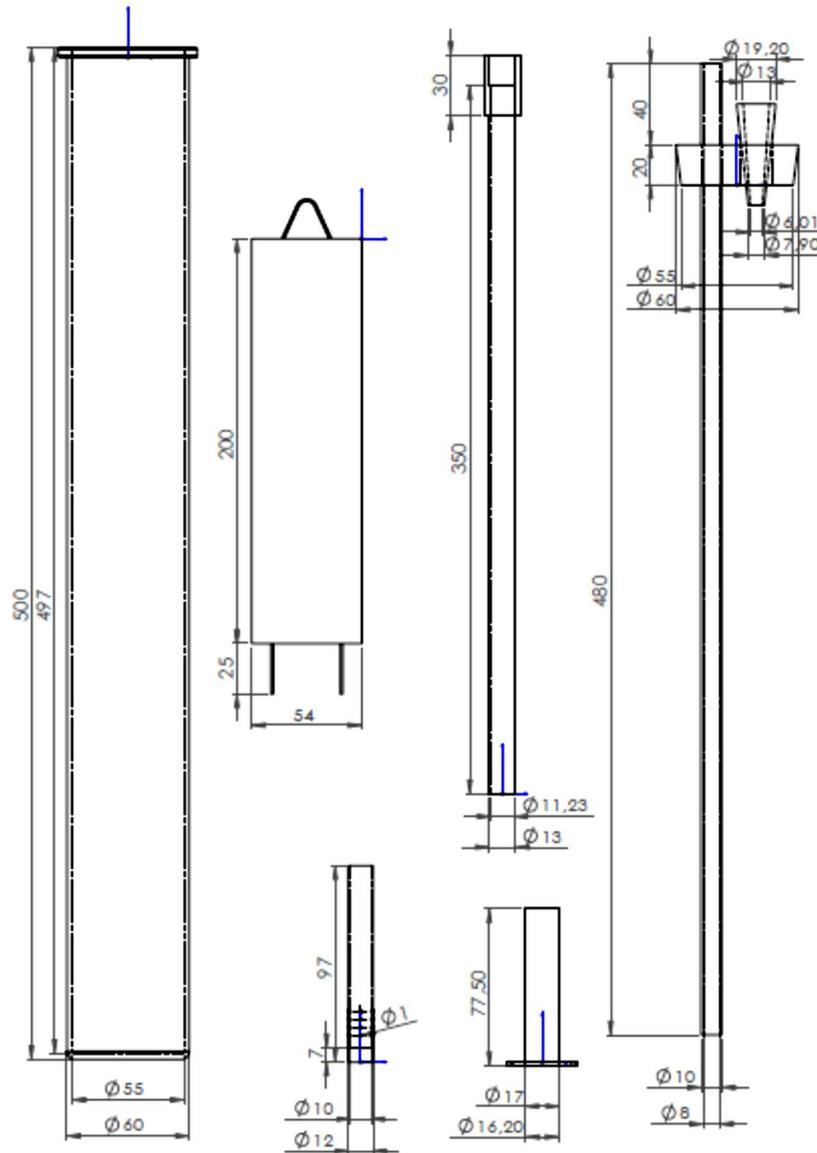
19 **Figura 2.** Reatores empregados no estudo. A = RAL-LF. B = RAL. C = RCB. Nos reatores RAL-LF e

20 RAL a razão  $D_{riser}/D_{downcomer}$  era 1,00.

21

22

Todos os parâmetros hidrodinâmicos, produção de biomassa e biotransformação foram testados em RAL-LF, RAL e RCB.



1

2 **Figura 3:** Descrição técnica dos componentes dos RAL-LF de circulação interna com medidas em  
 3 mm. A = vaso de vidro borossilicato com capacidade nominal de 1 L. B = *Baffle* reticulado de tela de  
 4 aço inoxidável AISI304 de malha #30, fio 0,25mm, abertura 0,60 mm. C = Aspersor de silicone (5 cm e  
 5 20 perfurações de 1 mm). D = Exaustor em aço inoxidável AISI304. D = Filtro de lã de vidro acoplável  
 6 no exaustor. F = Tubulação para aeração.

## 1 2.2 Parâmetros hidrodinâmicos

### 2 2.2.1 Fase Líquida

3 Água osmosificada ( $\mu=0,89$  mPa.s @ 25 °C) foi usada como fluido newtoniano.  
4 Para simular condições não-newtonianas, carboximetilcelulose (CMC) (Labsynth  
5 Ltda., Brasil) foi utilizada nas concentrações finais de 0,25% ( $\mu=7,50$  mPa.s @ 25 °C)  
6 e 0,50% ( $\mu=15,00$  mPa.s @ 25 °C). As soluções de CMC foram preparadas com água  
7 osmosificada com pH final corrigido para 7,0. (27)

### 8 2.2.2 Regime de fluxo de ar

9 Os reatores operaram em regime de fluxo de ar constante de 0,50 vvm  
10 (correspondente a  $0,005$  m<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>). A fase gasosa para todos experimentos foi ar  
11 comprimido isento de óleo. A posição dos aspersores definiu o riser do RAL e RAL-  
12 LF. No RCB o aspersor foi centralizado no fundo do jarro.

### 13 2.2.3 Tempos de mistura ( $t_M$ )

14 Os reatores foram preenchidos com volumes de trabalho de  $0,0008$  m<sup>3</sup> (800 mL)  
15 com água osmosificada ou soluções de CMC. Ar comprimido foi admitido nos sistemas  
16 e após 60 s, de forma cuidadosa, foi adicionada uma gota de fucsina 1% na superfície  
17 dos líquidos. Os intervalos de tempo necessários para que o todo o volume do vaso  
18 se tornasse vermelho e homogêneo foram registrados com cronógrafo e considerados  
19 como tempos de mistura.

### 20 2.2.4 Velocidade linear do gás ( $U_G$ )

21 As  $U_G$  foram os quocientes obtidos na divisão do fluxo de ar volumétrico  
22 (m<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>) pelas áreas da seção transversal dos *risers* (m<sup>2</sup>).

### 1 2.2.5 Velocidade linear do líquido ( $U_L$ )

2 As  $U_L$  foram os quocientes obtidos na divisão do percurso percorrido pelos  
3 líquidos (*riser* mais *downcomer*) pelos tempos de mistura dos líquidos.

### 4 2.2.6 Retenção de gás ( $\varepsilon_G$ )

5 As retenções gasosas foram mensuradas a partir da diferença da altura da  
6 coluna de líquidos antes e após a injeção de gás no sistema, segundo a equação (9):

$$7 \quad \varepsilon_G = \frac{h_D - h_L}{h_D} \quad \text{eq.1}$$

8 onde  $h_D$  é a altura da dispersão gás-líquido e  $h_L$  é a altura do líquido livre de gás.

9 Os reatores foram preenchidos com água osmosificada ou soluções de CMC  
10 até o volume de trabalho, sendo o nível alcançado medido no reator ( $h_L$ ) visualmente,  
11 através de marcações no nível antes da aeração e nova marcação após aeração. O  
12 ar foi fornecido ao sistema a taxas de fluxo de ar de 0,50 vvm ( $0,005 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$ ). Os  
13 volumes finais ( $h_D$ ) foram registrados após 30 s .

## 14 2.3 Coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ )

15 Os  $k_{La}$  foram determinados por gaseamento transiente. Todos os experimentos  
16 foram conduzidos com temperatura controlada em banho-maria ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), com pressão  
17 atmosférica ambiente ( $\sim 1015 \text{ hPa}$ ). O fluxo de ar comprimido foi mantido em 0,50 vvm.  
18 No início de cada análise, nitrogênio era bombeado para o interior do sistema, com o  
19 intuito de remover todo o oxigênio dissolvido. Esgotado todo oxigênio inicia-se o  
20 bombeamento de ar atmosférico em fluxo constante (0,50 vvm) para analisar a  
21 transferência de oxigênio para o *bulk*. O aumento da concentração de oxigênio na fase  
22 líquida era medido com oxímetro Lutron DO-5509 (Lutron Electron. Enterp. Co. Ltd,  
23 Taiwan) até 95% do seu limite de saturação (10). As análises foram realizadas em  
24 triplicata. Os  $k_{La}$  foram calculados conforme as equações (9):

1 
$$-\ln(1 - E) = k_L a(t - t_0) \quad \text{eq. 2}$$

2 Onde  $t$  corresponde ao tempo de medida da saturação de oxigênio,  $t_0$  o tempo inicial  
3 e  $E$  é a fração aproximada do equilíbrio e pode ser estimada por:

4 
$$E = \frac{C - C_0}{C^* - C} \quad \text{eq.3}$$

5 Sendo  $C$  a concentração instantânea de oxigênio dissolvido,  $C_0$  a concentração  
6 inicial de oxigênio dissolvido e  $C^*$  a concentração de saturação do oxigênio dissolvido.

## 7 **2.4 *Cunninghamella elegans* DSM 1908**

8 Foi utilizada a cepa *Cunninghamella elegans* DSM1908, gentilmente cedida pelo  
9 Prof. Dr. Cormac Declan Murphy, da School of Biomolecular and Biomedical Science,  
10 University College Dublin (Dublin, Irlanda). A cepa foi mantida em Ágar Sabouraud  
11 Dextrose (ASD) a 28 °C, com repiques quinzenais.

## 12 **2.5 Preparo dos inóculos**

13 Placas de Petri (90×15 mm) contendo ASD foram semeadas com *C. elegans*  
14 DSM1908 e mantidas em estufa a 28 °C para crescimento por um período de 5 d.  
15 Toda a biomassa fúngica desenvolvida na placa foi transferida para um  
16 homogeneizador de Tenbroek de 40 mL. A biomassa homogeneizada foi diluída em  
17 água destilada estéril e a concentração de células foi ajustada para tubo #10 da escala  
18 de McFarland.

