

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 25/03/2027.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Bruno Willian Picão

Integração de modificações geométricas em biorreator
***Airlift* e estratégias de alimentação em reatores**
convencionais na produção de riboflavina por *Bacillus*
subtilis

Araraquara - SP
2025



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Bruno Willian Picão

Integração de modificações geométricas em biorreator
***Airlift* e estratégias de alimentação em reatores**
convencionais na produção de RF por *Bacillus subtilis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.
Orientador(a): Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri.

Araraquara - SP
2025

P585i

Picão, Bruno Willian.

Integração de modificações geométricas em biorreator *Airlift* e estratégias de alimentação em reatores convencionais na produção de RF por *Bacillus subtilis* / Bruno Willian Picão. – Araraquara, 2025.
139 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Marcel Otavio Cerri.

1. Riboflavina. 2. *Bacillus subtilis*. 3. *Airlift*. 4. Fed-batch. I. Cerri, Marcel Otavio, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

1. CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Integração de modificações geométricas em biorreator Airlift e estratégias de
alimentação em reatores convencionais na produção de RF por *Bacillus subtilis*

AUTOR: BRUNO WILLIAN PICÃO

ORIENTADOR: MARCEL OTÁVIO CERRI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCEL OTÁVIO CERRI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. LIZIANE MARÇAL DA SILVA (Participação Virtual)
Universidade de Franca (Unifran)

Prof. Dr. CASSAMO USSEMANE MUSSAGY (Participação Virtual)
Escuela de Agronomía da Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos / Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV) - Chile

Prof. Dr. GUILHERME PEIXOTO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



2. CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Prof. Dr. ALVARO DE BAPTISTA NETO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas
do
Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 25 de março de 2025

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. Aos meus pais e ao meu irmão, agradeço pela força, estímulo e participação em todos os momentos da minha vida. Vocês são o meu maior motivo, e sem o apoio e suporte de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui. Meu amor e gratidão eterna também se estendem a toda a minha família, que sempre me motivou e torceu pelo meu sucesso. Agradeço profundamente ao meu orientador, Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri, pelos ensinamentos e pelo suporte essencial no desenvolvimento desta pesquisa. Sou grato pela confiança, amizade e pela preocupação com meu crescimento, tanto no aspecto profissional quanto pessoal. Aos amigos Daniele, Renata, Cassamo e Vitor, muito obrigado por todo o apoio durante este período. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse trilhar essa jornada. Meus agradecimentos aos técnicos Ivan, Adriana, Ana, Flavio e Matheus, cujo profissionalismo e disposição em ajudar foram de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara, pelas oportunidades, infraestrutura e suporte concedidos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos, o meu muito obrigado.

Resumo

Este estudo realizou o desenvolvimento e integração de promotores helicoidais em biorreatores do tipo Airlift, bem como a aplicação de estratégias de alimentação exponencial em biorreatores convencionais de tanque agitado (STR) para a produção de riboflavina (RF) por *Bacillus subtilis*. Na primeira etapa do estudo, a inclusão dos promotores helicoidais resultou na otimização da transferência de oxigênio, evidenciada pelo aumento do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). Foram construídos e avaliados diferentes modelos de helicoides acoplados às regiões de riser e downcomer de um biorreator Airlift de tubos concêntricos, operando sob diversas taxas de aeração. Entre os modelos testados, o helicóide do tipo Onda com uma volta e posicionamento externo (OE1) apresentou o melhor desempenho global, alcançando um aumento de aproximadamente 23% no valor de k_{La} . Sua aplicação em cultivos com *B. subtilis* confirmou a eficácia do modelo em escala laboratorial, com destaque para a condição de 2 vvm, na qual foi obtida uma produção de 2,49 g/L de RF, um incremento de 43,9% em comparação ao tubo padrão na mesma taxa de aeração. Paralelamente, foi investigada a produção de RF em biorreatores STR operando em modo Fed-batch com alimentação exponencial. Os resultados demonstraram que o crescimento celular e a síntese de riboflavina foram significativamente influenciados pela concentração de açúcar no meio de cultivo e pelo setpoint de oxigênio dissolvido. A melhor condição resultou em uma produção de 2,29 g/L de RF. De forma integrada, este estudo oferece uma visão abrangente sobre os principais fatores que afetam a produção de riboflavina por *B. subtilis*, propondo soluções inovadoras para a intensificação do processo, tanto em reatores Airlift modificados quanto em reatores STR operando sob estratégias otimizadas de alimentação.

Palavras-chave: Riboflavina; *Bacillus subtilis*; Airlift; fed-batch.

Abstract

This study focused on the development and integration of helical flow promoters in Airlift bioreactors, as well as the application of exponential feeding strategies in conventional stirred-tank bioreactors (STR) for the production of riboflavin (RF) by *Bacillus subtilis*. In the first phase of the research, the inclusion of helical promoters led to the optimization of oxygen transfer, as evidenced by an increase in the volumetric oxygen transfer coefficient (kLa). Various helical designs were constructed and evaluated when coupled to the riser and downcomer regions of a concentric-tube Airlift bioreactor, operated under different aeration rates. Among the tested configurations, the external Wave-type helical promoter with one turn (OE1) exhibited the best overall performance, achieving an approximately 23% increase in kLa. Its application in *B. subtilis* cultures confirmed the model's effectiveness at laboratory scale, with notable results under the 2 vvm condition, where an RF production of 2.49 g/L was obtained—representing a 43.9% increase compared to the standard tube at the same aeration rate. In parallel, RF production in STR bioreactors operating in Fed-batch mode with exponential feeding was investigated. The results showed that both biomass growth and riboflavin synthesis were significantly influenced by the sugar concentration in the culture medium and the dissolved oxygen setpoint. The best condition yielded an RF production of 2.29 g/L. Taken together, this study provides a comprehensive understanding of the key factors affecting riboflavin production by *B. subtilis*, presenting innovative solutions for process intensification in both modified Airlift reactors and STR systems operating under optimized feeding strategies.

