



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia**

**MATHEUS MALARDO BROSSI PELISSARI**

**Avaliação do processo de filtração tangencial para clarificação de caldo de cultivo de *Escherichia coli*, para produção de celulases, utilizando flocculantes**

**Araraquara, SP  
2021**

**MATHEUS MALARDO BROSSI PELISSARI**

**Avaliação do processo de filtração tangencial para clarificação de caldo de cultivo de *Escherichia coli*, para produção de celulases, utilizando flocculantes**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Alvaro Baptista Neto

**Araraquara, SP**

**2021**

---

**P384a** Pelissari, Matheus Malardo Brossi.  
Avaliação do processo de filtração tangencial para clarificação de caldo de cultivo de *Escherichia coli*, para produção de celulases, utilizando flocculantes / Matheus Malardo Brossi Pelissari. – Araraquara: [S.n.], 2021.  
46 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Alvaro Baptista Neto.

1. Microfiltração. 2. Filtração tangencial. 3. Celulases. 4. Runge-Kutta. I. Baptista Neto, Alvaro, orient. II. Título.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu orientador, Alvaro, pelo tempo dedicado para a minha formação e desenvolvimento deste trabalho. Sem a sua paciência e ensinamentos este trabalho não teria sido realizado.

Agradeço também aos técnicos do departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Mateus, Ana, Flávio e Adriana, pelo suporte ao longo do desenvolvimento de meu TCC.

Gostaria de agradecer aos meus amigos e companheiros de graduação e de vida Ana Carolina, Nicolas, Pedro, Lucas, Gabriel, Júlia, Victor Sanches, Victor Hugo e, especialmente, ao Vinícius. Sem vocês não conseguiria chegar até aqui.

À República Diretoria, por estar ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, e por ser minha eterna morada.

Agradeço a empresa Risework por ceder os floculantes utilizados para os experimentos. Por fim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que se dedicam à ciência no Brasil e que lutam todos os dias para combater o negacionismo.

## Resumo

A microfiltração de células de *E. coli* e celulases, na presença de dois flocculantes foi avaliada através de simulações utilizando o método de Runge-Kutta de 4ª Ordem para modelar o processo de filtração tangencial e estimar a energia gasta no mesmo e na bomba de recirculação. Os flocculantes adicionados ao caldo de cultivo são polímeros catiônicos, com estrutura não elucidada neste trabalho. A estabilidade enzimática na presença destes polímeros foi avaliada, porém a produção de celulases foi abaixo do esperado, não sendo possível analisar os resultados de forma confiável. Utilizando como referência o experimento sem o uso de flocculantes, foi possível observar uma diminuição de energia de 4,67%, para a menor pressão experimental (24400 Pa), no processo de filtração, apesar do tempo de processo ser maior. Para as simulações de gasto energético pela bomba de recirculação, os experimentos sem o uso de flocculantes apresentaram uma diminuição de 22% no consumo energético com o aumento da pressão, enquanto que, ao usar estes polímeros, houve um aumento de 1,48 (flocculante 17WATIPS610) e 6,27 (17WATIPS611) vezes no consumo de energia, utilizando como referência o processo sem flocculantes e na menor pressão.

**Palavras-chave:** Microfiltração. Filtração tangencial. Celulases. Runge-Kutta.

## **Abstract**

The microfiltration of *E. coli* cells and cellulases, in the presence of two flocculants, was evaluated through simulations using the 4th Order Runge-Kutta method to model the tangential filtration process and estimate the energy spent on it and on the recirculation pump. The flocculants added to the culture broth are cationic polymers, with a structure not elucidated in this work. The enzymatic stability in the presence of these polymers was evaluated, but the production of cellulases was lower than expected, making it impossible to reliably analyze the results. Using as a reference the experiment without the use of flocculants, it was possible to observe an energy decrease of 4,67%, for the lowest experimental pressure (24400 Pa), in the filtration process, despite the process time being longer. For the simulations of energy expenditure by the recirculation pump, the experiments without the use of flocculants showed a 22% decrease in energy consumption with increasing pressure, while when using these polymers, there was an increase of 1,48 (flocculant 17WATIPS610) and 6,27 (17WATIPS611) times in energy consumption, using as a reference the process without flocculants and at the lowest pressure.

**Keywords:** Microfiltration. Tangential Flow Filtration. Cellulases. Runge-Kutta.

## Lista de figuras

Figura 1: Esquema do funcionamento para um processo de filtração (a) convencional e (b) tangencial (adaptado de HARRISON, 2015).....	20
Figura 2: Esquematização da formação de camada e fluxo de permeado ao longo do tempo para um processo de filtração (a) convencional e (b) tangencial (adaptado de HARRISON, 2015).....	21
Figura 3: Comparação entre os resultados obtidos com o método de Runge-Kutta de 4ª Ordem e software MatLab.....	32
Figura 4: Resultados das simulações em função do tempo para os experimentos sem (padrão) e com (610, 611) floculantes.....	33
Figura 5: Resultados experimentais para a filtração com o uso do floculante 610 e o experimento sem floculantes (adaptado de GONÇALVES, 2021).....	34
Figura 6: Energia necessária para filtrar o volume de controle sob diferentes pressões.....	36
Figura 7: Relação da porcentagem de energia economizada (em relação ao padrão) para cada valor de pressão.....	37
Figura 8: Tempo de processo para as diferentes pressões de simulação.....	38
Figura 9: Relação da porcentagem do tempo de processo (em relação ao padrão) para cada valor de pressão.....	38
Figura 10: Relação entre a pressão e a energia requerida pela bomba de recirculação para o caldo de cultivo sem floculantes.....	40

## Lista de tabelas

Tabela 1: Classes de enzimas e reações em que elas podem atuar (ROBINSON, 2015).....	11
Tabela 2: Atividade enzimática na presença dos flocculantes ao longo do tempo.....	31
Tabela 3: Parâmetros experimentais para o cálculo da vazão de permeado em um sistema de filtração tangencial.....	32
Tabela 4: Energia necessária para a filtração do volume de controle para o experimento sem flocculantes.....	35
Tabela 5: Energia necessária para a filtração do volume de controle para o experimento com o flocculante 610.....	35
Tabela 6: Energia necessária para a filtração do volume de controle para o experimento com o flocculante 611.....	36
Tabela 7: Energia requerida pela bomba de recirculação para o caldo de cultivo sem flocculantes.....	39
Tabela 8: Energia requerida pela bomba de recirculação para o caldo de cultivo com o flocculante 610.....	41
Tabela 9: Energia requerida pela bomba de recirculação para o caldo de cultivo com o flocculante 611.....	41



## **Sumário:**

<b>Agradecimentos</b>	<b>2</b>
<b>Resumo</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>5</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>6</b>
<b>Introdução</b>	<b>8</b>
<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>10</b>
Utilização de enzimas industriais	10
Indústria de alimentos	12
Indústria de detergentes	13
Indústria de papel e celulose	14
Produção de celulase	15
Processos de separação e purificação	16
Processos de filtração	18
Filtração tangencial	20
Floculantes	24
<b>Objetivos</b>	<b>25</b>
<b>Materiais e métodos</b>	<b>25</b>
Transformação das células	25
Produção do caldo de cultivo	26
Determinação da atividade enzimática	26
Estabilidade enzimática na presença de floculantes	27
Processo de filtração	27
Determinação do fluxo teórico de permeado	27
Determinação dos parâmetros energéticos do processo de filtração	29
<b>Resultados e discussões</b>	<b>30</b>
Estabilidade enzimática na presença de floculantes	30
Determinação do fluxo teórico de permeado	31
Determinação dos parâmetros energéticos do processo de filtração	35
<b>Conclusão</b>	<b>42</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>43</b>

## 1. Introdução

O uso de enzimas em processos industriais tem aumentado grandemente nos últimos anos. Além da preocupação crescente sobre os impactos ambientais do uso de reagentes químicos, o uso de enzimas mostra-se uma alternativa economicamente viável, já que é passível de trabalho em condições mais brandas de temperatura e pressão, maior especificidade, reduzida produção de substâncias indesejadas e a possibilidade de recuperação ao final do processo (CABRAL et al, 2003).

A celulose é um polissacarídeo natural que é encontrado principalmente na parede celular de plantas. Constituído por monômeros de glicose ligados entre si, podendo atingir uma cadeia de até 25000 resíduos de glicose (SADHU, 2013). A biomassa de plantas é uma rica fonte de celulose e explorada economicamente, tanto como matéria prima ou fonte de carbono para outros processos químicos (JUTURU, 2014).

Além do uso de substâncias químicas, uma das formas mais usadas para degradar a celulose em cadeias menores de glicose é através do uso de celulasas. A endocelulase (EC 3.2.1.4) é caracterizada por hidrolisar randomicamente as ligações glicosídicas da molécula de celulose, diminuindo a viscosidade do meio em que se encontra (WILSON, 2011). Por sua rápida hidrólise, esta enzima é utilizada em diversas indústrias, como na de bebidas para extração e clarificação de sucos de frutas, na de ração animal para desnaturação de grãos e na de papel para branqueamento da polpa de madeira (JUTURU, 2014).

Um dos processos mais eficientes de produção de endocelulasas é através da expressão em bactérias. A bactéria *Escherichia coli* é um dos chassis de expressão heteróloga mais utilizados atualmente por possuir rápido crescimento em meios de cultura industrialmente fáceis de serem produzidos, ser modificada geneticamente sem técnicas dispendiosas e por ter o genoma amplamente conhecido (JUTURU, 2012).

As etapas de clarificação tipicamente relacionadas a um bioprocessamento podem ser executadas com diferentes processos unitários, sendo que cada um possui um rendimento diferente. A filtração tangencial é um dos métodos mais utilizados para separar moléculas de interesse do caldo de cultivo, utilizando como princípio o tamanho das partículas. Neste processo de clarificação, o caldo de cultivo é bombeado tangencialmente ao longo da superfície da membrana, ao mesmo tempo em que uma pressão é aplicada perpendicularmente ao movimento do fluido, forçando a passagem de uma parte do fluido e das biomoléculas de interesse pela membrana, a qual deve ser permeável e seletiva (BELTER, 1987). Apesar de ser um modelo bem estudado ao longo dos últimos anos, a filtração tangencial ainda mostra-se como um dos processos de clarificação mais versáteis, uma vez que sua resolução depende de diversos fatores, como a membrana utilizada, o fluxo do permeado, o tempo do processo, a pressão aplicada, o *fouling* e a área da membrana (HARRISON, 2015).

Dentre as características da filtração, a formação do *fouling* na membrana é uma das que mais influenciam no rendimento. Este processo é definido como a formação de uma torta incompressível na superfície da membrana, obstruindo os poros e impedindo a passagem do soluto, diminuindo o rendimento da filtração e danificando a membrana de forma permanente. Diversos métodos para remediar o *fouling* são usados, como o *backflushing*, que é a passagem de um gás ou solvente no sentido contrário ao da filtração, retirada mecânica da torta por raspagem, otimização das condições operacionais e o uso de floculantes (GEKAS, 1990).