## 19 **2.6 Formação de biomassa**

20 Os reatores contendo 0,0008 m<sup>3</sup> de meio M3 (composição : glucose 40 g.L<sup>-1</sup>;  
21 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,55 g.L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 g.L<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>Cl 2,1 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g.L<sup>-1</sup>;  
22 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,01 g.L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,03 g.L<sup>-1</sup>) receberam 15 mL de inóculo de *C.*  
23 *elegans* DSM1908 e 10 µL de antiespumante a base de emulsão de silicone (Biotec  
24 Ltda, Cotia). A produção de biomassa ocorreu a 28 °C e 0,5 vvm de ar, por 72 h. Os

1 meios foram filtrados em papel de filtro qualitativo, gramatura 80g/m<sup>2</sup>, poros de 14µm  
2 (J.Prolab, São José dos Pinhais, Pr) e os *baffles* contendo o biofilme foram removidos  
3 para secagem. Ambos foram secos a 50 °C durante 48 h. Suas massas foram  
4 determinadas por gravimetria. No reator de Coluna de bolhas, a massa seca do  
5 sedimento fúngico era aquela retida no papel de filtro. Para o sistema *airlift*, a massa  
6 corresponde à soma do sedimento fúngico no papel de filtro mais a massa do biofilme  
7 aderido no *baffle* correspondia à biomassa total.

## 8 **2.7 Biotransformação do DCF**

9 Para padronização da fase pré-analítica foram adaptados os métodos de Amadio  
10 *et al.*<sup>19</sup>, Emami *et al.*<sup>43</sup> e da Farmacopéia Japonesa<sup>44</sup>. Emami<sup>43</sup> descreve o processo  
11 de extração do diclofenaco e metabólitos de plasma sanguíneo, incluindo a  
12 importância da acidificação para a extração, além do método cromatográfico.  
13 Amadio<sup>19</sup> realizou a extração do DCF em meio de cultura. A Farmacopéia Japonesa<sup>44</sup>  
14 determinou o melhor método de ressuspensão do DCF após purificação por  
15 evaporação.

16

### 17 2.7.1 Preparo da curva padrão para o diclofenaco de sódio (NaDCF)

18 Massas de 26,85 mg de NaDCF (Cayman Co, Ann Arbor, MI) (equivalente a 25  
19 mg de DCF) foram transferidas para balões volumétricos e dissolvidos com q.s.p. 25  
20 mL em metanol:água (70:30), que gerou uma solução de DCF 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Parte dessa  
21 solução foi diluída, de forma seriada para se obter concentrações de 500, 100, 50, 10,  
22 5 e 1 µg.mL<sup>-1</sup>, com as quais foram construídas curvas-padrão de concentração de  
23 DCF. (43)

1 As diferentes soluções foram filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm (Filtrilo  
2 Ltda, Colombo, Brasil) para frascos âmbar de 2 mL com septos de silicone (Analítica  
3 Ltda, São Paulo)

#### 4 2.7.2 Ensaio de biotransformação do DCF

5 Os reatores contendo 0,0008 m<sup>3</sup> (800 mL) de meio M3 receberam 15 mL de  
6 inóculo de *C. elegans* DSM1908 e 10 µL de antiespumante. Os biofilmes foram  
7 produzidos em 28 °C e 0,5 vvm de ar, por 72 h. O substrato (caldo M3) foi removido e  
8 substituído por solução aquosa de DCF 500 µg.mL<sup>-1</sup> ou água osmosificada (controle  
9 negativo). As incubações dos biofilmes com DCF foram conduzidas por 48 h, mantidos  
10 os parâmetros de temperatura e aeração anteriores.

#### 11 2.7.3 Preparo das amostras para HPLC

12

##### 13 2.7.3.1 Extração de diclofenaco e do seu biotransformado da fase líquida

14 Foram transferidas alíquotas de 2 mL da fase líquida de cada  
15 tratamento/repetição para tubos cônicos contendo 1 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M e 7 mL de n-  
16 hexano:isopropanol (9:1). A mistura foi agitada em vórtex AP56 (Phoenix Lufenco Ltda,  
17 Araraquara, Brasil) por 2 min, seguido de sonicação a 40 kHz em banho (Odontobras  
18 Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), por 10 min. A separação se deu por centrifugação em  
19 2000 ×g, por 3 min (Centrifuga Bio Eng BE-4004). O sobrenadante foi recolhido e a  
20 fase aquosa foi submetida a nova extração com 5 mL de n-hexano:isopropanol (9:1).  
21 Esse segundo sobrenadante foi combinado com o da primeira extração. Essa mistura  
22 foi evaporada até secar em 45 °C (concentrador de amostras REQUIPAL, Brasil) sob  
23 fluxo de ar comprimido seco de 2 L.min<sup>-1</sup>. O precipitado seco foi ressuspensionado em  
24 2 mL de mistura metanol:água (70:30). Após homogeneização em vórtex (2 min) e  
25 incubação em misturador orbital TE420 (Tecnal Ind Ltda, Piracicaba, Brasil) em 25 °C,

1 por 24 h, as amostras foram filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm para frascos  
2 âmbar de 2 mL com septos de silicone.

### 3 2.7.3.2 Extração de DCF e seu biotransformado do biofilme

4 Os *baffles* recobertos por biofilme foram removidos dos vasos do reator e  
5 deixados a secar em posição vertical por 2 h. Toda a massa de biofilme foi removida  
6 com pinça e espátula por raspagem e transferida para tubo de homogeneizador  
7 Sorvall™ Omni-Mixer 160000 NL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Os  
8 biofilmes foram homogeneizados por 2 min em rotação média. Massas de 2 g dos  
9 homogenatos foram transferidas para tubos cônicos de centrifugação e a extração do  
10 DCF e seu biotransformado como descrito no tópico anterior.

### 11 2.7.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

12 As amostras purificadas foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta  
13 eficiência Agilent 1220 Infinity LC utilizando uma coluna Hypersil GOLD CN (Thermo  
14 Scientific) (150×4,6 mm; tamanho de partícula 3 µm). A corrida cromatográfica foi  
15 isocrática, com fase móvel acetonitrila:água acidificada (pH 3,5 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (45:55),  
16 gradiente de 2 mL por min, por 6 min. Foi utilizado o detector DAD ajustado a leitura  
17 em comprimento de onda de 276 nm.

### 18 2.7.5 Robustez

19 Para verificação da robustez do sistema, repetições das corridas  
20 cromatográficas foram realizadas em três momentos distintos, com intervalos de 8 h.

### 21 2.7.6 Determinação das concentrações de DCF e do seu biotransformado nas 22 extrações

23 Para determinar as concentrações do DCF foi produzida uma curva padrão de  
24 sete pontos, que resultou na equação da reta  $y=40,245x+274,9$  com  $R^2=0.9979$ .

1 Admitindo que 1 mol de DCF produz 1 mol de biotransformado, a massa  
2 molecular foi considerada 296,148 g/mol para DCF e 3-OH-DCF ou 4-OH-lactum-  
3 DCF. Esta taxa foi usada para calcular a concentração teórica de biotransformado.  
4 Portanto, a mesma equação foi utilizada para calcular as concentrações reais de DCF  
5 e as concentrações teóricas de biotransformado (45).

## 6 **2.8 Determinação das viscosidades dos bulks**

7 Foi utilizado um viscosímetro de efluxo tipo Ford de orifício #2 (Tech Vision Ltda),  
8 nivelado e em temperatura ambiente de 25 °C.

9 Os caldos M3 descartados após a substituição por solução de DCF 500 µg mL<sup>-1</sup>  
10 foram centrifugados (2000 ×g; 2 min) e os sobrenadantes foram homogeneizados em  
11 vórtex. O orifício do viscosímetro era fechado com lâmina de vidro plana e o copo era  
12 preenchido até transbordamento. O nivelamento das amostras no copo era feito com  
13 placa de vidro plana. A placa de vidro que fechava o orifício do viscosímetro era  
14 removida e as amostras eram escoadas. O tempo de escoamento total era  
15 acompanhado por cronógrafo. Os ensaios foram realizados em triplicata com desvios-  
16 padrão inferiores a 3%. A conversão de segundos para cSt foi feita através de tabela  
17 padronizada para Copo Ford/ASTM. Os dados foram expressos em m<sup>2</sup>/s, unidade do  
18 sistema internacional (S.I.) para viscosidade cinemática, sendo que 1 cSt equivale a  
19 1,0.10<sup>-6</sup> m<sup>2</sup>/s.

## 20 **2.9 Análise estatística**

21 Para os parâmetros hidrodinâmicos foi realizado o teste de normalidade de  
22 Shapiro-Wilk, seguido da verificação da homocedasticidade pelo teste de Levene. As  
23 médias foram comparadas pela ANOVA a 3 fatores, seguidas do teste de Tukey,  
24 quando ocorreram diferenças significativas.

1           A média da biomassa foi comparada pelo teste t de student após determinada  
2 a normalidade e heterogeneidade dos dados pelos métodos de Levene e ANOVA a 3  
3 fatores.  
4

### 1 3. RESULTADOS

2 A Tabela 1 traz os parâmetros de funcionamento dos reatores para diferentes  
 3 condições de fluido de arraste e tipo de reator. A retenção global de gás ( $\epsilon_G$ ) não variou  
 4 nas comparações entre os reatores e nos diferentes fluídos usados para a  
 5 parametrização ( $p > 0,05$ ). As velocidades com que os líquidos percorriam as colunas  
 6 dos reatores ( $U_L$ ) não variaram para RLA e RLA-LF ( $p > 0,05$ ), mas foram menores  
 7 para RCB ( $p < 0,05$ ). Comportamento semelhante foi observado no tempo de mistura  
 8 ( $t_M$ ).

9 Os coeficientes volumétricos de transferência de massa de oxigênio ( $k_{La}$ ) se  
 10 ordenaram para água (OW) como RAL > RCB > RAL-LF; para CMC 0,25% a ordem  
 11 foi RAL > RCB = RAL-LF; e para e CMC 0,50% a ordem foi RCB > RAL > RAL-LF.  
 12 Quando foram avaliadas as viscosidades dos fluídos, obtivemos que o  $k_{La}$  para RAL-  
 13 LF a ordem era OW ( $\nu = 7 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ ) = CMC 0,25% ( $\nu = 8 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ ) < CMC 0,50% ( $\nu = 10 \times 10^{-6}$   
 14  $\text{m}^2/\text{s}$ ); para RAL era OW = CMC 0,50% < CMC 0,25%; para RCB era OW = CMC 0,25%  
 15 < CMC 0,50%.