Keywords: Riboflavin; *Bacillus subtilis*; Airlift; fed-batch.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biorreator modelo STR, adaptado (LIU, Shijie, 2020).	19
Figura 2: Diferentes modelos de impelidores a) Hélice marinha e pás inclinada (fluxo axial); (b) Rushton e Smith (fluxo radial); c) Âncora (fluxo tangencial); e (d) Helicoidal (fluxo axial), adaptado (Garcia-Ochoa et. al., 2011).	20
Figura 3: Configurações de <i>Airlift</i> : Loop Interno (A); Loop Interno Inverso (B); Loop Interno de Placa Dividida (C); Loop Externo (D). Adaptado de (ZHANG <i>et al.</i> , 2019).	22
Figura 4: Amostra de RF de cultivo em biorreator (Autor).	24
Figura 5: Diagrama da transferência de oxigênio Gás-Líquido-Célula. Adaptado (CYTIVA, 2020).	29
Figura 6: Fases de crescimento celular. Adaptado (CYTIVA, 2020)	30
Figura 7: Perfis de concentração em película gás – líquido para a transferência de um composto gasoso A em fase líquida, adaptado (NIELSEN e VILLADSEN, 2011).	32
Figura 8: Desenho esquemático do biorreator <i>Airlift</i> com cotas e detalhe do aspensor. (Autor).	40
Figura 9: Vista frontal de um Biorreator convencional; (A) impelidor do tipo turbina Smith; (B) impelidor do tipo turbina Rushton. (Autor).	42
Figura 10: Modelo de posição promotores de escoamento com relação a rotação. (Autor).	43
Figura 11: Demonstração da conformação geométrica dos promotores desenvolvidos. (A) Onda 360° e 720°, (B) Peneira, (C) Serrilhado.	44
Figura 12: Esquema do modelo de código utilizado para identificar os promotores de escoamento helicoidais.	45
Figura 13: Sequência Metodológica do Estudo.	Erro! Indicador não definido.
Figura 14: k_{La} (s^{-1}) dos modelos com geometria “Onda” para baixas vazões. A) 1 vvm, B) 2 vvm.	Erro! Indicador não definido.
Figura 15: k_{La} (s^{-1}) dos modelos com geometria “Onda” para altas vazões. A) 3 vvm, B) 4 vvm.	Erro! Indicador não definido.
Figura 16: Helicoides com melhores resultados de k_{La} em função da velocidade superficial do gás de acordo com a taxa de aeração. ..	Erro! Indicador não definido.
Figura 17: Helicoides com melhores resultados εG em função da velocidade superficial do gás de acordo com a taxa de aeração.	Erro! Indicador não definido.

Figura 18: Cultivos em biorreator *Airlift* dados de biomassa.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 19: Cultivos em biorreator *Airlift* dados de substrato.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 20: Cultivos em biorreator *Airlift* dados de RF...**Erro! Indicador não definido.**

Figura 21: Influência dos Componentes do Meio de Cultura sobre a Produção de Biomassa de *Bacillus subtilis*.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 22: Influência dos Componentes do Meio de Cultura sobre a Produção de RF por *Bacillus subtilis*.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 23: Análise dos Efeitos dos Componentes do Meio de Cultura sobre a Produção de RF em *Bacillus subtilis***Erro! Indicador não definido.**

Figura 24: Análise dos Efeitos dos Componentes do Meio de Cultura sobre a Produção de Biomassa.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 25: Dados de biomassa dos cultivos em biorreator STR operados em Fed-batch**Erro! Indicador não definido.**

Figura 26: Dados de substrato dos cultivos em biorreator STR operados em Fed-batch**Erro! Indicador não definido.**

Figura 27: Dados de RF dos cultivos em biorreator STR operados em Fed-batch.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 28: Influência dos parâmetros sobre a Produção de RF por *Bacillus subtilis* em modo Fed-batch.**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Regiões em <i>Airlift</i> , adaptado (ESPERANÇA, Mateus Nordi, 2014).	22
Tabela 2: Produção de RF por <i>Bacillus subtilis</i> e seus parâmetros operacionais.	27
Tabela 3: Solubilidade do oxigênio em água pura a 1 atm, adaptado de (NIELSEN e VILLADSEN, 2011).	28
Tabela 4: Revisão dos estudos em reatores <i>Airlift</i> com inclusão de promotores de escoamento.....	37
Tabela 5: Parâmetros e estratégias de alimentação para o modo Fed-batch, (autor).	38
Tabela 6: Dimensões dos biorreatores <i>Airlift</i> 5 Litros de capacidade.....	40
Tabela 7: Dimensão do posicionamento das turbinas no biorreator STR.	42
Tabela 8: Dados dos promotores helicoidais utilizados no biorreator <i>Airlift</i>	44
Tabela 9: Composição do Meio de Inóculo (MI).....	49
Tabela 10: Cultivo em biorreator <i>Airlift</i> condições de operação.	51
Tabela 11: Matriz Delineamento de Composto Central (DCC) de 3 variáveis.....	53
Tabela 12: Dados da relação entre potência e k_{La} para as diversas configurações de helicoides em 1, 2, 3 e 4 vvm.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 13: Valores de retenção gasosa obtidos no Biorreator <i>Airlift</i> sem e com a inclusão dos promotores helicoidais propostos.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 14: Desempenho dos cultivos em biorreator <i>Airlift</i>	Erro! Indicador não definido.
Tabela 15: Constante de 1ª ordem (K) e coeficiente de determinação (R^2) para o consumo de substrato em cada condição de cultivo.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 16: Planejamento Experimental para Análise de Produção de Biomassa e RF em Diferentes Condições de Meio de Cultura em g/L.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 17: Desempenho dos cultivos em fed-batch.....	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Definição	Unidade
a	Área interfacial gás-líquido por unidade de volume	m ² por m ⁻³
A_D	Área da seção transversa do <i>Downcomer</i>	m ²
A_R	Área da seção transversa do <i>Riser</i>	m ²
C_A	Concentração de um composto A	mol.m ⁻³
C_A^*	Concentração de saturação de um composto A	mol.m ⁻³
$C_{A,i}$	Concentração de equilíbrio de um composto A	mol.m ⁻³
C_e	Concentração de oxigênio dissolvido	mmol.L ⁻¹
c_{O_2}	Concentração real do oxigênio na fase líquida	mol.L ⁻¹
$c_{O_2}^*$	Concentração de saturação do O ₂	mol.L ⁻¹
DCC	Delineamento de Composto Central	---
DE1	Diâmetro interno do tubo externo	mm
DE2	Diâmetro externo do tubo externo	mm
DI1	Diâmetro interno do tubo interno	mm
DI2	Diâmetro externo do tubo interno	mm
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm	nm
ε_G	Retenção gasosa global	---
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo	---
FMN	Flavina mononucleotídeo	---
H_A	Constante de Henry	atm.L.mol ⁻¹
H1	Altura da base do reator até a base do tubo interno	mm
H2	Altura do topo do tubo interno até a altura de líquido	mm
H3	Altura do tubo interno	mm
H4	Altura de líquido	mm
H5	Altura total do reator	mm
H6	Altura entre a turbina <i>Smith</i> e <i>Rushton</i>	mm
H7	Altura entre a base do eixo e a turbina <i>Smith</i>	mm
h_D	Altura da dispersão	mm
h_L	Altura de líquido	mm
J_A	Fluxo de um composto A	mol.m ⁻² .h ⁻¹