Os floculantes são muito estudados para remediar este processo, uma vez que possuem o potencial de agregar as moléculas presentes no caldo de cultivo a ser clarificado, especialmente quando possuem cargas residuais. Em células de *E. coli*, a carga da membrana é geralmente negativa, promovendo a agregação na presença de moléculas catiônicas (KARIM, 2008). Apesar do uso de floculantes já ter sido comprovado como um aditivo positivo ao processo de filtração (KARIM, 2008; MATOS, 2011) é necessário definir uma concentração ótima, uma vez que a adição de uma concentração muito grande

de flocculantes leva ao processo inverso ao esperado, formando uma torta incompressível novamente (MATOS, 2011).

Tendo em vista estas informações, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de flocculantes em um processo de filtração tangencial utilizado para separar células inteiras do caldo de cultivo contendo endocelulases.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Utilização de enzimas industriais**

Desde a antiguidade, os humanos têm se beneficiado do uso de enzimas mesmo não tendo pleno conhecimento sobre suas características, como no caso da produção de pães e vinhos. Dessa forma, nossa relação com o uso desta tecnologia data de séculos no passado.

Por definição, as enzimas são catalisadores biológicos que têm a capacidade de aumentar a velocidade das reações químicas, diminuindo sua energia de ativação, sem sofrer alterações em sua estrutura e são divididas em 6 classes, baseadas no tipo de reação que catalisam, conforme demonstrado na Tabela 1:

**Tabela 1:** Classes de enzimas e reações em que elas podem atuar (ROBINSON, 2015).

<b>Classe</b>	<b>Reação catalisada</b>
Oxido-redutases	Transferência de elétrons entre moléculas
Transferases	Transferência de um átomo ou de um grupo de átomos entre moléculas
Hidrolases	Reações de hidrólise
Liases	Remoção de um grupo de uma molécula (não hidrolítica)
Isomerasas	Formação de isômeros
Ligases	Ligação covalente entre duas moléculas em conjunto com a hidrólise de uma moléculas de ATP

Em sua grande maioria, as enzimas são proteínas de estrutura superior, ou seja, polímeros estruturados através de ligações peptídicas que, através de processos termodinamicamente favoráveis, enrolam-se, adquirindo uma estrutura tridimensional característica e complexa, chamada de estrutura terciária ou quaternária (em algumas enzimas). Estas particularidades de arranjo são responsáveis pela criação de um sítio ativo nas enzimas, que é a região diretamente ligada a catálise de reações, e geram especificidade e seletividade as mesmas, participando na aceleração de processos com substratos específicos (CABRAL et al, 2003).

Atualmente, um dos mercados mais proeminentes para o uso de enzimas é o de detergentes, o qual inclui tanto o uso doméstico quanto industrial, representando um total de aproximadamente 40% do consumo de enzimas produzidas industrialmente (DE ALMEIDA LIMA, 2001). Porém, este número

não representa o potencial que estas biomoléculas têm no cenário industrial mundial, sendo utilizadas desde a área de produção de alimentos até a produção de papel e celulose. Alguns exemplos sobre o uso dessas biomoléculas estão elucidados a seguir.

### **2.1.1. Indústria de alimentos**

As indústrias de alimentos atualmente precisam, para continuar com um fluxo de vendas satisfatório, satisfazer algumas necessidades básicas que o consumidor possui. A procura por alimentos com maior valor nutricional e que preserva as características organolépticas naturais dos mesmos, aliados a um maior tempo de prateleira, faz necessário um investimento cada vez maior em tecnologias que auxiliem a produção e preparo, como o uso de tecnologias enzimáticas.

O uso industrial de enzimas para modificação e produção de alimentos pode ser dividido em diferentes segmentos, como o uso em panificação, produção de queijos, produção de bebidas alcoólicas e não alcoólicas, cada um com suas particularidades e necessidades. Para a panificação, por exemplo, são usados biocatalisadores que possuem a capacidade de aumentar a qualidade do produto final, como a amilase, que ao ser adicionada a farinha gera uma maior maciez, e lipases, que atuam no aumento do sabor e prolongamento do tempo de prateleira (SINGH, 2016).

Na produção de bebidas, o uso mais comum de enzimas é na produção de sucos e bebidas à base de frutas. Aqui, o uso destas moléculas tem como objetivo aumentar a produtividade, a eficiência, diminuir os custos envolvidos no processamento e tornar o produto final esteticamente agradável para o consumidor. Para isso, são utilizados diversos tipos de enzimas, como a pectinase e a celulase, que atuam no tecido vegetal e facilitam a extração e filtração do suco (MONTEIRO, 2009).

Atualmente, uma área que está em crescimento é a de alimentos funcionais e probióticos e, em resposta a essa demanda, é crescente o uso de oligossacarídeos na dieta humana. Dos oligossacarídeos disponíveis, podemos citar os xilooligossacarídeos e os celuoligossacarídeos, ambos obtidos a partir

de matéria lignocelulósica. Os xilooligossacarídeos são definidos como oligômeros formados a partir de unidades de xilose, e sua produção tem como pressuposto a separação das frações de xilana do material lignocelulósico, através de rotas químicas ou enzimáticas. Uma vez isolada, complexos enzimáticos, contendo geralmente exo-xilanasas e  $\beta$ -xilosidasas, são utilizados para produzir cadeias de xilooligossacarídeos, ao mesmo tempo que também previnem a produção de xilose (MENEZES; DURRANT, 2008).

Os celuoligossacarídeos, por sua vez, são formados por moléculas de glicose ligadas entre si através de uma ligação  $\beta$ -1,4, e são um produto intermediário do processo de hidrólise de celulose a glicose. Assim como na produção de xilooligossacarídeos, são utilizados complexos enzimáticos para degradar a celulose, geralmente contendo endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidase, porém, a produção deste tipo de oligossacarídeo deve receber uma maior atenção, já que enzimas como a  $\beta$ -glucosidase podem impedir a formação de celuoligossacarídeos e resultar em uma alta concentração de glicose (ÁVILA et al, 2021).

### **2.1.2. Indústria de detergentes**

Na indústria de detergentes, é comum o uso de enzimas que catalisam reações de hidrólise, assim como o uso de um combinado de diferentes enzimas para garantir uma maior eficiência na limpeza (LI et al, 2012). Geralmente, são utilizadas lipases (auxiliam na retirada de gorduras), proteases (manchas de produtos orgânicos) e celulasas (aumentam a maciez e realçam as cores do produto) (SINGH, 2016).

O uso de enzimas como auxiliares na limpeza traz benefícios econômicos e ambientais. Além de necessitarem de condições mais brandas para serem usadas, os detergentes biológicos têm a vantagem de serem altamente eficientes, contribuindo para menores tempos de ciclos de lavagem, diminuindo o gasto de água e a concentração de produto utilizado. Por fim, o uso de agentes biológicos em produtos de limpeza reduz a quantidade de produtos químicos que normalmente estariam presentes em sua composição, causando

menos danos ambientais e de saúde às pessoas que o utilizam (ITO et al, 2005).

### **2.1.3. Indústria de papel e celulose**

A produção industrial de papel é feita transformando a madeira em polpa, que é então processada para produzir o papel. Inicialmente, há a degradação e posterior solubilização da lignina através do processo de kraft, no qual a madeira passa por um tratamento com o uso de produtos alcalinos e alta temperatura. Esse processo resulta na despolimerização da lignina, a qual é solubilizada no caldo de tratamento. O produto deste processo costuma ter uma cor característica marrom, sendo necessário o uso de processos químicos de branqueamento. Tais processos ocorrem com o uso de sucessivas etapas de exposição da polpa a, principalmente, dióxido de cloro e lavagem para retirar o excesso deste produto químico. Porém, o processo de branqueamento está associado a um alto custo ambiental, o que torna o uso de enzimas uma alternativa interessante para o processamento da matéria prima, diminuindo o uso de compostos antioxidantes no processo de branqueamento (WALIA, 2017; BAJPAI, 1992).

As enzimas mais utilizadas nesse segmento industrial são as xilanases, as quais atuam diretamente na hidrólise da xilana presente na madeira, hidrolisando-a em fragmentos de lignina mais fáceis de serem acessados por compostos redutores de lignina, resultando em um menor uso de químicos para a etapa de branqueamento. Além disso, é comum a presença de resinas formadas por um conjunto de diferentes lipídios, os quais representam não só um residual industrial de manejo problemático, mas que também podem causar manchas no papel. Para o controle e diminuição da quantidade de resinas no processo, é comum o uso de lipases (MONTEIRO, 2009; SINGH, 2016; BAJPAI, 1999).

Outro uso comum de enzimas na indústria de papel e celulose é na modificação das propriedades das fibras, visando facilitar o processo de refino. O tratamento enzimático é geralmente feito com celulases, os quais tendem a aumentar a aderência das fibras umas com as outras, gerando um aumento na



eficiência do processo de prensagem e secagem. As celulases também podem ser utilizadas no processo de reciclagem de papel, retirando a tinta da folha através da hidrólise parcial de carboidratos presentes (BHAT, 2000).

## **2.2. Produção de celulase**

A celulose é um dos componentes celulares mais abundantes nas plantas, sendo o principal constituinte da sua parede celular. Por ser um polímero natural composto de diversos resíduos de glicose, tecidos ricos em celulose são um interessante produto para a indústria de transformação, podendo ser usados desde fonte de carbono para produção de produtos químicos até como substrato para cultivos de microrganismos. Para isso é necessário que a celulose passe por um processo de despolimerização, o qual torna mais fácil o acesso e uso da glicose em sua composição. Tais processos podem seguir tanto rotas químicas quanto rotas enzimáticas, sendo que o uso de produtos químicos é desaconselhado, pois gera subprodutos tóxicos para as células. Assim, o uso de enzimas para a despolimerização é a rota mais comumente utilizada (JUTURU, 2014).

Para a completa degradação da celulose, geralmente é utilizado um consórcio de três enzimas diferentes: endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases (E.C. 3.2.1.21), sendo que as exoglucanases podem ser divididas em duas categorias: com ação a partir da parte redutora (E.C. 3.2.1.176) ou da não redutora (E.C. 3.2.1.91) da cadeia oligomérica. Inicialmente, a endoglucanase é responsável por clivar as ligações glicosídicas das regiões amorfas da celulose, gerando cadeias oligoméricas longas. A exoglucanase catalisa a hidrólise destas cadeias em celobiose, um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose, a qual é finalmente hidrolisada pela  $\beta$ -glucosidase, liberando um monômero de glicose (JUTURU, 2014; WILSON, 2011).

No passado, a produção de enzimas de interesse industrial era limitado pela disponibilidade de microrganismos produtores destas proteínas. Os microrganismos produtores de celulases eram isolados de diferentes fontes, como a partir de amostras de solo, esterco e do rúmen de animais. Alguns

destes microrganismos são *Cellulomonas sp.*, *Schizophyllum commune*, *Bacillus circulans*, *Proteus vulgaris* entre outros (JUTURU, 2014).