**Tabela 1.** Parâmetros hidrodinâmicos e de transferência volumétrica de massa para os três tipos de reator empregados no estudo, para um fluxo de gás de 0.50 vvm ( $0.0005 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$ )

<i>Bulk</i> (Viscosidade)	Reator	$U_G \text{ (m s}^{-1}\text{)}$	$\epsilon_G \text{ (-)}$	$U_L \text{ (m s}^{-1}\text{)}$	$t_M \text{ (s)}$	$k_{La} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
Água ( $7,0 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ )*	RAL-LF	0,414	$0,489 \pm 0,010 \text{ aA}$	$0,171 \pm 0,059 \text{ aA}$	$4,27 \pm 1,13 \text{ bA}$	0,1739
	RAL	0,411	$0,488 \pm 0,009 \text{ aA}$	$0,189 \pm 0,056 \text{ aA}$	$3,79 \pm 0,99 \text{ bA}$	0,2080
	RCB	0,205	$0,481 \pm 0,010 \text{ aA}$	$0,097 \pm 0,040 \text{ bB}$	$7,66 \pm 2,16 \text{ aB}$	0,2024
CMC 0,25% ( $8,0 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ )	RAL-LF	0,414	$0,493 \pm 0,009 \text{ aA}$	$0,164 \pm 0,031 \text{ aA}$	$4,20 \pm 0,75 \text{ bA}$	0,1454
	RAL	0,411	$0,492 \pm 0,011 \text{ aA}$	$0,172 \pm 0,029 \text{ aA}$	$3,97 \pm 0,61 \text{ bA}$	0,1476
	RCB	0,205	$0,491 \pm 0,009 \text{ aA}$	$0,052 \pm 0,025 \text{ bA}$	$15,87 \pm 7,37 \text{ aA}$	0,1235
CMC 0,50% ( $10,0 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ )	RAL-LF	0,414	$0,493 \pm 0,009 \text{ aA}$	$0,146 \pm 0,024 \text{ aA}$	$4,70 \pm 0,84 \text{ bA}$	0,0141
	RAL	0,411	$0,492 \pm 0,010 \text{ aA}$	$0,160 \pm 0,021 \text{ aA}$	$4,26 \pm 0,57 \text{ bA}$	0,2091
	RCB	0,205	$0,491 \pm 0,011 \text{ aA}$	$0,046 \pm 0,021 \text{ bA}$	$18,04 \pm 8,79 \text{ aA}$	0,2235

Letras minúsculas distintas indicam diferenças (Tukey test;  $p < 0,05$ ) entre os diferentes reatores para uma mesma fase líquida. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças (Tukey test;  $p < 0,05$ ) entre fases líquidas em um mesmo reator. \* Viscosidade dos meios líquidos.

16 Depois de constituído, esterilizado e inoculado, o meio M3 apresentava aspecto  
 17 turvo (Figura 4). Contudo, nas primeiras 24 h de incubação (início da fase de formação

- 1 de biofilme), a fase líquida deixava de ser turva e se tornava límpida no RAL-LF (Figura
- 2 5). Nos outros dois sistemas permanecia turva.

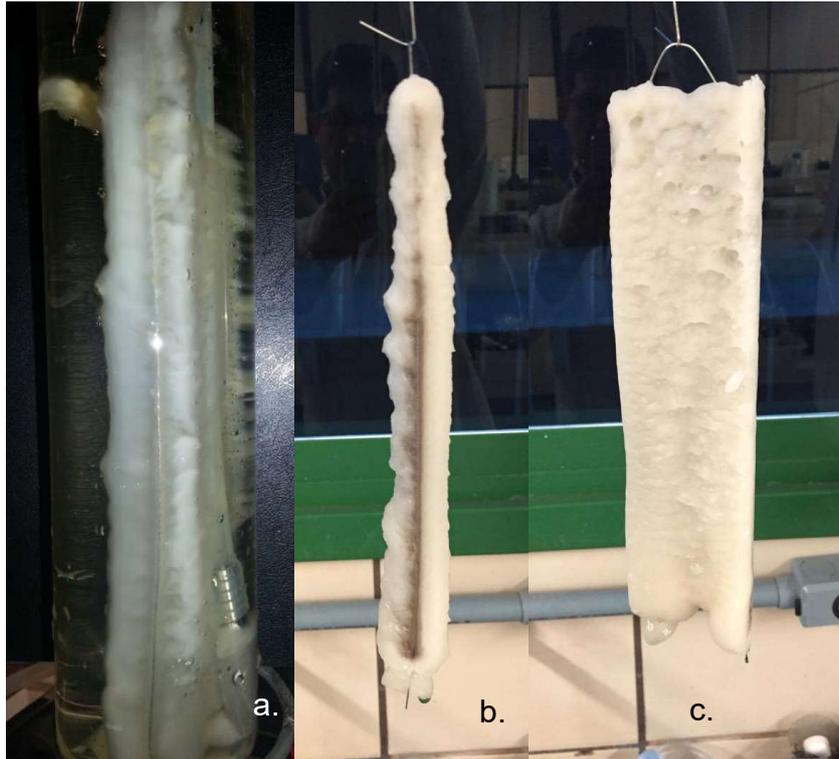


- 3 Figura 4: RAL-LF em funcionamento após inoculação do meio M3. Observar a turvação do mesmo.
- 4 (Fonte: O AUTOR)

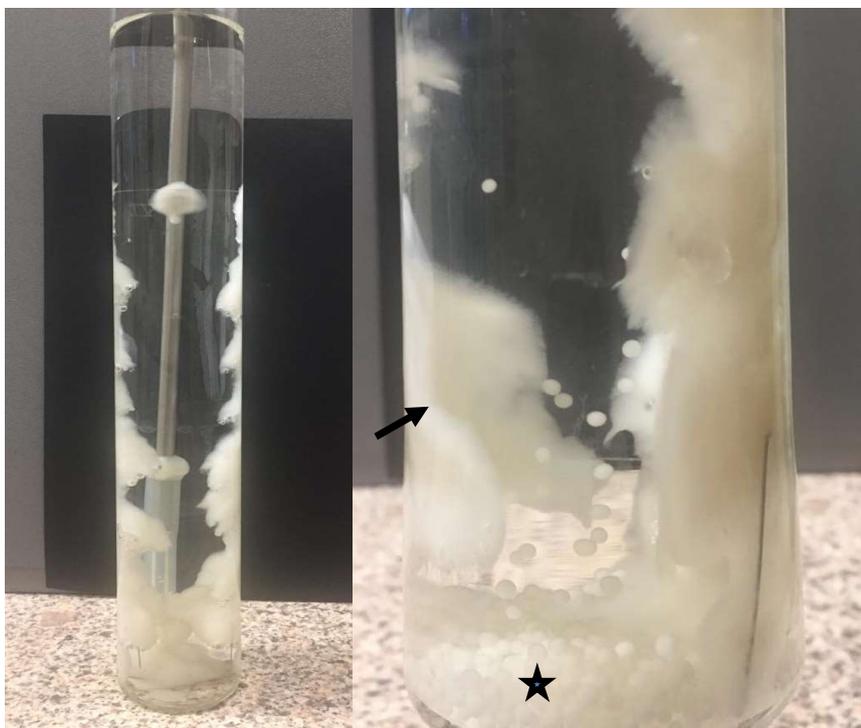


1  
2 Figura 5: RAL-LF após 72h de incubação e 28 °C e aeração de 0,5 vvm. Observar *baffles*  
3 completamente revestido pelo biofilme fúngico e meio límpido. (Fonte: O AUTOR)

4 Sobre os *baffles* dos RAL-LF foi verificada a formação de biofilmes de *C. elegans*  
5 DSM1908. Esses biofilmes possuíam textura macia e com grande retenção de líquido;  
6 nessa condição, os biofilmes permaneciam aderidos, mas eram facilmente removidos  
7 dos *baffles* com auxílio de espátulas (Figura 6). Em pontos de retenção nos RAL  
8 também foi verificada a formação de biofilme (seta - Figura 7); porém, de fácil  
9 destacamento das superfícies e que se depositavam no fundo do vaso do reator,  
10 formando flocs (estrela - Figura 7) passando a não mais circular e receber irrigação  
11 pelo *bulk*. Nos RCB foi observado que as células planctônicas se agrupavam  
12 formando grumos, denominados *flocs*, em concordância com as modernas definições  
13 de Moshynets & Spiers<sup>46</sup>. Parte desses *flocs* se depositava no fundo do reator e parte  
14 permanecia circulante.