$J_{A,g}$	Fluxo de um composto A através do filme de gás	$\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
$J_{A,l}$	Fluxo de um composto A através do filme líquido	$\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
k_e	Constante de atraso do eletrodo	s^{-1}
k_g	Coeficiente de transferência de massa do gás	$\text{mol.atm}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$
k_G	Coeficiente de transferência de massa através da película de gás	m.s^{-1}
K_l	Coeficiente de transferência de massa geral	m.s^{-1}
k_L	Coeficiente de transferência de massa através da película do líquido	m.s^{-1}
k_{La}	Coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigênio	s^{-1}
OTR	Taxa de transferência de oxigênio	$\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$
OUR	Taxa de consumo de oxigênio pelo microrganismo	$\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$
Pr	Produtividade	g.h^{-1}
$q_{O_2}^t$	Taxa volumétrica de transferência de massa de oxigênio	$\text{mol O}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
rpm	Rotação por minuto	r.min^{-1}
STR	Biorreator mecanicamente agitado	---
U_{gs}	Velocidade superficial de subida do gás	m.s^{-1}
vvm	Vazão de volume por minuto	----
$Y_{p/x}$	Produção específica	g/g
$Y_{x/s}$	coeficiente de rendimento de substrato em células	g/g
π_A	Pressão parcial de um composto A na bolha de gás	atm
$\pi_{A,i}$	Pressão parcial de um composto A na bolha de gás que corresponde a concentração de equilíbrio	atm
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular	h^{-1}

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Revisão da literatura	17
2.1. Biorreatores	17
2.1.1. Biorreator mecanicamente agitado e aerado (STR)	19
2.1.2. Biorreator <i>Airlift</i>	21
2.2. Vitamina B2	23
2.2.1. Funções Biológicas	24
2.2.2. Aplicações Industriais	24
2.3. <i>Bacillus subtilis</i>	25
2.3.1. Produção de Riboflavina por <i>Bacillus subtilis</i>	26
2.4. Demanda e transferência de oxigênio em bioprocessos	28
2.4.1. Taxa de Consumo de Oxigênio (OUR)	30
2.4.2. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La)	31
2.4.3. Métodos para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La)	34
2.5. Retenção gasosa	35
2.6. Promotores de escoamento	36
2.7. Fed-batch	38
3. Objetivo	39
4. Material e Métodos	39
4.1. Biorreator <i>Airlift</i>	39
4.2. Biorreator convencional (STR)	41
4.3. Sistema de aquisição de dados e controle dos biorreatores	42
4.4. Promotores de Fluxo Radial	43
4.5. Determinação do Coeficiente volumétrico de Transferência de Oxigênio (k_La)	45
4.5.1. Aquisição de dados para análise de k_La	46
4.6. Retenção gasosa global	46
4.7. Cálculo de Potência	47
4.7.1. Potência Mecânica (STR)	47
4.7.2. Potência Fornecida ao Líquido em Biorreatores <i>Airlift</i>	47
4.8. Microrganismo	48

4.8.1. Preservação do microorganismo.	49
4.9. Meios de Cultura.	49
4.9.1. Meio de reativação (MR).	49
4.9.2. Meio de Inóculo (MI).	49
4.9.3. Meio de Produção (MP).	50
4.10. Cultivo em biorreator.	50
4.10.1. Reativação.	50
4.10.2. Pré-Inóculo	50
4.10.3. Inóculo.	51
4.10.4. Produção.	51
4.10.5. Condições de Cultivo em biorreator <i>Airlift</i>	51
4.10.6. Condições de Cultivo em biorreator STR.	52
4.11. Métodos Analíticos.	53
4.11.1. Determinação da Concentração Celular	53
4.11.2. Determinação de riboflavina	54
4.11.3. Determinação da concentração de Açúcar.	55
4.11.4. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$). 55	
4.11.5. Determinação do coeficiente de rendimento de substrato em células ($Y_{x/s}$). 55	
4.11.6. Determinação da produção específica ($Y_{p/x}$), ($Y_{p/s}$).	56
4.11.7. Modelagem para Consumo de Substrato	56
5. Resultados e discussão	58
5.1. Biorreator <i>Airlift</i>	Erro! Indicador não definido.
5.1.1. Efeitos Hidrodinâmicos dos Helicoides em Biorreatores <i>Airlift</i>	Erro! Indicador não definido.
5.1.2. Retenção gasosa.	Erro! Indicador não definido.
5.1.3. Cultivo biorreator <i>Airlift</i>	Erro! Indicador não definido.
5.2. Biorreator STR	Erro! Indicador não definido.
5.2.1. Meio de alimentação.	Erro! Indicador não definido.
5.3. Cultivo biorreator STR modo Fed-batch.	Erro! Indicador não definido.
6. ConclusÃO	59
7. Perspectivas.	60
Referências	61

1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 1940, biorreatores à base de microrganismos têm sido utilizados para a produção industrial de diversos produtos, como enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos e solventes, além de serem empregados no tratamento de resíduos orgânicos industriais ou domésticos (Liu, 2020; Pawar, 2016; Schmidell *et al.*, 2001). Nesse contexto, a produção por rota biotecnológica assumiu gradualmente um papel central na fabricação industrial desses compostos, substituindo a síntese química tradicional, que apresenta alto custo e frequentemente resulta em produtos contendo impurezas com toxicidade significativa, difíceis de eliminar e prejudiciais ao meio ambiente (Zhang *et al.*, 2021).

Um exemplo notável dessa transição é a produção de riboflavina (RF), que atualmente é sintetizada exclusivamente por rota biotecnológica, utilizando microrganismos como *Bacillus subtilis* (Schwechheimer *et al.*, 2016). As espécies do gênero *Bacillus* têm sido amplamente exploradas para a produção de enzimas, aditivos alimentares, vitaminas, antibióticos e inseticidas. Em comparação com outros microrganismos as espécies de *Bacillus* destacam-se pela capacidade superior de secreção de proteínas. Essa popularidade deve-se a suas propriedades de fermentação vantajosas, como altos rendimentos de produto (20-25 g/L), processos de downstream simplificados, ausência de subprodutos tóxicos e bom crescimento em fontes de carbono de baixo custo (Oztürk *et al.*, 2016).

Devido à alta diversidade, especificidade e demanda dos processos biotecnológicos, diferentes tipos de biorreatores foram projetados para fornecer condições ideais de operação, como pH, temperatura, fornecimento de nutrientes e homogeneização. Atualmente, existem vários tipos de biorreatores com características distintas em relação aos fenômenos de transporte (calor, massa e quantidade de movimento) (Liu, 2020). Entre os modelos mais comuns estão os biorreatores mecanicamente agitados e aerados (STR), colunas de bolhas e os *Airlift*.

O modelo de biorreator mais amplamente utilizado na indústria é o STR, que representa cerca de 90% dos sistemas empregados, devido à sua eficiente transferência de massa e energia. Contudo, os biorreatores STR apresentam algumas desvantagens em relação aos modelos pneumáticos, como alto custo operacional, estrutura complexa (necessidade de selo mecânico), maior risco de contaminação do bioprocessamento, maior consumo energético e elevada taxa de cisalhamento (Badino *et al.*, 2016; Liu, 2020).