Com o desenvolvimento de tecnologias do DNA recombinante, foi possível dinamizar os processos de produção, através do uso de vetores de expressão heteróloga, os quais podem ser modificados para aumentar a produtividade do processo (JUTURU, 2012). Um dos microrganismos mais utilizados para a expressão heteróloga de proteínas recombinantes é a bactéria *Escherichia coli*. Esta bactéria Gram-negativa exibe características interessantes para uso como vetor de expressão, como um rápido crescimento em diversos tipos de meio de cultivo, baixo custo, alta produtividade e um genoma já bastante estudado e conhecido (LIU, 2012). Em muitos estudos iniciais, não se havia demonstrado a habilidade da *E. coli* de excretar proteínas, sendo necessário o uso de mais etapas de purificação (MAKRIDES, 1996), porém, novas pesquisas já demonstraram a capacidade desta bactéria para excretar proteínas (NI, 2009), o que a coloca novamente como um dos melhores vetores para produção de proteínas simples e que não necessitam de modificações pós traducionais.

### **2.3. Processos de separação e purificação**

As etapas de *downstream* típicas de um bioprocessamento tem como objetivo a retirada de contaminantes e outras impurezas presentes após a fermentação. Para isso, é preciso levar em consideração diversos fatores como as propriedades físicas e químicas da molécula de interesse (peso molecular, resistência ao calor e ao pH, solubilidade em água, entre outros) e a finalidade para qual a mesma será usada, ou seja, qual a melhor forma para que ela seja apresentada para uso. Dessa forma, os processos de separação precisam ser divididos em etapas, garantindo a purificação efetiva da biomolécula, ao mesmo tempo em que a integridade molecular não seja alterada (DORAN, 1995).

De forma geral, podemos avaliar a efetividade de um processo de purificação com base em duas medidas quantitativas, pureza e rendimento. A pureza é definida matematicamente como a quantidade de produto em relação

a quantidade total de biomoléculas (produtos + impurezas) presentes no meio inicial, demonstrada na Equação 1:

$$Pureza (\%) = \left( \frac{\textit{quantidade de produto}}{\textit{quantidade de produto} + \textit{quantidade de impurezas}} \right) * 100 \quad (1)$$

A pureza é uma das medidas mais importantes de um processo de separação, pois a utilização do produto final muitas vezes tem relação direta a essa medida. Entretanto, ela não é, necessariamente, uma medida de qualidade de processo, já que a presença de um grau mínimo de impurezas pode impedir o uso do produto final. Um exemplo de tal situação é um biofármaco injetável com pureza de 99,99% mas que apresenta traços mínimos de pirogênicos, impossibilitando seu uso para tratamento (DA SILVA et al, 2018).

O rendimento, por sua vez, é definido como:

$$Rendimento (\%) = \left( \frac{\textit{quantidade de produto recuperado}}{\textit{quantidade de produto na alimentação}} \right) * 100 \quad (2)$$

A primeira etapa de um processo de biosseparação consiste na remoção das células utilizadas na etapa de fermentação, geralmente conhecida como clarificação, caso o produto de interesse seja excretado para o meio extracelular. Para esta etapa, geralmente são utilizadas operações unitárias chamadas de processos de baixa resolução, por possuírem alto rendimento e menor seletividade aos contaminantes, gerando produtos com baixa pureza e em grandes quantidades. Esta primeira etapa, porém, precisa ser modificada caso os produtos de interesse sejam produzidos de forma intracelular, com a adição de operações unitárias de quebra da parede celular e excreção do conteúdo presente (HARRISON et al, 2015).

Em seguida, são utilizados os processos de separação soluto-soluto, os quais possuem a função de aumentar a concentração da molécula de interesse na solução pós-processamento. As operações unitárias envolvidas neste processo são as que possuem maior gama de módulos de operação, podendo ser adaptadas para aumentar ou diminuir a seletividade e a pureza do produto final, dependendo da necessidade processual, e podem ser separadas em dois

grupos de processos: isolamento do produto e purificação. Os processos de isolamento geralmente são etapas de menor resolução, como processos de adsorção e precipitação, que buscam aumentar a concentração da molécula de interesse, através da separação da mesma de outros compostos que possuem características físico-químicas muito diferentes. Estas etapas são geralmente mais simples e não necessitam de investimentos muito altos, porém são essenciais para que o conjunto de operações *downstream* sejam eficientes. As técnicas de purificação, por outro lado, tem como finalidade retirar as impurezas da solução que possuem características parecidas com a molécula alvo, ou que não tenham sido retiradas em etapas anteriores. Técnicas como a cromatografia são empregadas para garantir uma maior pureza ao mesmo tempo em que geram um menor rendimento, e costumam ser as etapas que geram o maior custo processual (DORAN, 1995).

Finalmente, são efetuadas as etapas de polimento, que possuem como função a preparação do produto final para ser comercializado. Aqui, estão incluídas as etapas que garantem mais facilidade para o transporte e acondicionamento, aumentando o tempo de vida do produto e garantindo uma forma adequada para a utilização.

## **2.4. Processos de filtração**

A filtração é um dos processos de clarificação e separação mais utilizados, por ser relativamente simples e fácil de ser executado. Nele, ocorre a separação da parte sólida (geralmente composta de partículas e moléculas sem interesse para o produto final) do líquido, através de uma superfície porosa (filtro), a partir de uma diferença de pressão, que é a força motriz do processo.

Os processos de filtração dividem-se em duas categorias: filtração convencional e filtração tangencial, nos quais a diferença predominante é a direção do fluxo de alimentação em relação à superfície do filtro. A filtração convencional é caracterizada pelo escoamento do fluido perpendicularmente em relação ao filtro e pela aplicação de uma pressão constante nesta mesma direção. Este processo é utilizado para a clarificação de moléculas e

microrganismos grandes, onde o produto de interesse é excretado para o meio extracelular, e pode ser descrito através da lei de Darcy:

$$\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p}{\mu_0 R} \quad (3)$$

A partir da Equação 3, pode-se perceber que a resistência (termo  $R$  da equação) tem influência sobre o fluxo do permeado. A filtração tradicional facilita a formação de tortas, ou seja, a deposição de resíduos sólidos e/ou formação de películas gelatinosas de agregados de biomoléculas, que diminuem o fluxo de filtração com o tempo. A resistência pode então ser separada em dois parâmetros distintos, a resistência natural do meio de filtração ( $R_m$ ) e a resistência formada pela torta ( $R_c$ ), conforme demonstrado na Equação 4:

$$R = R_m + R_c \quad (4)$$

A resistência da torta é altamente dependente de dois fatores intrínsecos do processo: o volume do filtrado e o tipo de torta formada (incompressível e compressível). As tortas incompressíveis se caracterizam por possuírem um parâmetro de resistência específica, sendo que a resistência total da torta é diretamente proporcional ao volume do filtrado, conforme indicado pela Equação 5:

$$R_c = \alpha \rho_0 \left( \frac{V}{A} \right) \quad (5)$$

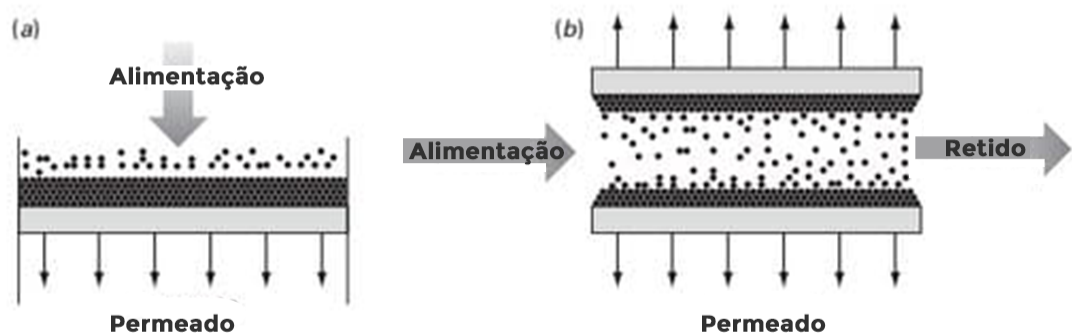
Porém, para processos com material biológico as tortas formadas são geralmente compressíveis, ou seja, a resistência não pode ser facilmente caracterizada pela Equação 5, sendo necessário estimular este parâmetro:

$$\alpha = \alpha' (\Delta p)^s \quad (6)$$

Onde  $\alpha'$  é uma constante relacionada ao tamanho das partículas do filtrado e  $s$  é o parâmetro de compressibilidade da torta. Esta relação parte do princípio de que a relação entre a resistência específica e a queda de pressão pode ser calculada experimentalmente. Embora as Equações 1 a 6 possam representar um processo convencional de filtração, nem sempre é possível caracterizar com precisão a dinâmica desse processo, sendo necessário recorrer a processos matemáticos que possam calcular os parâmetros relacionados à resistência da torta com mais exatidão (TIEN, 2003).

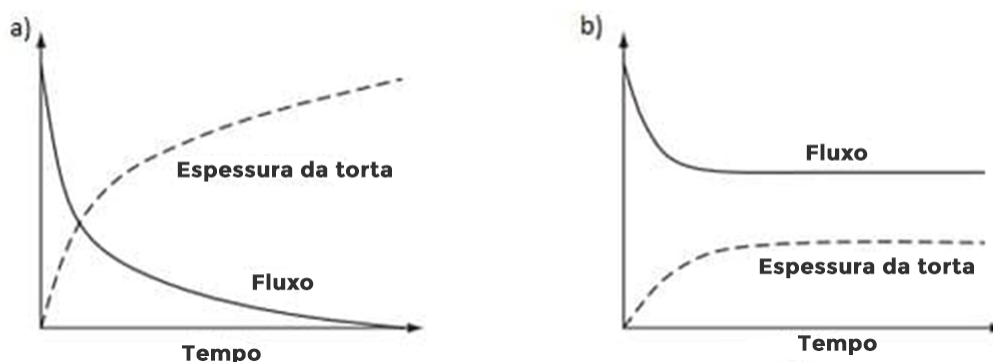
## 2.5. Filtração tangencial

Diferentemente da filtração convencional (*dead end filtration*), a filtração tangencial (*crossflow filtration*) se caracteriza por possuir um fluxo de alimentação paralelo ao meio poroso que serve como filtro para o processo, como demonstrado na Figura 1:



**Figura 1:** Esquema do funcionamento para um processo de filtração (a) convencional e (b) tangencial (adaptado de HARRISON, 2015).

Como é possível observar pela Figura 1, a formação de uma camada de resíduos (“torta”) ao longo da membrana se distribui ao longo do comprimento da membrana, seguindo a direção do fluxo de alimentação. A espessura da torta tem grande influência sobre o fluxo de permeado, podendo desde diminuir o fluxo de permeado até impedir totalmente que o fluido seja filtrado. Por causa de seu modo de operação, a filtração tangencial possui a vantagem de, após um certo tempo de processo, atingir um estado estacionário de filtração, ou seja, a espessura da torta formada não tem a capacidade de impedir totalmente o fluxo de permeado, embora possa diminuir drasticamente a velocidade com que isso acontece (Figura 2):



**Figura 2:** Esquemática da formação de camada e fluxo de permeado ao longo do tempo para um processo de filtração (a) convencional e (b) tangencial (adaptado de HARRISON, 2015).