1 Figura 6: *Baffles* com biofilme de *C. elegans* DSM 1908. Em a. *baffle* submerso em meio M3 no  
 2 interior do jarro do reator. Em b. vista lateral do *baffle* com biofilme após escorrer excesso do meio  
 3 M3. Em c. vista frontal do *baffle* com biofilme após escorrer excesso de meio M3. (Fonte: O AUTOR)  
 4

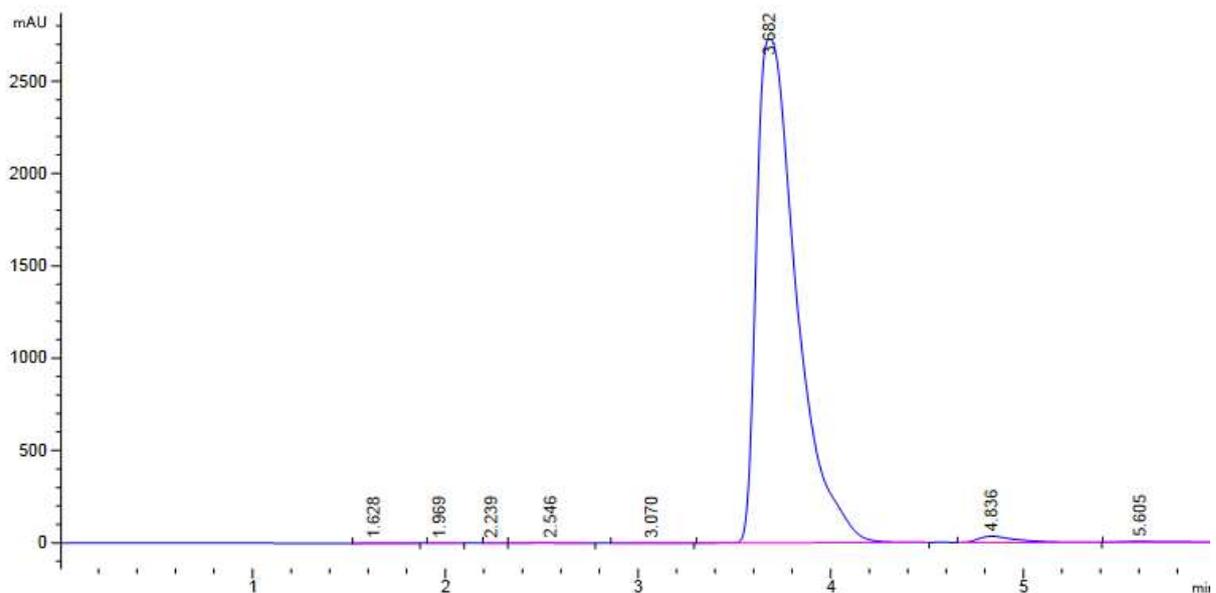


5 Figura 7: Padrão de desenvolvimento de biomassa em RAL. Observar que o biofilme formou-se nas  
 6 bordas do *baffle* (a), além de significativa formação de biomassa planctônica (b), depositada no fundo  
 7 do jarro. Seta: biofilme; Estrela: flocs. (Fonte: O AUTOR)

1 Em termos quantitativos, a obtenção de biomassa seguiu a ordem RAL-LF > RAL  
2 = RCB ao término do período de 72 h (Tabela 2).

3 Considerando as características da fase sólida dos reatores, verificou-se as  
4 viscosidades finais dos caldos M3 após 72 h de crescimento fúngico. Os resultados  
5 foram  $7,0 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ ;  $8,0 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ ; e  $12,0 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ , para RAL-LF, RAL e RCB,  
6 respectivamente. A viscosidade da água utilizada para preparo de todas soluções e  
7 meios de cultura era de  $7,0 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ .

8 A quantificação do produto de biotransformação foi realizada tanto no *bulk*  
9 líquido quanto na matriz do biofilme/*flocs*. Nos frascos controle sem fungo, o  
10 rendimento de extração do DCF chegou a 96% apresentando cromatogramas de pico  
11 único em  $t_r$  3.682 (Figura 8).

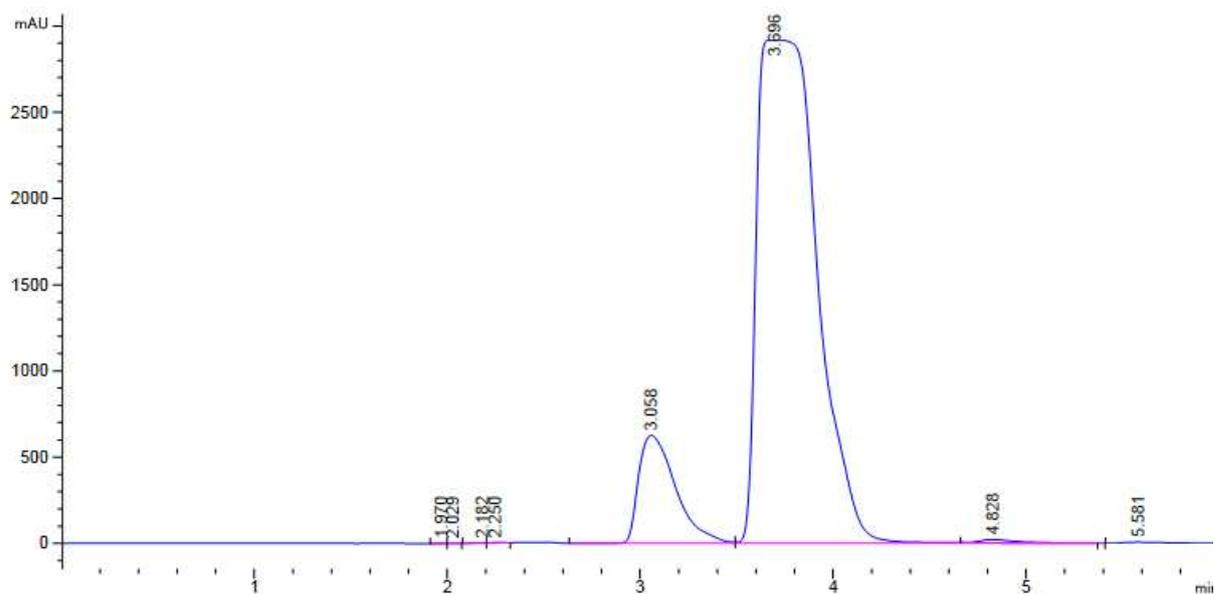


12

13 Figura 8: Cromatograma correspondente ao meio (planctônico) do sistema controle sem fungo com  
14 DCF em RAL-LF. Em 3.682 min temos um pico bem definido correspondente ao DCF não metabolizado.  
15 Tempo de retenção correspondente ao DCF para curva padrão. (Fonte: O AUTOR)

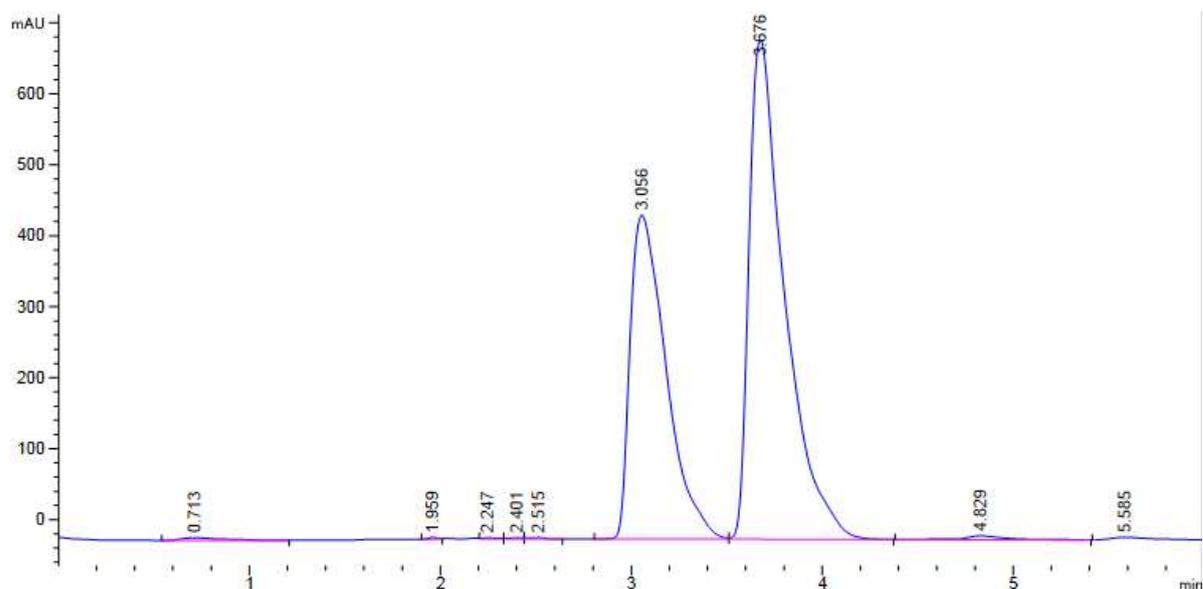
16

17 Na presença de *C. elegans* DSM 1908, tanto nos cromatogramas do *bulk*,  
18 quanto da extração a partir do biofilme, surgiu um pico em  $t_r$  3,058; provavelmente, 4-  
19 OH-DCF (47) (Figuras 9 e 10, respectivamente).



1

2 Figura 9: Cromatograma correspondente ao biofilme do sistema tratamento com DCF em RAL-LF. DCF  
 3 ( $t_r$  3.696 min). Observa-se que em  $t_r$  3.058 min surge outro pico, com valor acima de 500 em  
 4 abundância. Sugerimos que se trata de um possível metabólito do DCF. (Fonte: O AUTOR).



5

6 Figura 10: Cromatograma correspondente à fase líquida do sistema tratamento com DCF em RAL-LF.  
 7 Quando comparado ao biofilme, temos as mesmas moléculas presentes.

8

9 Os resultados dos rendimentos das biotransformações (concentrações de DCF  
 10 e de biotransformado) são apresentados na tabela 2. Tanto no bulk quanto na  
 11 biomassa (biofilme ou *flocs*), foram encontradas maiores concentrações de  
 12 biotransformado em RAL-LF > RAL > RCB.

1 Um outro resultado observado está relacionado à capacidade de biossorção da  
 2 biomassa fúngica. O DCF não biotransformado se acumulou em maiores  
 3 concentrações em RCB > RAL > RAL-LF.

4 **Tabela 2.** Dados sobre biotransformação de DFC em produto por *C. elegans* DSM1908 nos três tipos  
 5 de reatores empregados, para um fluxo de gás de 0.50 vvm ( $0.0005\text{m}^3\text{min}^{-1}$ ) e meio de cultura M3

Fase	[DFC <sub>inalterado</sub> ] ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	[Biotransformado] ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Biomassa (g)	Total de biotransformado(mg) <sup>Δ</sup>	Rendimento (%)
RAL-LF <sub>bulk</sub>	220.85 ± 168.17	148,24 ± 93,13	-	119,18 ± 74,57	29,79 ± 18,64
RAL-LF <sub>biomassa</sub>	677.30 ± 284.40	306,70 ± 126,73	2.74 ± 0.25 *		
RAL <sub>bulk</sub>	350.47 ± 238.16	86,67 ± 36,94	-	69,51 ± 29,49	17,38 ± 7,37
RAL <sub>biomassa</sub>	851.04 ± 199.49	168,01 ± 40,30	1.44 ± 0.44 **		
RCB <sub>bulk</sub>	308.89 ± 101.84	61,48 ± 11,51	-	51,76 ± 6,84	12,94 ± 1,71
RCB <sub>biomassa</sub>	959.61 ± 234.52	68,45 ± 57,63	1.97 ± 0.33 **		

6 \* Indica diferença (test t student;  $p < 0,05$ ); \*\* não há diferença significativa. <sup>Δ</sup> Total calculado de biotransformado por batelada.