Entre os biorreatores *Airlift*, destaca-se o modelo de tubos concêntricos, que possui uma estrutura de circulação interna passível de diversas modificações. Essas modificações incluem alterações na disposição dos tubos e a adição de gás ao espaço anular, ajustando as localizações do riser (zona de ascensão do fluido) e downcomer (zona de descida do fluido). Tais alterações permitem variações significativas nos aspectos operacionais, como a circulação do fluido e a separação do gás (Gumery *et al.*, 2009; Marques; Pinheiro; Rosa, 2007; Michelin *et al.*, 2013; Pawar, 2016).

A geometria do reator, as condições de operação e as propriedades físicas das fases líquida e gasosa exercem uma forte influência sobre o desempenho do reator. Idealmente, um biorreator deve apresentar máxima taxa de transferência de massa, mistura eficiente e consumo mínimo de energia. Esses parâmetros podem ser aprimorados pela adição de promotores de fluxo helicoidais, que otimizam a transferência de oxigênio (Luo *et al.*, 2013).

Além da geometria do reator, o modo de operação é outro fator determinante para a eficiência do processo. Operações no modo fed-batch, por exemplo, são amplamente utilizadas em processos microbianos industriais para alcançar maior concentração de produto, rendimento e produtividade, prevenindo inibições por substrato e repressão catabólica. A principal vantagem do fed-batch é a possibilidade de controlar as concentrações dos substratos no meio, ajustando a taxa de fluxo de alimentação. Assim, o sucesso de um processo fed-batch depende tanto do design do meio quanto do desenvolvimento de uma estratégia de alimentação bem modelada, que favoreça a síntese da biomolécula desejada (Oztürk *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar os efeitos da adição de aletas helicoidais nas regiões do riser e downcomer de um biorreator do tipo *Airlift*, com o intuito de melhorar a transferência de oxigênio. Além disso, foram realizados cultivos de *B. subtilis* para avaliar a melhoria no desempenho do biorreator *Airlift*. Por fim, também foi estudada a produção de RF em um biorreator STR operado no modo fed-batch com alimentação exponencial.

2. REVISÃO DA LITERATURA.

2.1. Biorreatores

Biorreatores são dispositivos projetados para promover reações catalisadas por biocatalisadores, como enzimas ou células vivas, sejam elas

microbianas, animais ou vegetais. Desde a década de 1940, biorreatores baseados em microrganismos têm sido amplamente utilizados na produção industrial de uma variedade de produtos, incluindo enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos e solventes. Além disso, são frequentemente empregados no tratamento de resíduos orgânicos, tanto industriais quanto domésticos (Pawar, 2016; Schmidell *et al.*, 2001; Liu, 2020).

A principal função de um biorreator é fornecer um ambiente controlado e adequado para o crescimento microbiano e a produção de produtos. Diversos fatores precisam ser considerados durante a construção de um biorreator, incluindo geometria, controle de temperatura e pH, iluminação (quando aplicável), manutenção da esterilidade, sistemas de aeração e mistura (quando necessários), eficiência energética e a escolha adequada do tamanho e do material (Mojtaba *et al.*, 2022).

Atualmente, existe uma ampla variedade de biorreatores, cada um com características distintas em relação aos fenômenos de transporte, como transferência de calor, massa e quantidade de movimento (LIU, 2020). Esses modelos são projetados conforme o modo de operação dos bioprocessos industriais e são classificados com base no tipo de biocatalisador utilizado (microrganismos, células ou enzimas) e no modo de operação. Entre os modelos mais comuns, destacam-se os biorreatores de membrana, leito fixo, leito fluidizado, tipo wave e pneumáticos. No entanto, os biorreatores mais amplamente utilizados são os reatores mecanicamente agitados (STR), que representam cerca de 90% dos sistemas industriais (Zhong, 2011; Esperança, 2014).

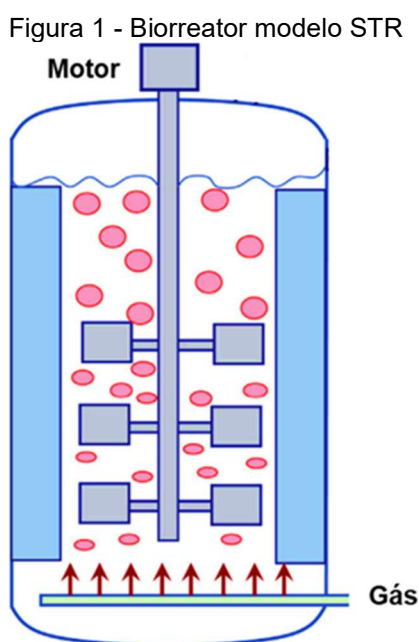
Os biorreatores agitados pneumaticamente, especialmente os modelos *Airlift*, têm um papel de destaque no campo da biotecnologia devido à sua alta eficiência na transferência de massa. Essa caracterização é essencial em reações trifásicas (gás-líquido-sólido), nas quais a mecânica complexa dos fluidos se combina com as características específicas das células (Liu, 2020; Zhang *et al.*, 2017).

Entre os tipos de biorreatores citados, os modelos de leito fixo são frequentemente utilizados em processos que requerem a imobilização de células ou enzimas sobre uma superfície sólida, enquanto os biorreatores de leito fluidizado são ideais para reações que demandam alta transferência de massa entre as fases. O modelo wave, por sua vez, é conhecido por sua aplicação em cultivos celulares delicados, utilizando bolsas descartáveis que minimizam o risco de contaminação.

Essas distinções destacam a importância de selecionar o tipo de biorreator mais adequado às necessidades do processo biotecnológico.

2.1.1. Biorreator mecanicamente agitado e aerado (STR).

O biorreator do tipo STR (Stirred Tank Reactor) é composto por um tanque cilíndrico, cuja relação entre altura e diâmetro geralmente varia entre 2:1 e 3:1. A mistura do meio e a dispersão de bolhas de gás são alcançadas por meio de agitação mecânica, realizada por impelidores acoplados ao eixo central do fermentador. Este processo, no entanto, demanda um alto consumo de energia por unidade de volume. A introdução de gás é feita por aspersores localizados na parte inferior do tanque, que, combinado com a agitação, pode incluir defletores internos para evitar a formação de vórtices no líquido (Doran, 2013). A Figura 1 ilustra o modelo de biorreator STR.



Legenda: Esquema do biorreator STR com adaptações estruturais.