É importante observar que a formação da torta está relacionada, entre outros fatores, à escolha da membrana, de forma que a mesma irá impedir a passagem de certos componentes ou não. A escolha do método de filtração vai depender do tamanho das partículas presentes no meio não filtrado, podendo variar na faixa de 10 - 0,1  $\mu\text{m}$  (microfiltração) até tamanhos de partículas menores que 0,001  $\mu\text{m}$  (osmose reversa). A microfiltração é comumente usada quando as biomoléculas de interesse já estão em um meio que possui um certo nível de pureza, e.g. concentração de proteínas após passarem por um etapa anterior de purificação. Nesse tipo de processo, a membrana deve possuir um tamanho de poro menor que o tamanho da biomolécula, resultando na

formação de uma camada gelatinosa rica em produtos de interesse, que pode ser recuperada através de processos posteriores. A ultrafiltração, por outro lado, é usada em processos onde o meio a ser filtrado possui contaminantes, como sólidos de tamanho inferior a 0,1 µm e/ou células inteiras, e a escolha de membrana deve ser feita de forma a reter as partículas suspensas, as quais possuem tamanho inferior a 1000 Å (HARRISON, 2015).

O processo de rejeição das partículas dissolvidas na alimentação é caracterizado por um gradiente de concentração ao longo de uma camada limite em contato com a membrana. Ao longo da filtração, o acúmulo desses solutos é chamado de polarização por concentração, e pode ser expresso matematicamente pela Equação 7:

$$Jc = -\beta \frac{dc}{dx} \quad (7)$$

Onde: J é o fluxo de permeado, c é a concentração dos solutos e β é o coeficiente de difusão do soluto. Considerando a formação de uma camada de espessura δ, a Equação 7 pode ser solucionada, obtendo-se a Equação 8:

$$\frac{c_w}{c_b} = e^{\left(\frac{J\delta}{\beta}\right)} \quad (8)$$

Com  $c_w$  representando a concentração na superfície da membrana e  $c_b$  a concentração do soluto no fluxo de alimentação. Pela Equação 8, podemos perceber a influência que o fluxo de alimentação e o coeficiente de difusão do soluto, no qual uma molécula com baixa massa molar, ou seja, coeficiente de difusão baixo, em um fluxo suficientemente alto, leva ao aumento da concentração do mesmo na superfície da membrana, iniciando o processo conhecido como *fouling* da membrana

Os processos de impedimento de difusão através da membrana são responsáveis não só pela perda de eficiência do processo como também pelo aumento de custos do mesmo. Dessa forma, entender os mecanismos de



formação e prevenção do fouling na membrana é essencial para otimizar os processos de downstream que utilizam a filtração.

A formação de uma camada de solutos na superfície do filtro é resultado de interações físicas e/ou químicas entre os componentes dissolvidos na solução e a membrana. Diversos mecanismos estão envolvidos na formação e aumento de espessura durante o processo, os quais dependem do tamanho do soluto, a carga eletrostática, o pH do meio e a estrutura da membrana. Em processos nos quais o tamanho do poro da membrana é maior que o tamanho da molécula e existe uma interação eletrostática entre os dois, pode ocorrer um processo de adsorção internamente nos poros, levando ao primeiro passo para a formação de uma camada completa. É importante ressaltar que este primeiro passo pode levar ao entupimento completo de alguns poros, levando a um processo irreversível de diminuição de eficiência da membrana já observada anteriormente em estudos (GEKAS, 1990).

Após a adsorção inicial à membrana, os componentes dissolvidos começam a se depositar em cima dos componentes adsorvidos na membrana. Com o tempo, é observada a formação completa de uma camada em partes da membrana, iniciando o impedimento ao fluxo do permeado. Este processo costuma ser a primeira etapa do processo de fouling em filtrações de células inteiras ou após sofrer lise, visto que o tamanho dos componentes dissolvidos no meio são maiores que o poro presente na membrana. Após alguns minutos, o processo de deposição irá formar várias subcamadas agregadas. Aqui, já é possível perceber uma diminuição significativa no fluxo de permeado, pois ocorre um movimento de difusão no sentido inverso ao da membrana, e as biomoléculas de interesse retornam ao fluxo de alimentação, sendo carregadas novamente ao longo da membrana até alcançarem uma região com menos impedimento.

Em processos de filtração envolvendo a presença de células não lisadas, como na purificação de proteínas extracelulares, o tamanho dos microrganismos presentes no meio pode resultar em uma rápida degradação do processo e causar dificuldades na limpeza da coluna de filtração. Desde células com tamanho reduzido como a *E. coli*, com um diâmetro médio de 1  $\mu\text{m}$ , até células maiores como leveduras, a formação da torta, aqui chamado de

biofouling, costuma ocorrer nos primeiros minutos da filtração, diminuindo drasticamente a eficiência do processo. Uma das técnicas que podem ser empregadas para diminuir a ocorrência desse fenômeno é a utilização de floculantes (KARIM, 2008; KIM, 2001).

## **2.6. Floculantes**

O processo de floculação consiste na mudança das forças coloidais presentes naturalmente em um meio, ou seja, ele altera as forças de repulsão eletrostática entre os colóides, favorecendo a atração entre os mesmos e a formação de agregados moleculares com maior tamanho que os colóides originais, facilitando o processo de filtração.

O uso de floculantes é muito difundido em diferentes tipos de indústrias, cada qual com seu uso em particular. Um dos usos mais difundidos deste tipo de molécula é no tratamento de águas residuais, no qual existe uma alta concentração de resíduos orgânicos e inorgânicos de tamanho reduzido, em uma suspensão coloidal. Estas só podem ser separadas da água quando agregadas através do uso de floculantes inorgânicos, geralmente sais metálicos, como sulfato de alumínio (LEE et al, 2014). Além disso, é muito comum encontrar sistemas dispersos na indústria química, como nas indústrias de tintas e agroquímicos, onde o uso de floculantes pode ser utilizado para estabilizar o produto final ou para modificar o comportamento mecânico de determinada substância, aumentando ou diminuindo a viscosidade do meio de forma a garantir características específicas (SHARMA et al, 2006).

A perturbação das forças de repulsão entre os colóides pode ser atingida pela adição de diversos tipos de agentes coagulantes, desde a simples adição de ácidos e bases simples até o uso de polímeros inorgânicos. Como as proteínas produzidas em fermentações são geralmente muito sensíveis a mudanças de pH, o uso de ácidos e bases muitas vezes não é a rota mais comumente utilizada, prevenindo a desnaturação e perda de atividade da molécula de interesse. Dessa forma, o uso de macromoléculas mostra-se como uma alternativa interessante (MATOS, 2011).

As macromoléculas mais utilizadas para processos de floculação são polímeros inorgânicos, sendo que os polímeros catiônicos são os mais adequados em meios com bactérias não lisadas em suspensão. Por possuírem uma distribuição de cargas negativas em sua superfície, os microrganismos são atraídos pelo polímero, formando grandes aglomerados e, conseqüentemente, facilitando o processo de filtração. Para que esse processo seja eficiente, é preciso conhecer também a concentração ótima de polímero, uma vez que uma alta concentração pode ocasionar uma mudança na concentração de cargas do meio, facilitando a dispersão coloidal novamente, assim como estudar as forças de cisalhamento envolvidas no processo, evitando que estas quebrem os aglomerados celulares (KARIM, 2008; KIM, 2001; WISNIEWSKI, 1998).

### **3. Objetivos**

Avaliar o processo de filtração para a clarificação do caldo de cultivo de *E. coli* para a produção de endoglucanase. Para isso foi avaliado:

- I. Processo de filtração em membrana de fibra oca;
- II. Modelo teórico para cálculo do fluxo do permeado utilizando o método de Runge-Kutta de 4ª Ordem;
- III. Energia gasta no processo de filtração.

### **4. Materiais e métodos**

#### **4.1. Transformação das células**

A inserção do material genético de interesse na *E. coli* foi realizada utilizando 100 µL de células, as quais eram mantidas em ultra-freezer. Às células, foi acrescentado 1 µL do plasmídeo, e a solução deixada em gelo por 20 minutos. Após esse tempo, foi realizado o *heat shock* durante 90 segundos, em banho térmico à temperatura de 42 °C. Em seguida, 800 µL de meio Luria Bertani (LB) foram adicionados e a solução foi incubada em shaker por 1 hora,

a 37 °C e 200 RPM. Finalmente, 100 µL foram plaqueados em meio sólido LB, contendo 100 µL de ampicilina, durante a noite à 37 °C.

## **4.2. Produção do caldo de cultivo**

Após o processo de transformação, aproximadamente 10 colônias foram adicionadas a um frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio LB. Em seguida, o frasco foi incubado em shaker à temperatura de 37 °C e 200 RPM, até atingir uma densidade ótica de 0,3. Este processo foi realizado em triplicata.

Em um frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio SB, foi adicionado 1 mL do pré-inóculo e deixado em shaker a 37 °C e 200 RPM durante 72 horas. Ao frasco tipo Erlenmeyer, foi adicionado 50 µL de uma solução de ampicilina na concentração de 100 g/L, a cada 24 horas de cultivo. O processo de cultivo foi realizado em triplicata.

## **4.3. Determinação da atividade enzimática**

A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de glicose por minuto e o processo de determinação da mesma foi realizado em triplicata. Em microtubos de 2 mL foi adicionado 90 µL de substrato carboximetilcelulose de sódio (CMC) 2%, previamente preparado, e mais 10 µL da amostra, sendo que no tubo controle a amostra foi substituída por 10 µL de água destilada. Os tubos foram submetidos ao banho térmico, a 70 °C por 10 minutos e, após decorrido esse tempo, foram colocados em gelo durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 100 µL de DNS e agitados em vortex para, em seguida, serem submetidos ao banho seco por 5 minutos à temperatura de 100 °C. Os tubos foram novamente colocados em gelo por 5 minutos e, em seguida, adicionou-se 1 mL de água destilada a cada microtubo e agitados em vortex. Finalmente, foi realizada a leitura de absorbância no espectrofotômetro a 540 nm.

#### 4.4. Estabilidade enzimática na presença de flocculantes

Em microtubos contendo 2 mL do caldo de cultivo, foi adicionado 0,002 g de flocculantes, de modo que a concentração final na solução foi de 1 g/L. A atividade enzimática foi avaliada de hora em hora, segundo protocolo descrito na seção 4.3, durante 4 horas, sendo que o tempo inicial foi o momento de adição da solução.