#### 1 4. DISCUSSÃO

2 Um sistema híbrido trifásico de RAL-LF pode apresentar algumas vantagens  
3 como (a) favorecimento da obtenção de biomassa fúngica pela maior transferência de  
4 massa (nutrientes e oxigênio) e pelo baixo *shear stress*; (b) elevação da taxa de  
5 biotransformação pelo incremento da biomassa, da atividade metabólica e da maior  
6 transferência de massa (oxigênio); (c) baixo custo relativo do processo *upstream*  
7 (produção) na implantação, operação e manutenção; (d) facilitação de processos  
8 *downstream* (purificação), pois os bioativos são encontrados na fase líquida (*bulk*) ou  
9 concentrados no biofilme e não em células planctônicas que demandam filtração ou  
10 centrifugação. (11, 20)

11 Processos de biotransformação de xenobióticos para produção de bioativos  
12 podem ser conduzidos empregando microrganismos. Foi preconizado que biofilmes  
13 de *Cunninghamella* ssp. são bons bioconversores (19). No entanto, os estudos (3, 19,  
14 48) se limitaram a prospecção de atividade empregando frascos cônicos com ou sem  
15 suporte (mola metálica) para formação semi-submersa de biofilme. Parâmetros  
16 hidrodinâmicos e de transferência de massa, no entanto, não foram contemplados, o  
17 que dificulta qualquer intenção de avaliação de escalabilidade para plantas industriais.  
18 Nossa proposta de aplicação de um reator híbrido apresenta considerável avanço,  
19 posto que se torna praticável a verificação e padronização de tais parâmetros.

20 Existe uma busca por maiores rendimentos nos processos de biotransformação  
21 garantindo viabilidade econômica e obtenção de novas moléculas para aplicações e  
22 para produção. Quinn *et al.*<sup>3</sup> obtiveram, em processo de bateladas intermitentes com  
23 frascos agitados e biofilme de *C. elegans* sobre mola metálica, um rendimento de 57  
24 mg.L<sup>-1</sup> para 4'-OH-DCF, em um período de 12 dias, equivalente a 42,75% de  
25 rendimento. Dragan *et. al.*<sup>32</sup>, utilizando células planctônicas engenheiradas de

1 *Schizosaccaromyces pombe*, após 96 h de incubação, obtiveram um rendimento de  
2 93 mg.L<sup>-1</sup> para 4'-OH-DCF, equivalente a 14,61% do DCF incubado. Osorio-Lozada  
3 *et al.*<sup>49</sup>, utilizando *Actinoplanes* sp. precisaram de 120 h para total conversão usando  
4 reator de cartucho de fibra oca (Hollow fiber Cartridge Reactor). No presente estudo,  
5 considerando o consumo de DCF no sistema e a formação do biotransformado,  
6 podemos inferir um rendimento médio em RAL-LF (0,8 L) após 48 h de  
7 biotransformação de 148 mg.mL<sup>-1</sup>, equivalente a 37% do DCF incubado. O processo  
8 aqui proposto, comparado aos existentes, sem necessitar alterações genéticas nos  
9 microrganismos apresenta resultado compatível.

10 A transposição da escala de bancada para a realidade industrial demanda do  
11 entendimento de variáveis que atuam como gargalos para otimização de  
12 bioprocessos, dada sua complexidade ou a baixa quantidade de informações acerca  
13 de variáveis específicas (50, 51). É comum que bioprocessos não sejam levados à  
14 termo em função de taxas reacionais de transformação e rendimentos de produção  
15 que fiquem abaixo do esperado (50). Segundo Cerri<sup>52</sup> o procedimento para ampliação  
16 de escala baseia-se em, mantendo-se a semelhança geométrica na escala maior, e  
17 selecionando um critério (usualmente  $k_{La}$ ), e a partir dele, encontrar as novas  
18 condições de operação que reproduziriam as condições encontradas em escala  
19 menor. Em termos de escalabilidade, o processo aqui apresentado, ainda que em  
20 etapa laboratorial, se mostra uma tecnologia promissora, pois o modelo de biorreator  
21 proposto (RAL-LF) permite uma avaliação pormenorizada das variáveis escalonáveis;  
22 destarte, superando gargalos de otimização e de transposição de escala em  
23 bioprocessos.

24 Para se determinar a escalabilidade de um processo é necessário compreender  
25 os padrões hidrodinâmicos do sistema para gerar modelos matemáticos de simulação

1 e prever os custos e o rendimento da produção em escala. Definir padrões  
2 hidrodinâmicos com água é o primeiro passo, mas como a mesma se comporta como  
3 um fluido newtoniano (a relação entre a taxa de cisalhamento e a taxa de deformação  
4 é linear e constante) é necessário submeter os sistemas a testes com fluídos não-  
5 newtonianos (relação entre a taxa de cisalhamento e a taxa de deformação não é  
6 constante a uma dada temperatura e pressão) (53), como soluções de CMC, que  
7 mimetizam as condições de um meio de cultura em uma fermentação.

8 Os parâmetros hidrodinâmicos aqui determinados nos permitem prever o ganho  
9 de escala com redução de demanda energética. Em virtude das dimensões do  
10 sistema, a  $U_G$  foi mais elevada que aquela preconizada (54); Benthum<sup>55</sup>, testando RAL  
11 trifásico de coluna de 6 metros de altura e 0,65m de diâmetro trabalhou com  $U_G$  em  
12  $0,04 \text{ m s}^{-1}$  portanto, com o aumento do sistema podemos prever uma demanda de  
13 fluxo de ar cerca de 10 vezes inferior aquela empregada em nossos protótipos ( $0,414$   
14  $\text{m s}^{-1}$ ).

15 Os resultados para a transferência de oxigênio apontaram que com o aumento  
16 da viscosidade, o sistema RCB apresenta os melhores  $k_{La}$ , enquanto o RAL-LF tende  
17 ao pior desempenho. Sabe-se que a difusibilidade de oxigênio diminui com o aumento  
18 da viscosidade, gerando uma rápida redução de  $k_{La}$  (54). No entanto, esse  
19 comportamento no sistema RAL-LF é transitório até a formação do biofilme. Com a  
20 adesão das células no *baffle* há redução da viscosidade do meio ( $\nu = 7,0 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$   
21 igual à viscosidade da água) e a obliteração dos *meshs* da tela (aproximadamente  
22 após 48h de incubação) leva o sistema a comportar-se como RAL, que por sua vez  
23 apresenta bom desempenho quanto ao  $K_{La}$ .

24 Era esperado que RAL-LF e RAL divergissem quanto aos parâmetros  $t_m$ ,  $U_L$  e  
25  $\epsilon_G$ , dada a natureza permeável da tela *mesh* #30 empregada na construção do *baffle*

1 do RAL-LF; contudo, isso não foi verificado. Possivelmente, isso deve à relativa  
2 alta  $U_G$  na qual os reatores operaram,  $0,414 \text{ m s}^{-1}$  (54, 56). O valor de  $U_G$  para RCB  
3 era praticamente metade dos demais e isso pode ter interferido negativamente em  
4 seu desempenho para os parâmetros  $t_M$ ,  $U_L$  e  $k_{La}$ , mas não para  $\epsilon_G$ , uma vez que esse  
5 último é determinado pela localização do aspensor e tamanho médio das bolhas (57,  
6 58).

7 Apesar do RAL-LF possuir *baffle* reticulado que permite uma fragmentação das  
8 bolhas, o que contribui para a maior dissolução do oxigênio no *bulk* (59), sobretudo  
9 quando uma alta velocidade de gás ( $U_G$ ) é empregada (23, 27), o resultado de  $k_{La}$   
10 não correspondeu inicialmente a tal expectativa. Isso pode ter alguma importância nas  
11 primeiras horas da batelada, quando o *baffle* não estava recoberto por biofilme;  
12 porém, após a formação de biofilme ocorria a obliteração da malha e provavelmente  
13 o reator passava a operar como um RAL convencional.

14 A dissolução de oxigênio em RCBs ocorre em função da fricção gerada na  
15 interface das bolhas com o líquido, sobretudo na região anular próxima das paredes  
16 do vaso (61). Como a secção transversa do vaso do RCB tinha o dobro de área do  
17 RLA-LF e do RAL, a dissolução do oxigênio foi menor e os valores de  $k_{La}$  se  
18 mostraram reduzidos em baixas viscosidades. Já com CMC 0,50% ( $\nu = 10,0 \times 10^{-6}$   
19  $\text{m}^2/\text{s}$ ), o efeito de arraste gerado pode prolongar o contato da bolha com o meio, fato  
20 que justificaria a melhora no  $k_{La}$  (53).

21 Características de molhabilidade (62) e da malha de aço inoxidável contribuíram  
22 para a adesão/retenção do fungo no suporte reticulado. Os fragmentos de hifa do  
23 inóculo ficaram retidos mecanicamente na tela e a partir daí se deu a formação do  
24 biofilme (63).

1 Durante o crescimento do biofilme, a tela atuava como ponto de ancoragem, que,  
2 sob condições de baixo *shear stress*, típicas de reatores *airlift* (31), garantia que o  
3 mesmo não se desprendesse facilmente e viesse a dificultar a circulação de nutrientes  
4 e de oxigênio dissolvido.

5 Em termos de produção de biomassa, o RAL-LF apresenta algumas  
6 características vantajosas. Em crescimento planctônico, sua recuperação se dá por  
7 sedimentação e/ou filtração, no entanto, a maior biomassa encontra-se no biofilme,  
8 facilmente recuperável no *baffle*. O RAL-LF permite escoamento do meio sem riscos  
9 de perda significativa de biomassa.