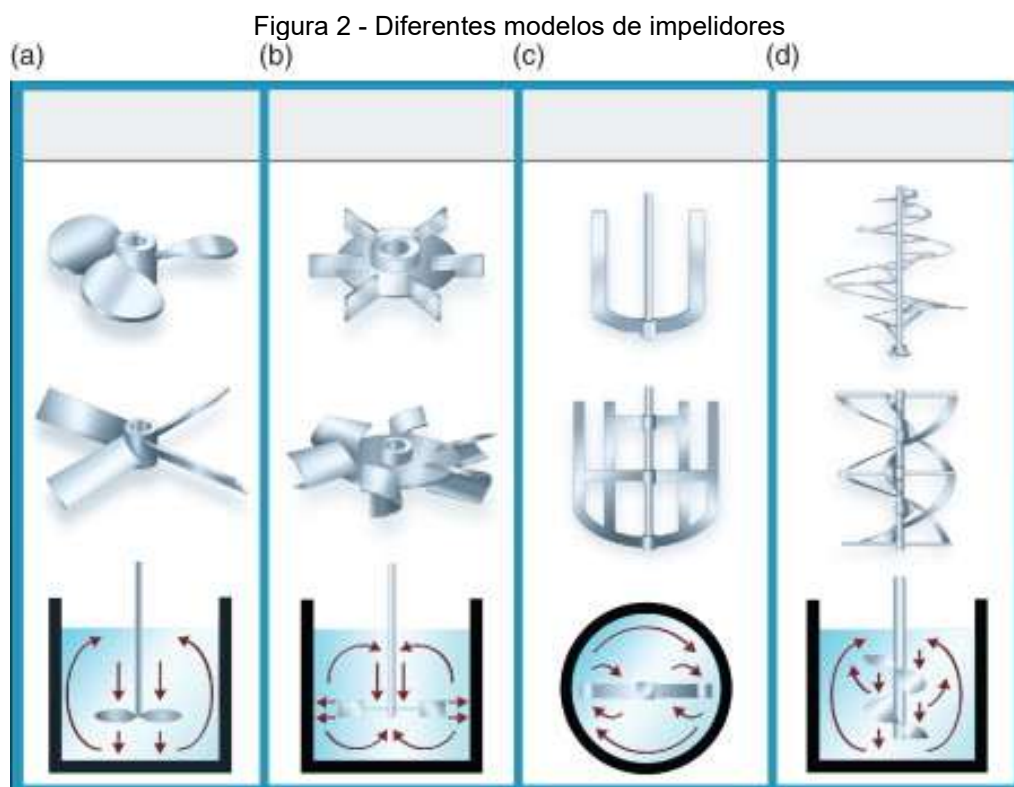
Fonte: Adaptado de Liu (2020)

A homogeneidade no interior do biorreator é um parâmetro crucial. Nos modelos STR, essa homogeneidade é controlada principalmente pelo tipo de impelidor utilizado no sistema. A dispersão do gás, essencial para a transferência de oxigênio para a cultura, é promovida pelo impelidor, que deve proporcionar agitação suficiente para dispersar as bolhas de gás por todo o vaso, aumentando o tempo de residência do gás no líquido. O tempo de residência refere-se ao período que o gás

permanece em contato com o líquido, permitindo maior transferência de massa (Liu, 2020).

No entanto, a velocidade de dispersão do gás precisa ser equilibrada com os possíveis impactos que isso pode causar, como a taxa de cisalhamento. Impelidores de alto cisalhamento são amplamente empregados em sistemas microbianos, onde o crescimento exige altas taxas de transferência de massa. Por outro lado, em culturas de células animais e vegetais, um ambiente de alto cisalhamento pode ser prejudicial, pois essas células são mais sensíveis a esse tipo de força (Garcia e Gomez, 2009; Ribeiro, 2017).

Existem vários tipos de impelidores disponíveis, e a escolha adequada, aliada à facilidade de aumento de escala, boa mistura e alta taxa de transferência de massa, é o que torna o biorreator STR o modelo mais amplamente utilizado na indústria (Stuani, 2015). Entre os principais modelos de impelidores utilizados nesse tipo de reator, destaca-se a turbina de 6 pás planas com disco, também conhecida como turbina "Rushton", que é amplamente aplicada em processos fermentativos (Schmidell *et al.*, 2001). A Figura 2 apresenta diferentes modelos de impelidores e seus impactos nos padrões de fluxo dentro do reator.



Legenda: (a) Hélice marinha e pás inclinadas (fluxo axial); (b) Rushton e Smith (fluxo radial); (c) Âncora (fluxo tangencial); e (d) Helicoidal (fluxo axial).

Fonte: Adaptado de Garcia-Ochoa *et al.* (2011)

Os padrões de fluxo descritos na Figura 2 têm influência direta na eficiência do processo.

O fluxo Axial é caracterizado pelo movimento vertical do fluido, seja ascendendo ou descendendo no tanque. Esse tipo de fluxo é promovido por impelidores como hélices e helicoidais. O fluxo axial é ideal para dispersão uniforme de gás e circulação eficiente em tanques de grande volume, sendo especialmente vantajoso para culturas delicadas, pois evita forças de cisalhamento elevadas que poderiam danificar células sensíveis.

O fluxo Radial ocorre horizontalmente a partir do impelidor, espalhando o fluido perpendicularmente ao eixo de rotação. Impelidores como as turbinas Rushton e Smith são projetados para gerar esse tipo de fluxo, promovendo uma mistura vigorosa e eficiente. O fluxo radial é amplamente utilizado em processos microbianos que demandam altos níveis de oxigênio.

O Fluxo Tangencial é associado ao movimento circular do fluido ao longo da parede interna do tanque, é promovido por impelidores do tipo âncora. Esse tipo de fluxo é adequado para misturar materiais de alta viscosidade, como fluidos densos ou substâncias sensíveis, pois minimiza as forças de cisalhamento enquanto garante uma mistura uniforme.

A seleção do tipo de fluxo adequado depende diretamente das características do bioprocessos, como o tipo de cultura utilizada e as propriedades físicas do meio.

2.1.2. Biorreator *Airlift*.

Os biorreatores pneumáticos apresentam diversas vantagens em relação ao modelo STR, como baixo custo de operação, estrutura simples (ausência de selo mecânico), menor possibilidade de contaminação do bioprocessos, maior eficiência energética e forças de cisalhamento reduzidas. Essas características tornam os biorreatores pneumáticos ideais para processos que utilizam células ou microrganismos, uma vez que taxas elevadas de cisalhamento podem afetá-los de forma irreversível, promovendo alterações morfológicas, produção de compostos indesejáveis, redução na síntese do bioproduto de interesse ou até mesmo a morte celular (Badino *et al.*, 2016; Liu, 2020).

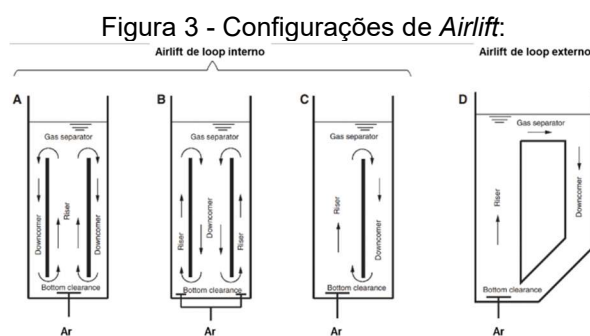
Dentre os biorreatores agitados pneumaticamente, o *Airlift* se destaca por sua ampla aplicação em áreas como engenharia de reação química (Pawar, 2016), fermentação microbiana (Michelin *et al.*, 2013) e tratamento de efluentes (Marques *et al.*, 2007). Os biorreatores *Airlift* possuem um padrão de escoamento cíclico do fluido, que ocorre devido à sua configuração geométrica projetada para esse propósito (Esperança, 2014). As principais regiões do biorreator *Airlift* são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Regiões em *Airlift*.