#### 4.5. Processo de filtração

O processo de filtração foi realizado utilizando membrana de fibra oca de 0,22 µm de polisulfona e área de 1100 cm<sup>2</sup>. O fluxo de permeado do processo foi avaliado, através da determinação do volume de permeado com o tempo decorrido, através da medição da vazão de permeado, descrito pela Equação 9:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{-\Delta P}{\mu \left( \frac{\alpha C_s V}{A^2} + \frac{R_m}{A} \right)} \quad (9)$$

O processo de filtração foi realizado com a adição de flocculantes (17WATIPS610 e 17WATIPS611), sendo que um experimento adicional foi executado sem a adição dos mesmos para determinação dos padrões experimentais.

#### 4.6. Determinação do fluxo teórico de permeado

Para determinação do fluxo teórico de permeado, foi utilizado o Método de Runge-Kutta de 4ª Ordem. Este método utiliza-se de sucessivas aproximações lineares para estimar os valores numéricos em um ponto (x, y), a partir de uma equação diferencial. Assim, temos:

$$\frac{dy}{dx} = f(x), y(x_0) = y_0 \quad (10)$$

A aproximação dos valores numéricos em um ponto (x, y) da Equação 10 é feita pelo conjunto de Equações:

$$k_1 = h * f(x_0, y_0) \quad (11)$$

$$k_2 = h * f(x_0 + \frac{h}{2}, y_0 + \frac{k_1}{2}) \quad (12)$$

$$k_3 = h * f(x_0 + \frac{h}{2}, y_0 + \frac{k_2}{2}) \quad (13)$$

$$k_4 = h * f(x_0 + h, y_0 + k_3) \quad (14)$$

Em seguida, o valor de k é calculado através da média ponderada dos valores parciais de  $k_n$ :

$$k = \frac{1}{6} (k_1 + 2 * k_2 + 2 * k_3 + k_4) \quad (15)$$

Por fim, os valores do intervalo (x, y) que se pretende calcular foram obtidos a partir da Equação 16 e 17:

$$y_1 = y_0 + k \quad (16)$$

$$x_1 = x_0 + h \quad (17)$$

Para este trabalho, considerou-se um passo (h) de 0,1.

#### 4.7. Determinação dos parâmetros energéticos do processo de filtração

Para determinar a energia do processo de filtração foi calculado a potência necessária para realizar a passagem do fluxo através da membrana, a partir da Equação 18:

$$P_{ot} = Q * \Delta P \quad (18)$$

Sendo Q a vazão do permeado e  $\Delta P$  a pressão. Em seguida, a energia para a filtração foi estimada a partir da integração dos valores de potência calculados, conforme Equação 19:

$$E = \int_{t_0}^t P_{ot} dt \quad (19)$$

Finalmente, calculou-se o gasto energético total do sistema, ou seja, a energia gasta para a filtração e a circulação do fluido (Equação 20 a 22):

$$E_1 = \gamma_1 * \Delta P_1 * \Delta t_1 \quad (20)$$

$$E_2 = \gamma_2 * \Delta P_2 * \Delta t_2 \quad (21)$$

$$E_R = \frac{E_2}{E_1} = \frac{\gamma_2 * \Delta P_2 * \Delta t_2}{\gamma_1 * \Delta P_1 * \Delta t_1} \quad (22)$$

Sendo  $\gamma$  a vazão de bombeamento. A energia relativa ( $E_R$ ) calculada pela Equação 22 se refere a energia total gasta em relação a uma condição fixa do processo. Para isso, foi considerado como padrão um valor de pressão de 24400 Pa.

Considerando as vazões entre dois valores de energia como constantes ( $\gamma_1 = \gamma_2$ ), em referência ao padrão, obtém-se a Equação 23, utilizada para calcular a energia resultante:

$$E_R = \frac{E_2}{E_1} = \frac{\Delta P_2 * \Delta t_2}{\Delta P_1 * \Delta t_1} \quad (23)$$

Sendo  $\Delta P_2$  a pressão utilizada,  $\Delta P_1$  a pressão de referência e  $\Delta t$  o tempo necessário para que o volume de filtrado seja igual ao volume de controle definido.

Por fim, a partir dos resultados obtidos com a Equação 23 e utilizando um volume de controle de 1,75 litros, foi calculado o volume filtrado por unidade de energia gasta para cada pressão experimental, a partir da Equação 24:

$$Q_f = \frac{1,75}{E_R} \quad (24)$$

## 5. Resultados e discussões

### 5.1. Estabilidade enzimática na presença de flocculantes

Os testes de estabilidade enzimática foram realizados com os flocculantes 17WATIPS610 e 17WATIPS611 (chamados de 610 e 611, respectivamente), pois os mesmos apresentaram bons resultados nos testes realizados por GONÇALVES (2021), apresentando formação de de partículas maiores e mais densas. Os resultados são apresentados na Tabela 2:



**Tabela 2:** Atividade enzimática na presença dos floculantes ao longo do tempo.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Padrão (U/L)</b>	<b>610 (U/L)</b>	<b>611 (U/L)</b>
0,0	2,375 ± 0,51	0,728 ± 0,30	1,620 ± 0,49
0,5	1,694 ± 0,29	3,260 ± 1,19	1,307 ± 1,88
1,0	1,454 ± 0,42	0,845 ± 0,31	2,459 ± 0,64
1,5	0,870 ± 0,11	2,097 ± 1,81	1,614 ± 0,83
2,0	0,846 ± 0,17	3,627 ± 2,09	2,273 ± 2,44
2,5	0,748 ± 0,05	1,300 ± 0,74	1,073 ± 0,33
3,0	7,480 ± 2,78	4,746 ± 0,78	8,896 ± 2,57
3,5	5,224 ± 3,90	6,642 ± 0,21	8,077 ± 1,68
4,0	7,675 ± 1,40	6,863 ± 0,09	7,579 ± 2,88

A produção de endocelulases para os testes de estabilidade enzimática foi abaixo do esperado, o que não permitiu determinar a atividade de modo confiável. Novos experimentos de estabilidade enzimática estavam programados para serem realizados novamente, confirmando ou refutando a hipótese levantada, porém, em decorrência da pandemia causada pelo Sars-cov-2, os experimentos não puderam ser realizados.

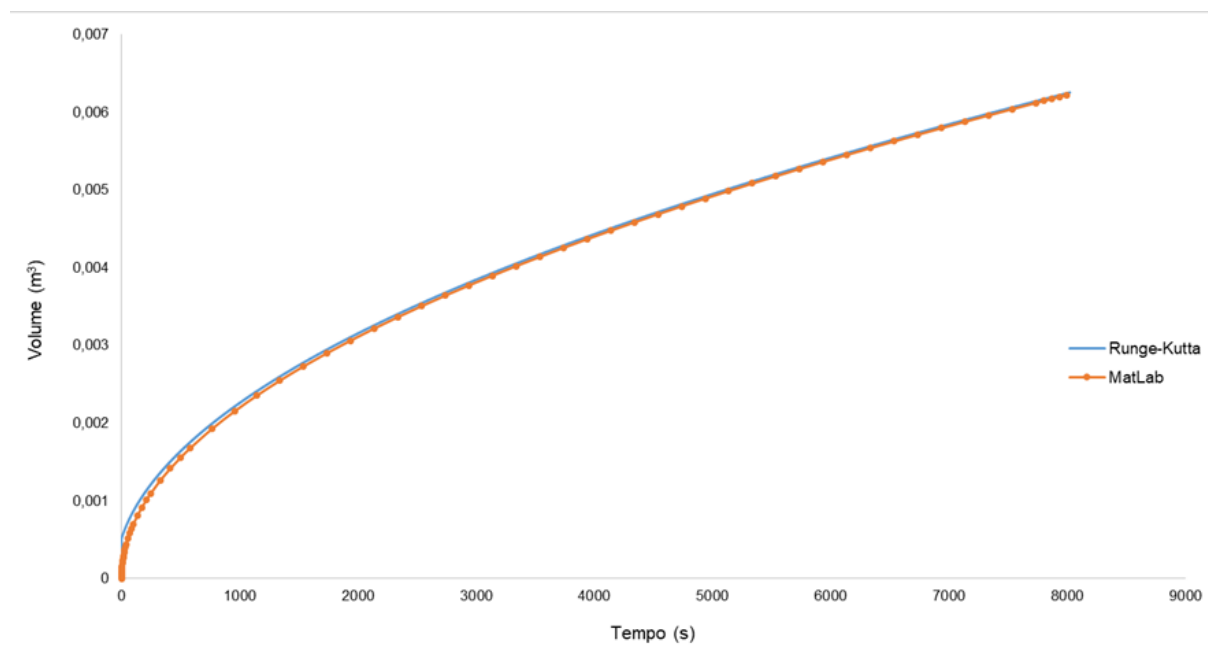
## **5.2. Determinação do fluxo teórico de permeado**

Os parâmetros utilizados para o cálculo da Equação 9 foram obtidos através de experimentos realizados em conjunto com GONÇALVES (2021), sendo o seu TCC apresentado em conjunto com este , e são apresentados na Tabela 3:

**Tabela 3:** Parâmetros experimentais para o cálculo da vazão de permeado em um sistema de filtração tangencial.

Parâmetro	Padrão	610	611
$\alpha \left(\frac{m}{kg}\right)$	$6,670 * 10^{13}$	$1,149 * 10^{14}$	$1,201 * 10^{14}$
$Cs \left(\frac{kg}{m^3}\right)$	2,8	1,44	4,44
$Rm \left(m^{-1}\right)$	$2,646 * 10^8$	$4,137 * 10^{11}$	$4,719 * 10^{12}$

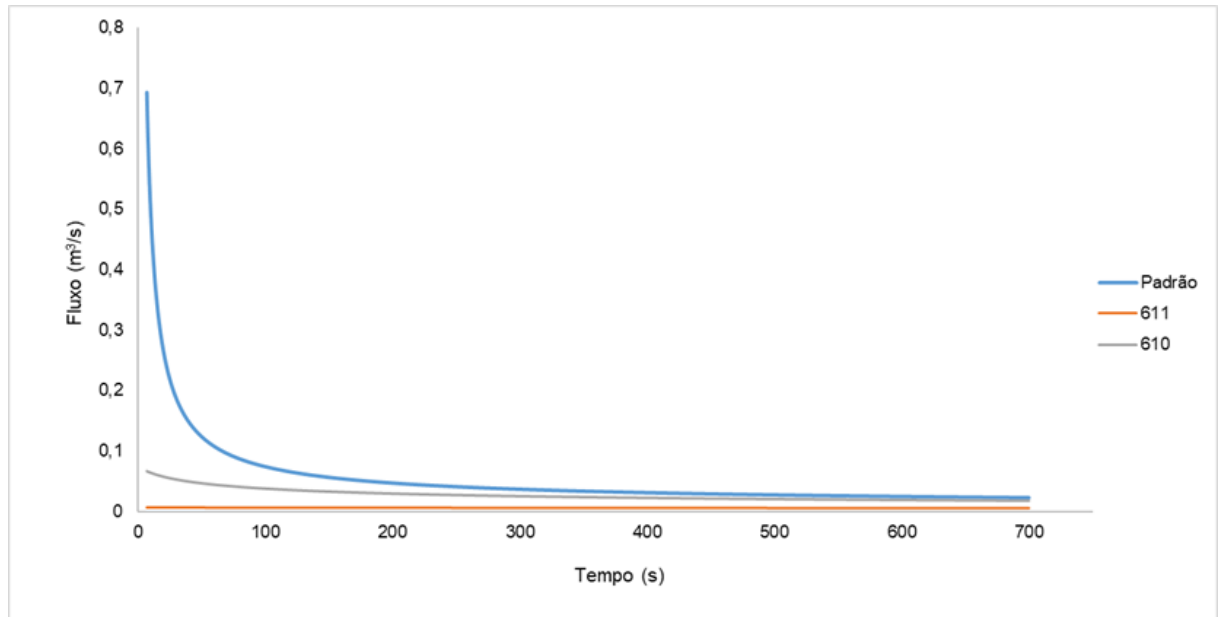
Para avaliar a eficiência do Método de Runge-Kutta para o cálculo do fluxo, foi realizada uma comparação dos resultados simulados com resultados obtidos no software MatLab, para um processo sem o uso de flocculantes. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3:



**Figura 3:** Comparação entre os resultados obtidos com o método de Runge-Kutta de 4ª Ordem e software MatLab.

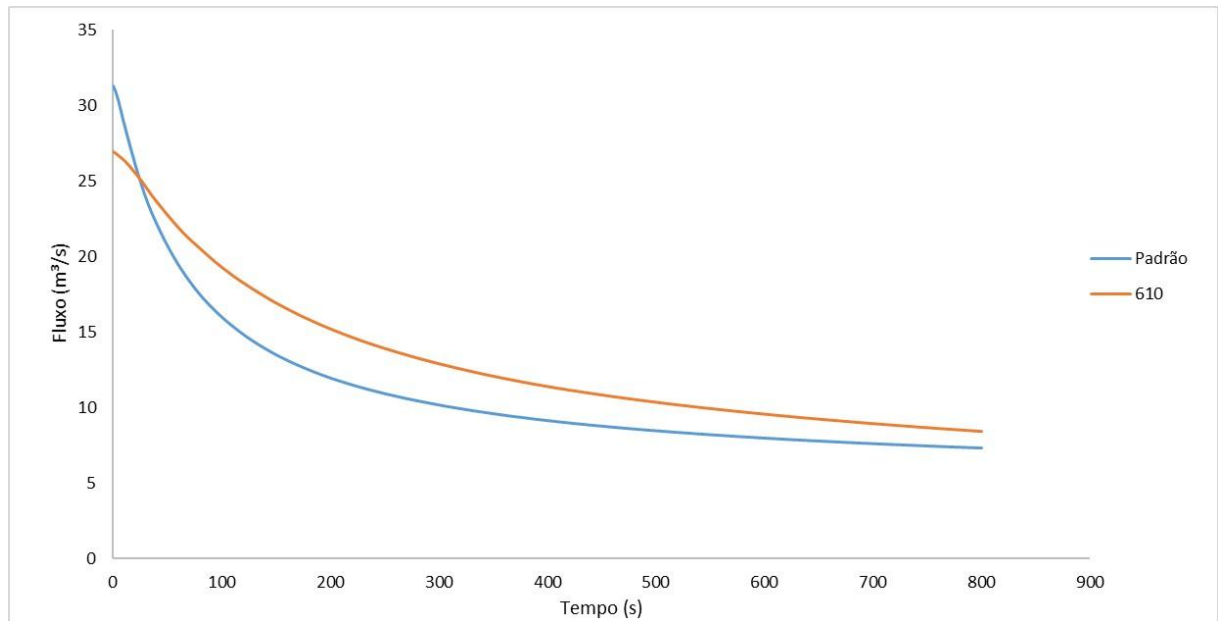
Como é possível observar pelo Figura 3, o método escolhido para este trabalho foi implementado corretamente no Excel para simular o comportamento dinâmico esperado para o aumento de volume do permeado através do tempo de processo.

Os resultados obtidos nas simulações são apresentados na Figura 4:



**Figura 4:** Resultados das simulações em função do tempo para as simulações sem (padrão) e com (610, 611) floculantes.

O comportamento da curva de fluxo para o experimento sem floculantes apresentou resultados conforme o esperado, em que tem-se um fluxo elevado para os instantes iniciais, os quais rapidamente diminuem com o passar do tempo de processo e com a formação de uma camada mais espessa na superfície da membrana. Para as simulações com os floculantes, pode-se observar a influência que a formação de agregados moleculares têm sobre o processo, os quais apresentam valores de fluxos muito inferiores ao longo do processo, o que pode ser explicado pelo aumento da resistência da torta e da membrana, parâmetros que são influenciados pelo aumento da massa molecular observado nesses testes. Entretanto, um ponto a ser considerado ao observar estes resultados, é o próprio modelo utilizado para simular os experimentos. A Figura 5 ilustra os resultados experimentais observados por GONÇALVES (2021):



**Figura 5:** Resultados experimentais para a filtração com o uso do floculante 610 e o experimento sem floculantes (adaptado de GONÇALVES, 2021).

O biofouling da membrana é um processo complexo e dinâmico, o qual recebe influência de diversos fatores, como a forma dos colóides e a carga dos íons presentes nos arredores da torta. Para analisar o efeito das tortas biológicas em um processo de filtração, os modelos utilizados para prever o comportamento do fluxo ao longo do tempo tem de levar em conta não somente os efeitos de difusão contrária ao fluxo, mas também a influência eletrostática que o material biológico presente no meio (células, proteínas, lipídeos, etc) exerce sobre a torta. Atualmente, as simulações de processos com impedimento de fluxo incorporam os diversos efeitos presentes em suas equações, generalizando os resultados para obter aproximações da realidade. Estes métodos sacrificam a resolução do resultado final para ser necessário menor poder computacional de cálculo, já que modelos complexos envolvendo os diversos efeitos de difusão, impedimento e reação não são facilmente solucionados. O uso de modelos mais completos pode ser a solução para obter resultados mais próximos da realidade (KIM, 2006). Por não representar o processo de biofouling, o modelo utilizado é uma representação aproximada da filtração real, considerando somente os principais efeitos dessa etapa de downstream. Sendo assim, a simulação mostra que o melhor processo é aquele sem floculantes.

### 5.3. Determinação dos parâmetros energéticos do processo de filtração

Para determinar os parâmetros energéticos da filtração e obter dados comparativos entre os experimentos, foi definido quatro valores de pressão para trabalho (24400 Pa, 37200 Pa, 50000 Pa, 62800 Pa) e um volume de filtrado para referência dos experimentos (1,75 litros). Os resultados da energia necessária para a realização do processo de filtração são mostradas nas Tabela 4, 5 e 6 e na Figura 6:

**Tabela 4:** Energia necessária para a filtração do volume de controle para a simulação sem floculantes.

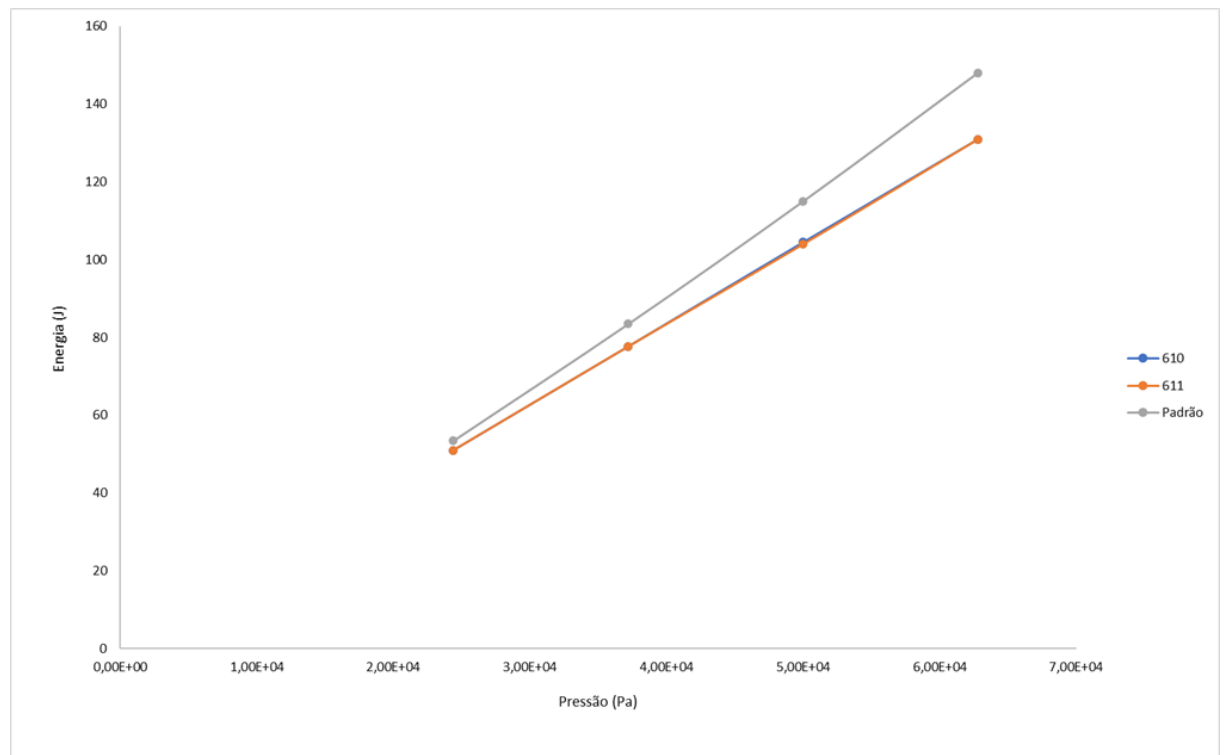
<b>Pressão (Pa)</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Energia (J)</b>	<b>Qf</b>
24400	1112,8	53,5	0,033
37200	692,4	83,5	0,021
50000	475,6	115	0,015
62800	338	148	0,012

**Tabela 5:** Energia necessária para a filtração do volume de controle para a simulação com o floculante 610.

<b>Pressão (Pa)</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Energia (J)</b>	<b>Qf</b>
24400	1650,8	51	0,034
37200	1082,8	77,7	0,023
50000	805,6	104,49	0,017
62800	641,4	131	0,013