10 Existe um interesse de incremento na obtenção de biomassa de *C. elegans* para  
11 aplicação distinta daquela aqui apresentada (65) (processos de biossorção purificação  
12 de águas residuais de empresas têxteis ou para produção de biofiltros), em termos de  
13 bioprocessos a ser adotado e de redução de tempo de formação de biofilmes e custos  
14 operacionais (35). Nesse aspecto, a inovação aqui apresentada pode contribuir, pois  
15 permite a obtenção de quantidade considerável de biomassa, que é facilmente  
16 recuperável.

17 Neste estudo, a opção pelo emprego de *C. elegans* e de DCF se deu em função  
18 do processo de biotransformação envolvendo ambos ser bem conhecido (3, 19, 29,  
19 47, 66, 67). A utilização de biofilmes desse fungo para biotransformação tendo em  
20 vista a obtenção de novas moléculas terapêuticas não é um fato inédito (19); contudo,  
21 de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou tal potencial em  
22 biorreator, com possibilidade de escalonamento para a realidade industrial.

23 A expressão de diferentes subtipos de enzimas do complexo citocromo P450  
24 oxidase (CYP) faz das *Cunninghamella* spp. ótimos organismos biotransformadores  
25 (29). O 4'-OH-DCF é o principal metabólito ativo do DCF pós biotransformação pela

1 CYP 2C9 e suprime a produção de prostaglandina E2 por bloqueio da atividade da  
2 ciclooxigenase-2, demonstrando propriedade anti-inflamatória. Embora não tenha  
3 sido possível identificar o 4'-OH-DCF, o fato do surgimento de um pico de  
4 biotransformado com menor tempo de retenção ( $t_r$  3,058) caracteriza ganho de  
5 polaridade do DCF que pode ser em virtude de hidroxilação do mesmo (68).

6 Através das análises dos cromatogramas foi possível avaliar a eficiência  
7 biotransformadora dos diferentes reatores. Conforme observado na Tabela 2, o RAL-  
8 LF apresentou maior rendimento de formação de biotransformado ( $29,79 \pm 18,64$  %),  
9 seguido por RAL e RCB ( $17,38 \pm 7,37$  e  $12,94 \pm 1,71$ %, respectivamente). Tal resultado  
10 está relacionado não apenas a proporção de biomassa formada, mas também da  
11 disponibilidade de oxigênio para as células nos diferentes sistemas. Como as células  
12 no RAL-LF se distribuem homogeneamente sobre o *baffle* reticulado, elas recebem  
13 mais oxigênio dissolvido, que otimiza a biotransformação.

14 Outra característica positiva advinda da imobilização de células envolve a não  
15 necessidade de manipulação genética de cepas (32), e de centrifugações para  
16 separação de biomassa e *bulk*, uma vez que os metabólitos/biotransformado tendem  
17 a se difundir para o sobrenadante (3).

18 Merece destaque o fato de que o RCB, apesar de ser o sistema com a menor  
19 capacidade biotransformadora, é aquele que apresenta maior capacidade  
20 bioSORPTIVA. No RCB, as células formavam *flocs* esféricos que, desde o início de sua  
21 formação circulavam juntamente das moléculas de interesse. Isso pode permitir a  
22 captura das moléculas, que ficaram internalizadas na matriz dos *flocs*. Como o RCB  
23 não tem a mesma capacidade de transferência de oxigênio que os reatores, houve  
24 maior retenção de DCF não convertido. Embora o RCB não seja o mais indicado para

1 processos de biotransformação, parece ser um recurso útil para remoção de  
2 moléculas em sistemas hídricos (35, 65).

3 Embora aqui somente se tenha utilizado uma cepa de uma única espécie, é  
4 provável que outras espécies fúngicas apresentem características semelhantes e  
5 bioprocessos envolvendo biofilmes possam ser beneficiados por esse recurso.

## 1 **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2           Em suma, o reator híbrido *airlift*-leito fixo aqui proposto apresentou melhor  
3 desempenho hidrodinâmico, de transferência de massa e de obtenção de biomassa,  
4 permite operar um sistema trifásico no qual reações de biotransformação fúngica  
5 podem ocorrer, com possibilidade de se escalar para a realidade do setor produtivo.

## 1 6. REFERÊNCIAS

- 2 1. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. Microbiologia de  
3 Brock. 14ed. Artmed Editora:Porto Alegre. 2016.
- 4 2. Pervaiz I, Ahmad S, Madni MA, Ahmad H, Khaliq FH. Microbial  
5 biotransformation: a tool for drug designing. Applied biochemistry and  
6 microbiology. 2013; 49(5); 437-450.
- 7 3. Quinn L, Dempsey R, Casey E, Kane A, Murphy CD. Production of drug  
8 metabolites by immobilised *Cunninghamella elegans*: from screening to scale  
9 up. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2015; 42(5); 799-806.
- 10 4. Piska K, Żelaszczyk D, Jamrozik M, Pekala E. *Cunninghamella*  
11 Biotransformation-Similarities to Human Drug Metabolism and Its Relevance for  
12 the Drug Discovery Process. Current drug metabolism. 2016; 17(2); 107-117.
- 13 5. Fura A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and  
14 development. Drug discovery today. 2006; 11(3); 133-142.
- 15 6. Črešnar B, Petrič Š. Cytochrome P450 enzymes in the fungal  
16 kingdom. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. 2011;  
17 1814(1); 29-35.
- 18 7. Bianchini LF, Arruda MF, Vieira SR, Campelo P, Grégio AM, Rosa EA. Microbial  
19 biotransformation to obtain new antifungals. Frontiers in microbiology. 2015;  
20 6(1433); 1-12.
- 21 8. Carballeira JD, Quezada MA, Hoyos P, Simeó Y, Hernaiz MJ, Alcantara AR,  
22 Sinisterra JV. Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox  
23 reactions. Biotechnology advances. 2009; 27(6); 686-714.
- 24 9. Borges KB, de Souza Borges W, Durán-Patrón R, Pupo MT, Bonato PS,  
25 Collado IG. Stereoselective biotransformations using fungi as  
26 biocatalysts. Tetrahedron: Asymmetry. 2009; 20(4); 385-397.
- 27 10. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant  
28 microorganisms. Clinical microbiology reviews. 2002; 15(2); 167-193.
- 29 11. Cheng K, Demirci A, Catchmark JM. Advances in biofilm reactors for production  
30 of value-added products. Applied microbiology and biotechnology. 2010; 87(2);  
31 445-456.
- 32 12. Boari CA, Alves MP, Tebaldi VMR, Savian TV, Piccoli RH. Formação de biofilme  
33 em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando  
34 leite e diferentes condições de cultivo. Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
35 2009; 29(4); 886-895.
- 36 13. Harding MW, Marques LLR, Howard RJ, Olson ME. Can filamentous fungi form  
37 biofilms? Trends in microbiology. 2009; 17(11); 475-480.

- 1 14. Michalak I, Chojnacka K, Witek-Krowiak A. State of the art for the biosorption  
2 process—a review. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2013; 170(6);  
3 1389-1416.
- 4 15. Fomina M, Gadd GM. Biosorption: current perspectives on concept, definition  
5 and application. *Bioresource technology*. 2014; 160; 3-14.
- 6 16. Huang HH, Lin LH, Zhang P, Qui XL, Zhong DF. Formation of glucoside  
7 conjugate of acetaminophen by fungi separated from soil. *European journal of*  
8 *drug metabolism and pharmacokinetics*. 2006; 31(2); 103-108.
- 9 17. Bernat P, Długoński J. Acceleration of tributyltin chloride (TBT) degradation in  
10 liquid cultures of the filamentous fungus *Cunninghamella*  
11 *elegans*. *Chemosphere*. 2006; 62(1); 3-8.
- 12 18. Schmitz G, Franke D, Stevens S, Takors R, Weuster-Botz D, Wandrey C.  
13 Regioselective oxidation of terfenadine with *Cunninghamella*  
14 *blakesleeana*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000; 10(1); 313-  
15 324.
- 16 19. Amadio J, Casey E, Murphy CD. Filamentous fungal biofilm for production of  
17 human drug metabolites. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013;  
18 97(13); 5955-5963.
- 19 20. Qureshi N, Annous BA, Ezeji TC, Karcher P, Maddox IS. Biofilm reactors for  
20 industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction  
21 rates. *Microbial cell factories*. 2005; 4(1); 24-45.
- 22 21. Jesus SS, Neto JM, Maciel Filho R. Hydrodynamics and mass transfer in bubble  
23 column, conventional air-lift, stirred air-lift and stirred tank bioreactors, using  
24 viscous fluid: A comparative study. *Biochemical engineering journal*. 2017; 118;  
25 70-81.
- 26 22. Lestinsky P, Vayrynen P, Vecer M, Wichterle k. Hydrodynamics of airlift reactor  
27 with internal circulation loop: experiment vs. CFD simulation. *Procedia*  
28 *Engineering*. 2012; 42; 892-907.
- 29 23. Chisti MY, Moo-Young M. Airlift reactors: characteristics, applications and  
30 design considerations. *Chemical Engineering Communications*. 1987; 60; 195-  
31 242.
- 32 24. Chisti Y. Pneumatically agitated bioreactors in industrial and environmental  
33 bioprocessing: hydrodynamics, hydraulics, and transport phenomena. *Applied*  
34 *Mechanics Reviews*. 1998; 51(1); 33-112.
- 35 25. Nicoletta C, van Loosdrecht MCM, van der Lans RGJM, Heijnen JJ.  
36 Hydrodynamic characteristics and gas-liquid mass transfer in a biofilm air-lift  
37 suspension reactor. *Biotechnology and bioengineering*. 1998; 60(5); 627-635.
- 38 26. Mirón AS, Camacho FG, Gomez AC, Grima EM, Chisti Y. Bubble-column and  
39 airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE Journal*. 2000; 46(9), 1872-1887.