Região	Descrição
<i>Riser</i>	Corresponde à região na qual o gás é borbulhado, fazendo o fluido escoar de forma ascendente.
<i>Downcomer</i>	Região paralela ao <i>Riser</i> , onde o fluido escoar de forma descendente.
Mistura / Separação do gás	Conexão no topo do biorreator entre o <i>Riser</i> e o <i>Downcomer</i> .
Base	Conexão no fundo do biorreator entre o <i>Riser</i> e o <i>Downcomer</i> .

Fonte: Adaptado de Esperança (2014)

Os biorreatores *Airlift* podem ser classificados em dois principais tipos: *Airlift* de circulação interna e *Airlift* de circulação externa. A diferença entre eles está na localização do *Riser* e do *Downcomer*. No *Airlift* de circulação interna, ambas as regiões estão dentro da mesma coluna, enquanto no *Airlift* de circulação externa elas estão localizadas em diferentes tubos (Cozma, 2010). A Figura 3 apresenta diferentes configurações do biorreator *Airlift*.



Legenda: (A) Loop Interno; (B) Loop Interno Inverso; (C) Loop Interno de Placa Dividida; (D) Loop Externo.

Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2019)

A estrutura do *Airlift* de circulação interna permite diversas modificações estruturais, como a disposição dos tubos e a adição de gás ao espaço anular, que altera o local do Riser e do Downcomer. Essas modificações permitem variar parâmetros operacionais, como a circulação do fluido e a separação do gás (Gumery *et al.*, 2009). A força motriz do processo está na diferença de retenção de gás entre o Riser e o Downcomer. Essa diferença de pressão faz com que o fluido entre em movimento, mantendo a circulação do líquido dentro do sistema (Wadaugsorn *et al.*, 2016).

O desempenho de um biorreator *Airlift* pode ser descrito por seu comportamento hidrodinâmico e características de mistura. Os parâmetros mais relevantes incluem o coeficiente de transferência de massa, retenção gasosa, velocidade superficial do gás e do líquido, tempo de mistura e circulação, taxa de cisalhamento, coeficiente de dispersão axial e diâmetro de bolhas (Cerri, 2009; Huang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008). Esses parâmetros hidrodinâmicos dependem diretamente das condições operacionais, como vazão de ar, tipo de aspersor de gás e propriedades geométricas do biorreator, incluindo o diâmetro do Downcomer, a razão entre as áreas seccionais do Downcomer e do Riser (A_D/A_R) e o uso de promotores de escoamento (Cerri *et al.*, 2016; Wadaugsorn *et al.*, 2016).

2.2. Vitamina B2.

A riboflavina (RF), também conhecida como vitamina B2, Lactoflavina ou vitamina G, é um sólido microcristalino de cor amarelo-alaranjada, com sabor amargo e inodoro. Apresenta estabilidade em meios ácidos, mas se decompõe rapidamente em ambientes alcalinos e na presença de luz. A decomposição térmica da RF ocorre entre 278 e 282 °C. A análise de absorbância de soluções aquosas de RF pode ser realizada em comprimentos de onda de 223, 266, 373 e 445 nm (Abbas *et al.*, 2011). Embora seja higroscópica, a RF possui baixa solubilidade em água e etanol, com solubilidades de 100 a 130 mg/L e 45 mg/L à temperatura ambiente. Sua solubilidade é ainda menor em álcoois alílicos e benzílicos, acetato de amila e fenol, sendo praticamente insolúvel em éter, clorofórmio e acetona (O'NEIL, 2006; SILVA *et al.*, 2005). A Figura 4 ilustra apresenta uma amostra de RF obtida de um cultivo por *B. subtilis*.

Figura 4 - Amostra de RF de cultivo em biorreator.



Fonte: Autor (2025)

2.2.1. Funções Biológicas

A RF pode ser sintetizada por plantas e microrganismos, entretanto, em humanos e outros animais é um componente essencial da dieta, pois não há uma via biossintética endógena. Ela desempenha um papel crucial em múltiplas funções celulares, servindo como precursora das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), que estão envolvidas em processos metabólicos oxidativos, entre outros (Abbas; Sibirny, 2011).

A ingestão diária recomendada de RF é de 1,3 mg para homens e 1,1 mg para mulheres, obtida principalmente através do consumo de carnes, produtos lácteos, ovos e vegetais de folhas verdes. A deficiência de RF pode causar problemas de saúde, como aumento do risco de doenças cardiovasculares, prejuízo no metabolismo do ferro e distúrbios oculares (Abbas; Sibirny, 2011).

2.2.2. Aplicações Industriais

Nas últimas décadas, o interesse pela RF cresceu significativamente, tornando-a um dos produtos mais importantes da biotecnologia, com aplicações nas indústrias de alimentos, saúde e cosméticos. No mercado industrial de RF, cerca de 70% é utilizado como aditivo alimentar para nutrição animal, enquanto os outros 30% são aplicados nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Exemplos incluem a adição a alimentos processados à base de cereais, alimentos infantis, uso como corante em alimentos e bebidas, além de aplicações na medicina e veterinária, onde atua como

substância farmacológica ativa para o tratamento de doenças. Também é utilizada como corante em produtos cosméticos (Averianova *et al.*, 2020; Schwechheimer *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021).

Um estudo de mercado sobre a RF, contendo projeções de crescimento, tendências, impacto da COVID-19 e previsões para o período de 2021-2026, estima uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 4,5%. Esse crescimento é impulsionado pelo aumento da demanda por suplementos à base de RF devido à sua versatilidade, tornando-a amplamente utilizada em diversos setores globais. Além disso, a RF desempenha um papel importante na indústria de ração animal como promotora de crescimento (Mordor intelligence, 2021).

Apesar das projeções de crescimento global, países da América do Sul, como o Brasil, representam uma pequena parcela do mercado de RF em comparação com regiões como Europa, Ásia e América do Norte, que lideram a produção e consumo da vitamina. Isso se deve à rápida urbanização e industrialização dessas regiões, combinadas com investimentos significativos em desenvolvimento de produtos e inovações tecnológicas. Esse cenário reforça a necessidade de estudos focados no desenvolvimento e inovação tecnológica nacional, como a otimização e melhoria da operacionalidade de biorreatores.

2.3. *Bacillus subtilis*.