**Tabela 6:** Energia necessária para a filtração do volume de controle para a simulação com o floculante 611.

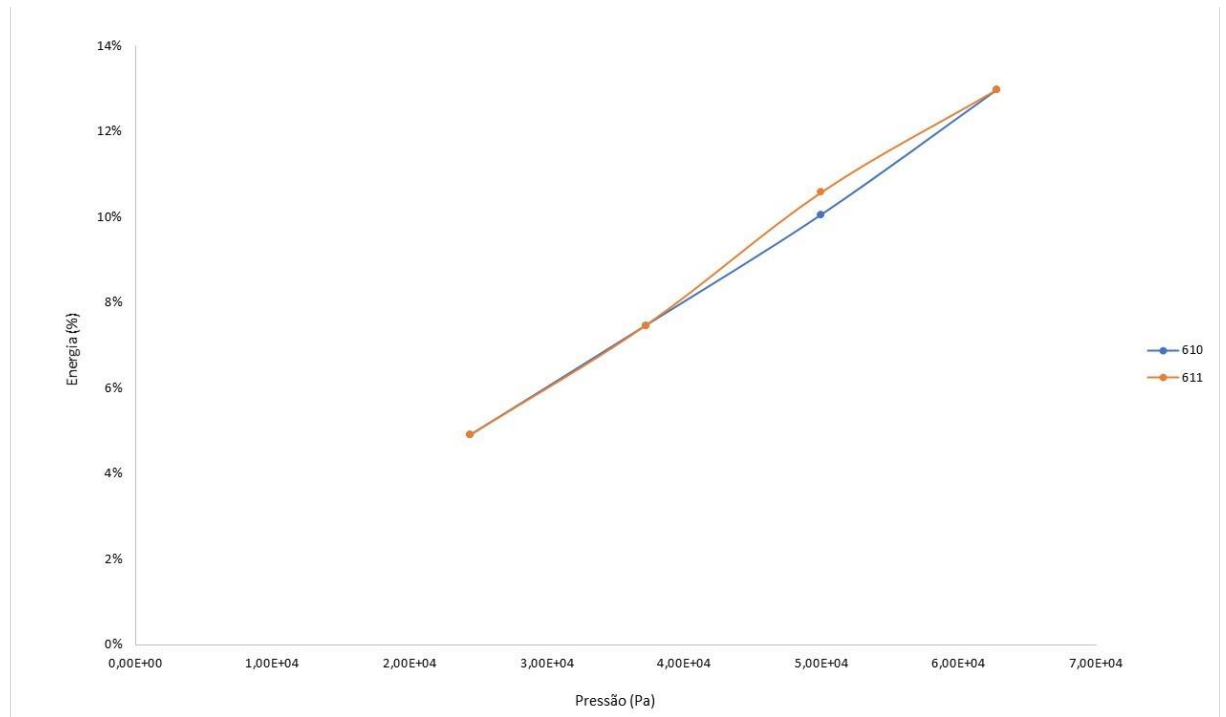
Pressão (Pa)	Tempo (s)	Energia (J)	Qf
24400	6979,6	51	0,034
37200	4578	77,7	0,023
50000	3406	104	0,017
62800	2711,8	131	0,013



**Figura 6:** Energia necessária para filtrar o volume de controle sob diferentes pressões.

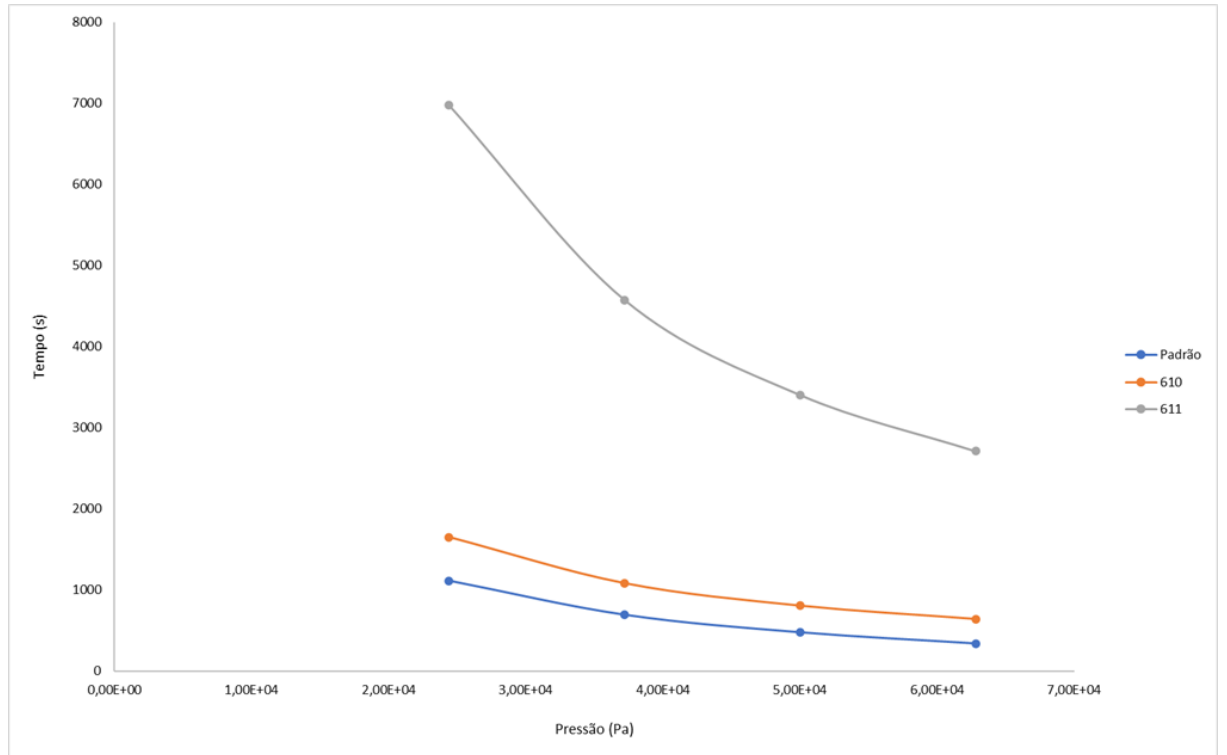
É possível notar pelos resultados obtidos que a energia necessária para o processo de filtração tem uma relação quase linear com a pressão. Para as simulações com o uso de floculantes, nota-se que a energia requerida para a filtração é sempre inferior ao padrão, especialmente em pressões mais elevadas de processamento. Esse resultado pode ser explicado pelo impedimento que o biofouling da membrana representa, já que, para os

experimentos com o uso de floclantes, o efeito destes sobre o material particulado diminui a taxa de formação da camada de resíduos na superfície da membrana. Os dados de porcentagem de energia economizada tendem a reforçar essa possibilidade, conforme demonstrado na Figura 7:

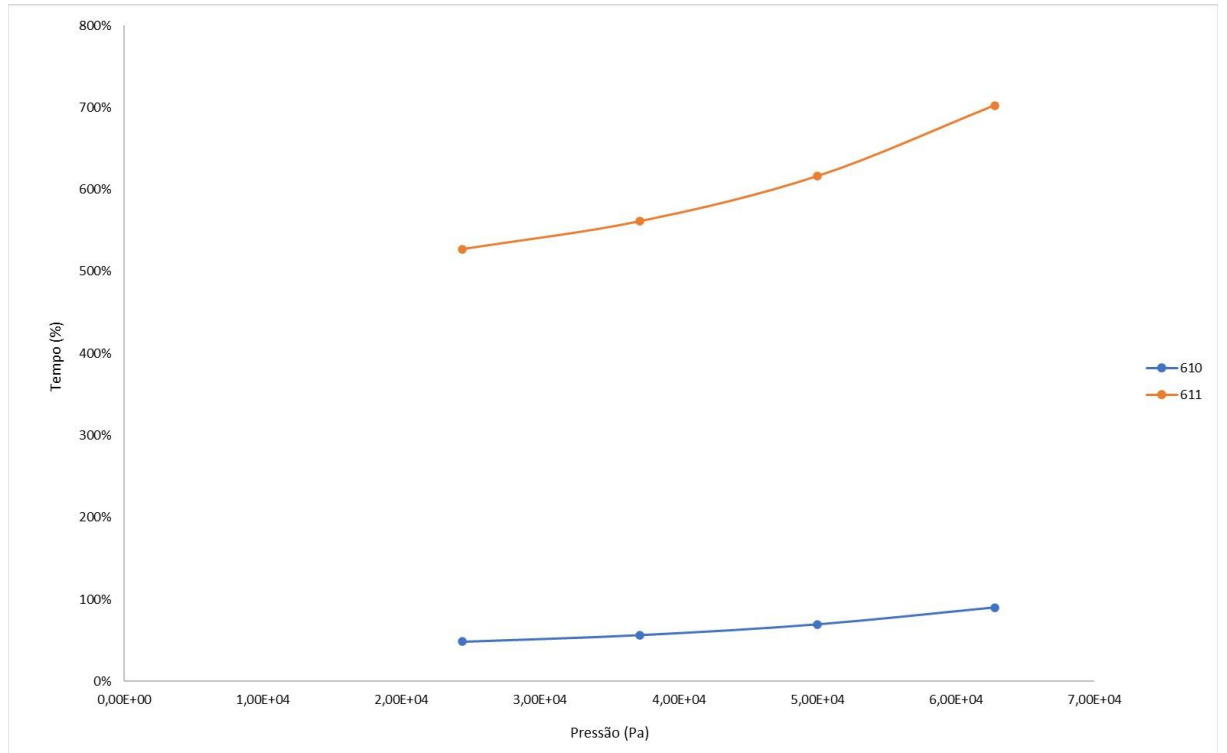


**Figura 7:** Relação da porcentagem de energia economizada (em relação ao padrão) para cada valor de pressão.

Apesar de a energia gasta no processo de filtração ser menor ao usar floclantes, os tempos de processamento se elevam, conforme é possível observar nas Figuras 8 e 9:



**Figura 8:** Tempo de processo para as diferentes pressões de simulação.



**Figura 9:** Relação da porcentagem do tempo de processo (em relação ao padrão) para cada valor de pressão.



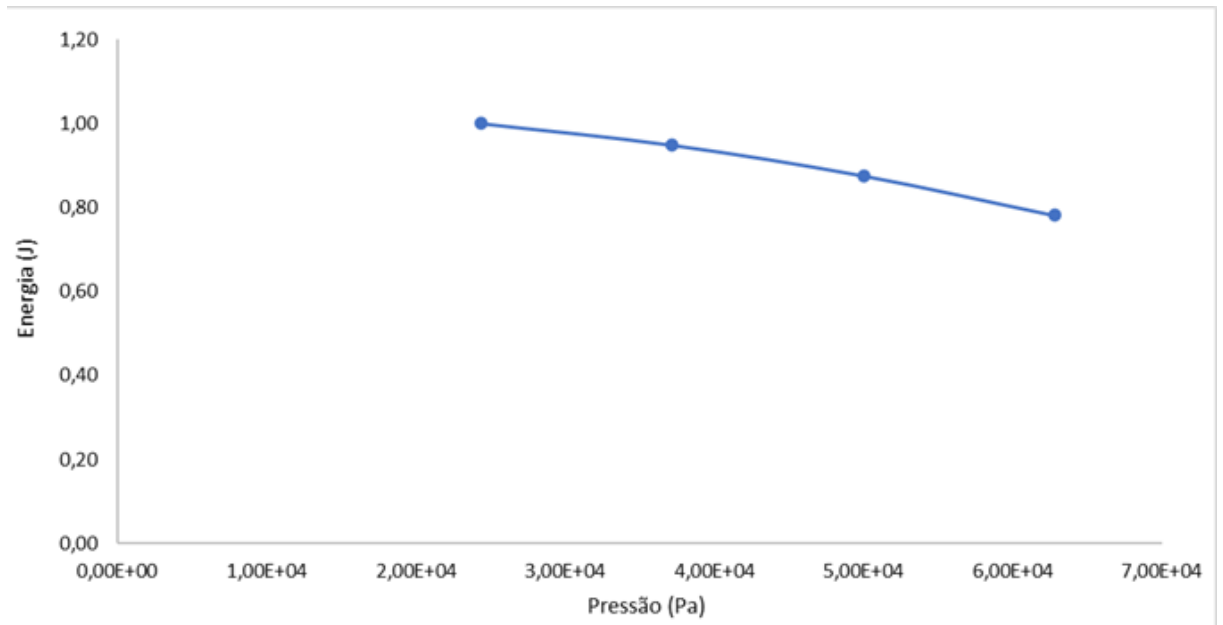
Esses resultados estão de acordo com os resultados demonstrados na Figura 4, reforçando que, para simular os efeitos de biofouling em um sistema complexo, é necessário o uso de equações que consideram os diversos efeitos ao que o sistema é submetido.