- 1 27. Rosa EA, Bianchini LF, Ramos RCS, Arantes AB, da Silva RF, Glassey J.  
2 Hydrodynamics of split-rectangle-internal loop airlift bioreactor with variations in  
3 riser and downcomer cross-sectional areas based on the golden ratio. *Journal of*  
4 *Chemical Technology & Biotechnology*. 2019; 94(4); 1323-1329.
- 5 28. Karande R, Halan B, Schmid A, Buehler K. Segmented flow is controlling growth  
6 of catalytic biofilms in continuous multiphase microreactors. *Biotechnology and*  
7 *bioengineering*. 2014; 111(9); 1831-1840.
- 8 29. Asha S, Vidyavathi M. *Cunninghamella* – a microbial model for drug metabolism  
9 studies – a review. *Biotechnol Adv*. 2009; 27(1); 16-29.
- 10 30. Zhang Y, Geißen S, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: removal in  
11 wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*.  
12 2008; 73(8); 1151-1161.
- 13 31. Keum YS, Lee YH, Kim J. Metabolism of methoxychlor by *Cunninghamella*  
14 *elegans* ATCC36112. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009; 57(17);  
15 7931-7937.
- 16 32. Drăgan C, Peters FT, Bour P, Schwaninger AE, Schaan SM, Neunzig I, Widjaja  
17 M, Zapp J, Kraemer T, Maurer HH, Bureik M. Convenient gram-scale metabolite  
18 synthesis by engineered fission yeast strains expressing functional human P450  
19 systems. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2011; 163(8); 965-980.
- 20 33. Kavitha K, Vidyavathi M, Asha A, Bindu TVLH. Microbial metabolism and  
21 inhibition studies of phenobarbital. *Tropical journal of pharmaceutical research*.  
22 2012; 11(1); 62-68.
- 23 34. Mitra S, Pramanik A, Banerjee S, Haldar S, Gachhui R, Mukherjee J. Enhanced  
24 biotransformation of fluoranthene by intertidally derived *Cunninghamella*  
25 *elegans* under biofilm-based and niche-mimicking conditions. *Appl. Environ.*  
26 *Microbiol*. 2013; 79(24), 7922-7930.
- 27 35. Prigione V, Zerlottin M, Refosco D, Tigini V, Anastasi A, Varese GC. Chromium  
28 removal from a real tanning effluent by autochthonous and allochthonous  
29 fungi. *Bioresource Technology*. 2009; 100(11), 2770-2776.
- 30 36. Prigione V, Grosso I, Tigini V, Anastasi A, Varese G. Fungal waste-biomasses  
31 as potential low-cost biosorbents for decolorization of textile  
32 wastewaters. *Water*. 2012; 4(4), 770-784.
- 33 37. Tigini V, Prigione V, Donelli I, Anastasi A, Freddi G, Giansanti P, Mangiavillano  
34 A, Varese GC. *Cunninghamella elegans* biomass optimisation for textile  
35 wastewater biosorption treatment: an analytical and ecotoxicological  
36 approach. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011; 90(1); 343-352.
- 37 38. Kulakovskaya T. Inorganic polyphosphates and heavy metal resistance in  
38 microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018; 34(9);  
39 139.

- 1 39. Tigini V, Prigione V, Giansanti P, Mangiavillano A, Pannocchia A, Varese GC.  
2 Fungal biosorption, an innovative treatment for the decolourisation and  
3 detoxification of textile effluents. *Water*. 2010; 2(3), 550-565.
- 4 40. Tigini V, Prigione V, Donelli I, Freddi G, Varese GC. Influence of culture medium  
5 on fungal biomass composition and biosorption effectiveness. *Current*  
6 *microbiology*. 2012; 64(1); 50-59.
- 7 41. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *As Bases Farmacológicas da*  
8 *Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12 ed. AMGH Editora, 2012.
- 9 42. Jewell KS, Falås P, Wick A, Joss A, Ternes TA. Transformation of diclofenac in  
10 hybrid biofilm-activated sludge processes. *Water research*. 2016; 105; 559-  
11 567.
- 12 43. Emami J, Ghassami N, Talari R. A rapid and sensitive modified HPLC method  
13 for determination of diclofenac in human plasma and its application in  
14 pharmacokinetic studies. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;  
15 15(3); 132-138.
- 16 44. Japanese Pharmacopeia, XVII ed.; 2016, disponível em  
17 <http://jpdb.nihs.go.jp/jp17e/>, acessada em fevereiro 2017.
- 18 45. Bordin K, Saladino F, Fernández-Blanco C, Ruiz MJ, Mañes J, Fernández-  
19 Franzón M, Meca G, Luciano FB. Reaction of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol  
20 with allyl isothiocyanate, characterization of reaction products, their  
21 bioaccessibility and bioavailability in vitro. *Food chemistry*. 217; 217; 648-654.
- 22 46. Moshynets OV, Spiers AJ. Viewing biofilms within the larger context of bacterial  
23 aggregations. In: Dhanasekaran D, Thajuddin N (eds). *Microbial biofilms.*  
24 *Importance and applications*. Rijeka: InTech Publishers. 2016; 3–22.
- 25 47. Kang S, Kang SY, Lee EJ, Lim YH, Liu KH, Hur HG. 4'-Hydroxydiclofenac is the  
26 major metabolite of diclofenac by *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 and  
27 *Mucor ramannianus* R-56. 8<sup>th</sup> International ISSX Meeting. ISSX Online  
28 Abstracts. 2007; Suppl 2(1).
- 29 48. Watanabe S, Kuzhiumparambil U, Winiarski Z, Fu S. Biotransformation of  
30 synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-073 and AM2201 by *Cunninghamella*  
31 *elegans*. *Forensic science international*. 2016; 261; 33-42.
- 32 49. Osorio-Lozada A, Surapaneni S, Skiles GL, Subramanian R. Biosynthesis of  
33 drug metabolites using microbes in hollow fiber cartridge reactors: case study  
34 of diclofenac metabolism by *Actinoplanes* species. *Drug Metab Dispos*. 2008;  
35 36; 234–240.
- 36 50. Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotechnologia industrial - Vol.2.*  
37 São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.

- 1 51. Micheletti M, Lye GJ. Microscale bioprocess optimisation. *Current Opinion in*  
2 *Biotechnology*. 2006; 17(6); 611-618.
- 3 52. Cerri MO. Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift  
4 de circulação interna geometricamente semelhantes. Tese (Doutorado em  
5 Engenharia Química) São Carlos: USP, 2009.
- 6 53. Melo FRG. Fluidodinâmica de esferas leves e bolhas em líquidos. Tese  
7 (Doutorado em Engenharias). Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia;  
8 2007.
- 9 54. Kilonzo PM, Margaritis A. The effects of non-Newtonian fermentation broth  
10 viscosity and small bubble segregation on oxygen mass transfer in gas-lift  
11 bioreactors: a critical review. *Biochemical Engineering Journal*. 2004; 17(1); 27-  
12 40.
- 13 55. van Benthum WAJ, van der Lans RGJM, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ.  
14 Bubble recirculation regimes in an internal-loop airlift reactor. *Chemical*  
15 *Engineering Science*. 1999; 54(18), 3995-4006.
- 16 56. Wu WT, Wu JY. Airlift reactor with net draught tube. *J Ferment Bioeng*. 1990;  
17 5; 359–361.
- 18 57. Gouveia ER, Hokka CO, Badino AC. The effects of geometry and operational  
19 conditions on gas hold up, liquid circulation and mass transfer in an airlift  
20 reactor. *Braz J Chem Eng*. 2003; 20:363-374.
- 21 58. Hadavand L, Fadavi A. Effect of vibrating sparger on mass transfer, gas holdup,  
22 and bubble size in a bubble column reactor. *Int J Chem React Eng*. 2013; 11(1);  
23 47-56.
- 24 59. Fu CC, Wu WT, Lu SY. Performance of airlift bioreactors with net draft tube.  
25 *Enzyme Microbiol Tech*. 2003; 33(4); 332–342.
- 26 60. Znad H, Ohata H, Tade MO. A net draft tube slurry airlift bioreactor for 2,4-D  
27 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) pesticide biodegradation. *Can J Chem Eng*.  
28 2010; 88; 565-573.
- 29 61. Camacho Rubio F, Garcia JL, Molina E, Chisti Y. Steady state axial profiles of  
30 dissolved oxygen in tall bubble column bioreactors. *Chem Eng Sci*. 1999; 54;  
31 1711-1723.
- 32 62. Bernardes PC, de Andrade NJ, Ferreira SO, de Sá JP, Araújo EA, Delatorre  
33 DM, Luiz LM. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel  
34 adhered by an isolate of *Bacillus cereus* from a dairy plant. *Braz J Microbiol*.  
35 2010;41(4); 984-92.
- 36 63. Pakula R, Freeman A. A new continuous biofilm bioreactor for immobilized oil-  
37 degrading filamentous fungi. *Biotechnol Bioeng*. 1996;49(1); 20-5.

- 1 64. Rossi M, Nascimento F, Giachini A, Oliveira V, Furigo Jr A. Airlift bioreactor  
2 fluid-dynamic characterization for the cultivation of shear stress sensitive  
3 microorganisms. *J Adv Biotechnol.* 2016; 5(2); 639-651.
- 4 65. Prigione V, Varese GC, Casieri L, Voyron S, Bertolotto A, Marchisio VF.  
5 Inventores: Use of *Cunninghamella elegans* lender in methods for treating  
6 industrial wastewaters containing dyes. U.S. Patent No. 7,790,031. 7. Set.  
7 2010.
- 8 66. Domaradzka D, Guzik U, Wojcieszynska D. Biodegradation and  
9 biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Rev*  
10 *Environ Sci Biotechnol.* 2015; 14; 229–239.
- 11 67. Ibrahim ARS, El-Ferally FS, Al-Said MS. Microbiological transformation of  
12 diclofenac. *Saudi Pharm J.* 1996; 4(3):165-169.
- 13 68. Sawchuk RJ, Maloney JA, Cartier LL, Rackley RJ, Chan KK, Lau HS. Analysis  
14 of diclofenac and four of its metabolites in human urine by  
15 HPLC. *Pharmaceutical research.* 1995; 12(5), 756-762.