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva em forma de bastonete, reconhecida por sua capacidade de formar endósporos, o que lhe confere resistência a condições ambientais extremas, como calor e dessecação (Härtig & Jahn, 2012). Inicialmente descrita como *Vibrio subtilis* por Christian Gottfried Ehrenberg em 1835, foi renomeada para *Bacillus subtilis* por Ferdinand Cohn em 1872 (Kovács, 2019). Este microrganismo é um dos mais bem caracterizados entre as bactérias Gram-positivas e frequentemente utilizado como modelo em estudos de diferenciação e desenvolvimento celular (Aizawa, 2014).

Dentro do gênero *Bacillus*, o *Bacillus subtilis* destaca-se por sua competência natural em captar DNA extracelular, facilitando sua modificação genética e a esporulação. Os esporos dormentes dessa bactéria são altamente resistentes a condições extremas, incluindo altas temperaturas, dessecação, radiação UV e γ , além de ambientes hostis, como condições extraterrestres. Essa robustez permite que *B. subtilis* seja isolado de diversos ambientes, como solos e habitats marinhos, sendo

amplamente empregado em aplicações como produção de enzimas, fermentação de alimentos e controle biológico de plantas (Kovács, 2019).

Comparado a outros microrganismos, as espécies de *Bacillus* Gram-positivas são conhecidas por sua excepcional capacidade de secreção de proteínas. Seu crescimento eficiente em fontes de carbono de baixo custo, metabolismo versátil e robustez em fermentações industriais tornam essas espécies uma escolha preferencial para a produção industrial de uma ampla gama de produtos (GU *et al.*, 2018).

2.3.1. Produção de Riboflavina por *Bacillus subtilis*

O *Bacillus subtilis* tem sido amplamente utilizado na indústria biotecnológica. Atualmente, a produção de RF utilizando *B. subtilis* é um dos métodos mais competitivos no mercado (SHI *et al.*, 2009). No passado, a RF era produzida predominantemente por processos químicos, mas os avanços biotecnológicos levaram à substituição desse método por processos baseados em microrganismos, como *Bacillus subtilis* (Silva *et al.*, 2005).

Esse progresso foi amplamente impulsionado pelo uso de engenharia metabólica, que emprega tecnologia de DNA recombinante para otimizar vias metabólicas e biossintéticas. Essa abordagem permite ajustar características do microrganismo, maximizando a produção do bioproduto desejado e aprimorando o desempenho dos processos comerciais (Zamboni *et al.*, 2003). A Tabela 2 apresenta as condições operacionais e rendimentos obtidos em diferentes estudos sobre a produção de RF com *Bacillus subtilis*.

Tabela 2 - Produção de RF por *Bacillus subtilis* e seus parâmetros operacionais.

Microrganismo	Condições de operação	Produção	Referência
<i>B. subtilis</i> modificado	Quimiostato / Fed-batch / 600 a 1500 rpm / 1,5 vvm / pH 6,6 / 37°C / 45h	0,08 g/L	SAUER <i>et al.</i> , 1996
	Biorreator STR / Batelada / 700 rpm / 0,5 vvm / pH 7,5 / 34°C / 72h	1,05 g/L	USUI; YAMAMOTO; NAKAMATU, 1997
	Biorreator STR / Fed-batch / 1100 rpm / 0,6 vvm / pH 6,5 – 7,2 / 37°C / 42h	12,4 g/L	DEBABOV <i>et al.</i> , 1997
	Biorreator STR / Fed-batch / 1000 rpm / 1 a 1,5 vvm / pH 6,8 / 39°C / 56h	4 – 15 g/L	PERKINS <i>et al.</i> , 1999
	Biorreator STR / Fed-batch / 800 rpm / 1 vvm / pH 7,2 – 7,4 / 37°C / 90h	26,8 g/L	LEE <i>et al.</i> , 2004a
	Biorreator STR / Fed-batch / 850 rpm / 1,1 vvm / pH 7,2 / 41°C / 48h	16,36 g/L	WU <i>et al.</i> , 2007
	Biorreator STR / Fed-batch / 600 - 900 rpm / 1,3 vvm / pH 6,9 / 40°C / 48h	9,4 g/L	MAN <i>et al.</i> , 2014
<i>B. subtilis</i> selvagem	-	2 – 7 g/L	Xu <i>et al.</i> , 2022
	Shaker de agitação / 200 rpm / pH 6,5 / 30°C / 72h	0,274 g/L	HEMIDA ABD-ALLA <i>et al.</i> , 2016
	Shaker de agitação / 200 rpm / pH - / 30°C / 72h	0,0117 g/L	ORAEI; RAZAVI; KHODAIYAN, 2018

Fonte: Autor (2025)

2.4. Demanda e transferência de oxigênio em bioprocessos

Entre os processos biotecnológicos de interesse industrial que envolvem o cultivo de células microbianas, os processos conduzidos em aerobiose se destacam significativamente. A produção de antibióticos, enzimas, vitaminas, fermentos, inoculantes e proteínas recombinantes, como hormônios de crescimento e insulina, é amplamente realizada por meio de processos aeróbicos. Da mesma forma, o cultivo de células animais, seja para a produção de produtos ou para posterior infecção por vírus na obtenção de vacinas, também envolve processos aeróbicos (Schmidell *et al.*, 2001).

O oxigênio é um elemento essencial em processos aeróbicos, mas apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, ou seja, a "capacidade de armazenamento" de oxigênio na água é limitada (7–8 mg/L entre 25–35 °C a 0,209 atm). Sendo indispensável manter uma transferência contínua de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, para garantir a viabilidade do metabolismo celular (Badino *et al.*, 2016; Schmidell *et al.*, 2001).

Temperatura (°C)	Solubilidade do O ₂ (mmol L ⁻¹)
0	2,18
10	1,70
15	1,54
20	1,38
25	1,36
30	1,16
40	1,03

Fonte: adaptado de Nielsen e Villadsen (2011).

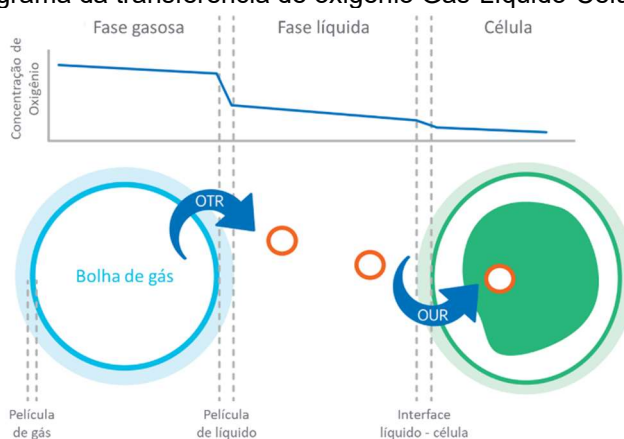
O transporte de oxigênio em bioprocessos pode ser descrito por basicamente dois parâmetros fundamentais. Sendo a taxa de transferência de oxigênio (OTR) e taxa de consumo de oxigênio (OUR).