Além da energia gasta somente no processo de filtração, é necessário também considerar o gasto energético do sistema de filtração como um todo, ou seja, sistema filtro-bomba de recirculação. A energia gasta pela bomba pode ser relacionada ao tempo de processamento, a pressão utilizada e a formação da torta na superfície do filtro, fatores que influenciam no trabalho necessário para manter o fluxo de fluido constante. Utilizando a pressão de 24400 Pa como referência e os dados das simulações sem o uso de floculantes, obteve-se os resultados de energia demonstrados na Tabela 7:

**Tabela 7:** Energia requerida pela bomba de recirculação para o caldo de cultivo sem floculantes.

<b>Pressão (Pa)</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Energia</b>
24400	1112,8	1,00
37200	692,4	0,95
50000	475,6	0,88
62800	338	0,78

A energia requerida pela bomba, considerando a vazão como constante, diminui ao passo em que a pressão se eleva e aumenta de forma diretamente proporcional ao tempo de processo. Para bateladas com o uso de uma maior pressão, o tempo necessário para filtrar o caldo de cultivo é diminuído, levando a uma menor energia utilizada pela bomba e, conseqüentemente, uma menor energia para filtrar o volume de controle no experimento (1,75 L). Essa relação pode ser melhor visualizada na Figura 10:



**Figura 10:** Relação entre a pressão e a energia requerida pela bomba de recirculação para o caldo de cultivo sem floculantes.

Apesar dos resultados demonstrados na Tabela 7 e na Figura 10, podemos perceber pelos resultados da Tabela 4 e Figura 5 que um aumento na pressão requer maior energia para que a vazão do permeado seja mantida. A partir destes resultados, faz-se necessário avaliar se o aumento da pressão no sistema é energeticamente favorável para o processo, já que, ao utilizar a maior pressão, a energia requerida pela bomba é apenas 22% menor do que ao utilizar o valor de referência, enquanto que o aumento de uso de energia no processo de filtração entre os valores extremos de pressão (62800 e 24400 Pa) é de 278%.

Os resultados das simulações da energia total com o uso de floculantes são demonstrados nas Tabelas 8 e 9:

**Tabela 8:** Energia requerida pela bomba de recirculação para o caldo de cultivo com o floculante 610.

<b>Pressão (Pa)</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Energia</b>
24400	1650,8	1,48
37200	1082,8	1,48
50000	805,6	1,48
62800	641,4	1,48

**Tabela 9:** Energia requerida pela bomba de recirculação para o caldo de cultivo com o floculante 611.

<b>Pressão (Pa)</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Energia</b>
24400	6979,6	6,27
37200	4578	6,27
50000	3406	6,27
62800	2711,8	6,27

Para as simulações sem o uso de floculantes, é possível perceber a influência que o aumento da pressão e o tempo de processamento tem sobre a energia total requerida, onde é possível perceber que o aumento da pressão é inversamente proporcional a energia requerida pela filtração e diretamente proporcional ao tempo de processamento. Esses resultados podem ser explicados a partir da análise empírica da direção do fluxo e da pressão aplicada. Com o aumento da pressão, há um aumento das forças de cisalhamento nas partículas presentes na superfície da membrana, aumentando o arrasto das partículas e diminuindo a polarização, resultando em uma maior área livre, ou seja, sem a formação da torta. Com o uso de floculantes, conforme demonstrado nas Tabelas 8 e 9, a energia requerida pela

bomba aumenta em relação aos valores ao padrão, mas se mantém constante ao aumentar a pressão. Ao utilizar esses polímeros, os agregados com alta massa molecular tendem a se acumular em uma região específica da membrana, geralmente nas regiões onde o processo de filtração se inicia. Ao longo do processo, essas regiões exibem uma maior resistência ao fluxo, enquanto as regiões sem essa concentração de partículas apresentam menor resistência, sendo necessário uma menor energia para realizar o processo (SONG, 1995). Com essa dinâmica de concentração de partículas, o aumento da pressão não é suficiente para diminuir a polarização e o *fouling* da membrana, resultando no valor constante de energia total observado.

A partir destes resultados, podemos inferir que, ao adicionar flocculantes ao sistema, é necessário uma maior quantidade de energia em comparação ao processo sem flocculantes na menor pressão, elevando os gastos energéticos totais (considerando o processo de filtração e a bomba de recirculação). Dessa forma, os gastos energéticos se tornam um fator decisório na avaliação de custo benefício do uso dos polímeros, em conjunto com o tempo de processamento e o rendimento do produto final.

## 6. Conclusão

O uso de métodos computacionais para simular o processo de filtração é uma importante ferramenta no estudo, controle e previsão de bioprocessos. Apesar dos erros propagados pelo no ajuste do modelo utilizado, a simulação realizada neste trabalho mostrou-se capaz de representar resultados esperados para o fluxo de permeado do caldo de cultivo nos experimentos com e sem flocculantes.

A simulação da energia total do sistema mostrou que, para a simulação sem o uso de flocculantes, o aumento da pressão resultou em um menor gasto energético, reduzindo-o em 22%. Para as simulações com o uso de flocculantes, a energia gasta se manteve constante em todas as pressões utilizadas, porém, houve um aumento no gasto energético de 148% e 627% para os flocculantes 17WATIPS610 e 17WATIPS610, respectivamente. Estes dados, em conjunto com os resultados do fluxo de permeado e tempo de filtração, permitem inferir

que o uso de floculantes não favoreceu o processo de filtração, diminuindo sua eficiência processual e energética.

## 7. Referências Bibliográficas

- ÁVILA, Patrícia F. et al. Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 1-11, 2021.
- BAJPAI, Pratima. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnology progress**, v. 15, n. 2, p. 147-157, 1999.
- BAJPAI, Pratima; BAJPAI, Pramod K. Biobleaching of kraft pulp. **Process biochemistry**, v. 27, n. 6, p. 319-325, 1992.
- BELTER, Paul A.; CUSSLER, Edward Lansing; HU, Wei-Shou. *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*. 1987.
- BHAT, MK14538100. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M. (Coord). **Engenharia enzimática**. Lidel, 2003.
- DA SILVA, Cristiane Caldeira et al. Métodos alternativos para a detecção de pirogênios em produtos e ambientes sujeitos a Vigilância Sanitária: avanços e perspectivas no Brasil a partir do reconhecimento internacional do Teste de Ativação de Monócitos. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia (Health Surveillance under Debate: Society, Science & Technology)–Visa em Debate**, v. 6, n. 1, p. 137-149, 2018.
- DE ALMEIDA LIMA, Urgel (Ed.). **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Blucher, 2001.
- DORAN, Pauline M. **Bioprocess engineering principles**. Elsevier, 1995.
- GEKAS, V.; HALLSTRÖM, B. Microfiltration membranes, cross-flow transport mechanisms and fouling studies. **Desalination**, v. 77, p. 195-218, 1990.
- GONÇALVES, Vinícius de L. Análise da adição de floculantes no processo de Microfiltração de *E.coli* na produção de xilanase. **Trabalho de Conclusão de**

**Curso - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2021.**

HARRISON, Roger G. et al. **Bioseparations science and engineering**. Oxford University Press, USA, 2015.

ITO, Susumu et al. Enzymes in modern detergents. In: **Microbial Enzymes and Biotransformations**. Humana Press, 2005. p. 151-161.

JUTURU, Veeresh; WU, Jin Chuan. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188-203, 2014.

JUTURU, Veeresh; WU, Jin Chuan. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1219-1227, 2012.

KARIM, Muhammad Nazmul et al. Flocculation enhanced microfiltration of Escherichia coli lysate. **Biochemical engineering journal**, v. 40, n. 3, p. 512-519, 2008.

KIM, Albert S.; CHEN, Huaiqun; YUAN, Rong. EPS biofouling in membrane filtration: an analytic modeling study. **Journal of colloid and interface science**, v. 303, n. 1, p. 243-249, 2006.

KIM, Jin-Sung; AKEPRATHUMCHAI, Saengchai; WICKRAMASINGHE, S. R. Flocculation to enhance microfiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 182, n. 1-2, p. 161-172, 2001.

LEE, Chai Siah; ROBINSON, John; CHONG, Mei Fong. A review on application of flocculants in wastewater treatment. **Process safety and environmental protection**, v. 92, n. 6, p. 489-508, 2014.

LI, Shuang et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 2, n. 3, p. e201209017, 2012.

LIU, Min; YU, Hongwei. Co-production of a whole cellulase system in Escherichia coli. **Biochemical engineering journal**, v. 69, p. 204-210, 2012.

MAKRIDES, Savvas C. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 3, p. 512-538, 1996.

MATOS, Maria et al. Ultrafiltration of activated sludge: Flocculation and membrane fouling. **Desalination**, v. 281, p. 142-150, 2011.

MENEZES, Cristiano Ragagnin de; DURRANT, Lucia Regina. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v. 38, p. 587-592, 2008.

MONTEIRO, Valdirene Neves; DO NASCIMENTO SILVA, Roberto. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

NI, Ye; CHEN, Rachel. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 11, p. 1661-1670, 2009.

ROBINSON, Peter K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1, 2015.

SADHU, Sangrila; MAITI, Tushar Kanti. Cellulase production by bacteria: a review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 235, 2013.

SHARMA, B. R.; DHULDHOYA, N. C.; MERCHANT, U. C. Flocculants—an ecofriendly approach. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 14, n. 2, p. 195-202, 2006.

SINGH, Rajendra et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-15, 2016.

SONG, Lianfa; ELIMELECH, Menachem. Theory of concentration polarization in crossflow filtration. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 91, n. 19, p. 3389-3398, 1995.

TIEN, Chi; BAI, Renbi. An assessment of the conventional cake filtration theory. **Chemical Engineering Science**, v. 58, n. 7, p. 1323-1336, 2003.

WALIA, Abhishek et al. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 11, 2017.

WILSON, David B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 3, p. 259-263, 2011.

WISNIEWSKI, C.; GRASMICK, Alexander. Floc size distribution in a membrane bioreactor and consequences for membrane fouling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 138, n. 2-3, p. 403-411, 1998.