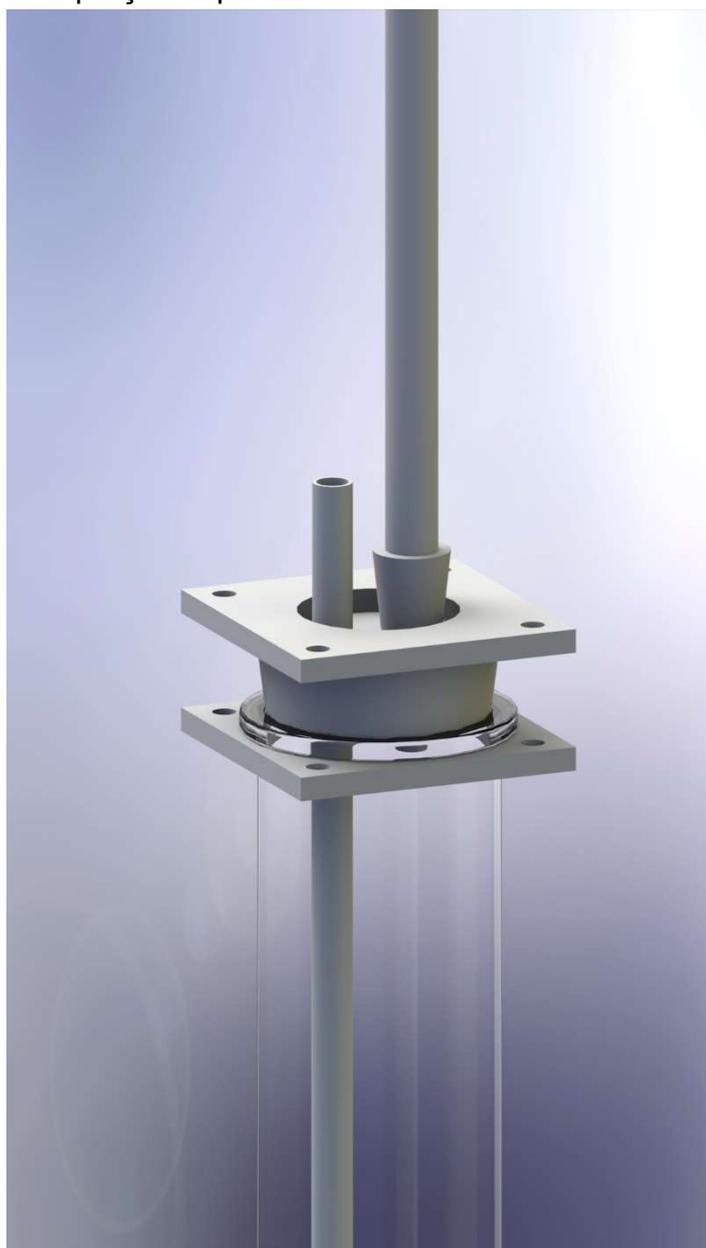
1 ANEXOS

2 ANEXO 1: RAL montado com seus componentes principais.



3 Na imagem acima temos em paralelo ao sistema o distribuidor de ar, que no  
4 modelo apresentado e utilizado, permite o funcionamento de 10 RAL ao mesmo  
5 tempo.

1 ANEXO 2: Detalhe da porção superior do RAL.



2 Para garantir adequada vedação, foram desenvolvidas presilhas de nylon com  
3 parafusos de inox AISI 304. A tubulação de inox para aeração não está conectada na  
4 ilustração ao compressor de ar.

5 A longa chaminé foi assim desenvolvida em virtude da formação de bolhas  
6 durante o processo de aeração. Em sistemas previamente testados com chaminés  
7 mais curtas ocorreu acúmulo de meio na seringa no topo da chaminé utilizada como  
8 respiro.

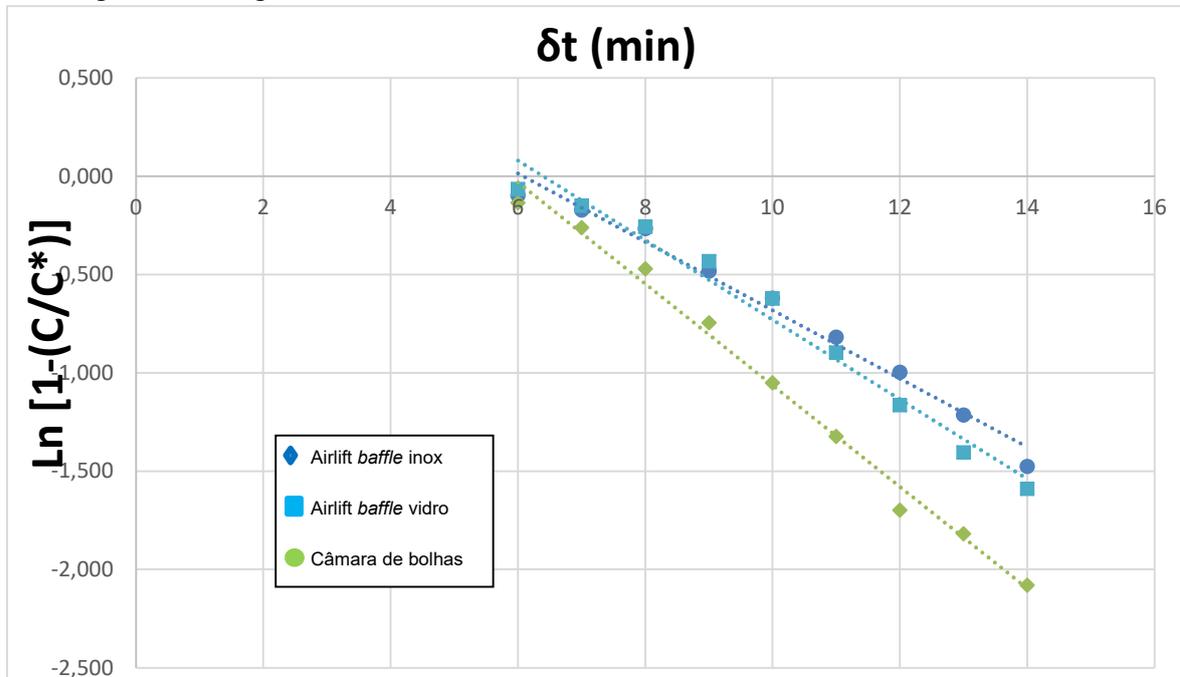
- 1 ANEXO 3: Detalhe do fundo do jarro com o *baffle* e sistema de aeração com
- 2 aspersor.



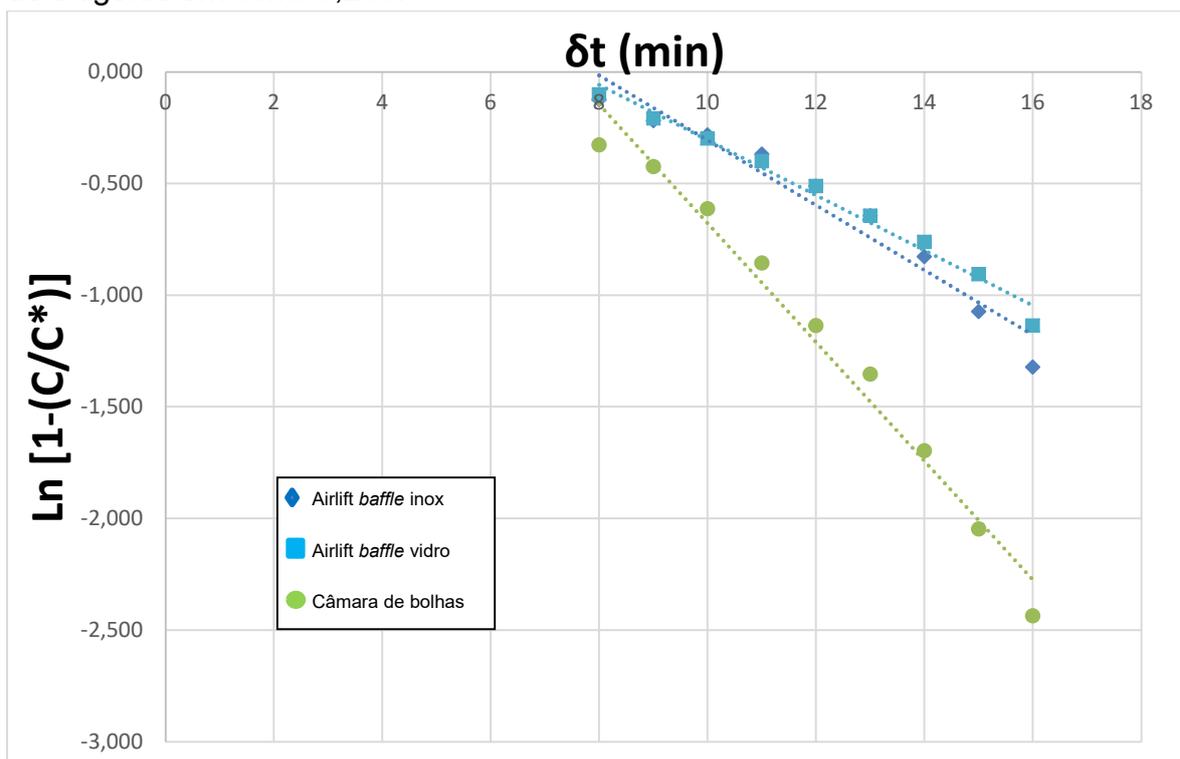
- 3 Na imagem acima é possível observar que o *baffle* divide o fundo do jarro em
- 4 duas regiões. O lado em que se encontra a tubulação de aeração com o aspersor
- 5 corresponde ao *riser*. A liberação das bolhas de ar geram movimentação do meio de
- 6 cultura, que retorna ao fundo do vaso pelo outro lado (*downcomer*). Com o
- 7 preenchimento de líquido, na porção superior do jarro permanece uma área livre sem
- 8 meio, o *headspace*.

1 ANEXO 4: Gráficos utilizados para determinação do  $k_L a$ .

2 Gráfico 1: Parâmetros para determinação do coeficiente de transferência volumétrico  
3 de oxigênio em água osmosificada



4 Gráfico 2: Parâmetros para determinação do coeficiente de transferência volumétrico  
5 de oxigênio em CMC 0,25%



- 1 Gráfico 3: Parâmetros para determinação do coeficiente de transferência volumétrico de oxigênio CMC 0,5%
- 2