O OTR é a velocidade de transferência de oxigênio da fase gasosa para o líquido, ele depende diretamente do k_{La} . Já o OUR representa a quantidade de oxigênio utilizada pelos microrganismos para metabolismo e crescimento. (Garcia-Ochoa *et al.*, 2010). A relação entre esses parâmetros é fundamental para o controle

de bioprocessos aeróbicos. Durante a fermentação, a OTR deve superar ou igualar a OUR para garantir a disponibilidade de oxigênio suficiente para o crescimento celular e a produção de metabólitos desejados.

Os processos fermentativos aeróbicos exigem um dimensionamento adequado do sistema de transferência de oxigênio, pois este é um substrato chave para o crescimento, produção e manutenção dos microrganismos. A concentração de oxigênio dissolvido no meio depende da OTR e da OUR (Wang *et al.*, 2007). A Figura 5 ilustra as etapas de transferência de oxigênio desde a bolha de gás até a célula, destacando as resistências envolvidas.

Figura 5 - Diagrama da transferência de oxigênio Gás-Líquido-Célula



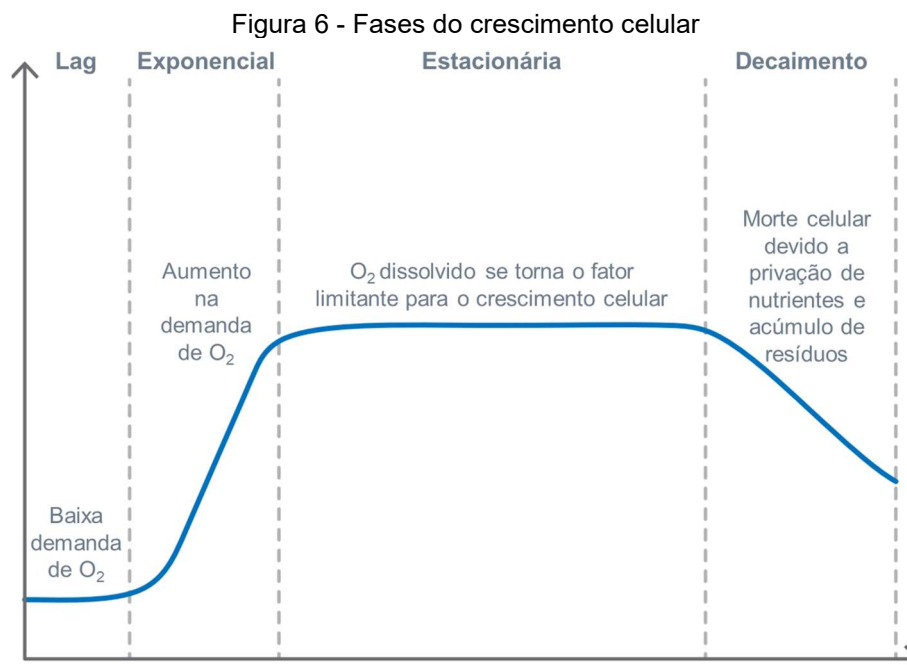
Fonte: Adaptado de Cytiva (2020)

O transporte de oxigênio da fase gasosa para o interior da célula ocorre em várias etapas:

1. Difusão do O_2 da bolha de gás para a interface gás-líquido.
2. Transporte do O_2 através da interface gás-líquido.
3. Difusão do O_2 através de uma região de líquido estagnado adjacente à bolha de gás
4. Transporte do O_2 dissolvido no líquido até a célula.
5. Difusão do O_2 através da camada de líquido estagnado ao redor da célula.
6. Transporte do O_2 através da membrana celular.
7. Transporte do O_2 dissolvido dentro da célula até o local da reação intracelular.

Durante o processo fermentativo, a OUR é inicialmente baixa devido à baixa densidade celular. No entanto, à medida que a densidade celular aumenta, o OUR cresce até que a OTR se torne o fator limitante, por apresentar a maior

resistência no processo de transferência de oxigênio (CYTIVA, 2020). A Figura 6 ilustra as fases de crescimento microbiano padrão, evidenciando as variações na demanda de oxigênio.



Fonte: Adaptado de Cytiva (2020)

A taxa de OTR está diretamente relacionada ao coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigênio (k_La), cujo valor depende de fatores como as propriedades físicas do fluido (densidade, tensão superficial e comportamento reológico), a morfologia e concentração celular, além do modelo e geometria do biorreator e das condições operacionais (como velocidade de agitação e taxa de fluxo de ar). Portanto, a consideração do k_La é fundamental no projeto e na caracterização de biorreatores utilizados em bioprocessos, sendo um parâmetro-chave para assegurar uma transferência de oxigênio eficiente (Mestre *et al.*, 2019).

2.4.1. Taxa de Consumo de Oxigênio (OUR)

A sigla OUR vem de "Oxygen Uptake Rate", como abordado anteriormente este é um parâmetro que quantifica a taxa de consumo de oxigênio pelos microrganismos em uma determinada condição de cultivo. Essa taxa está diretamente relacionada à atividade metabólica das células e é um dos principais determinantes do desempenho de bioprocessos industriais.

O OUR é influenciado por uma combinação de fatores biológicos, físico-químicos e operacionais. Cada organismo apresenta uma taxa específica de consumo de oxigênio (Q_O), que varia com base em seu metabolismo e na fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Por exemplo, microrganismos com metabolismos mais intensos, como *Bacillus subtilis* em condições de alta taxa de crescimento, apresentam valores elevados de OUR (Wang e Zhong, 2007). A expressão básica que relaciona a OUR é dada pela equação 1:

$$\text{OUR} = Q_{O_2} * X \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

Q_{O_2} : Taxa específica de consumo de oxigênio (mmol O_2 /g biomassa/h);

X: Concentração de biomassa (g/L).

A limitação de nutrientes essenciais pode reduzir a atividade metabólica e, consequentemente, a OUR. Fatores como temperatura, pH e tensão de oxigênio no meio também impactam significativamente a OUR (Vanags & Suleiko, 2022)

O OUR é um indicador crítico do estado metabólico das células e desempenha um papel central no projeto e operação de biorreatores. Durante a fase de crescimento exponencial, a OUR tende a aumentar conforme a densidade celular cresce, até que a taxa de transferência de oxigênio (OTR) se torne limitante. A relação entre OTR e OUR é essencial para evitar condições de hipóxia, que podem levar à redução da produtividade ou à morte celular (Wang e Zhong, 2007).

O projeto de biorreatores deve garantir que a OTR seja sempre superior à OUR, especialmente em processos que exigem alta densidade celular. Além disso, é fundamental considerar o efeito da OUR na demanda de oxigênio para otimizar condições operacionais, como taxa de aeração, frequência de agitação e geometria do biorreator (Vanags & Suleiko, 2022).

2.4.2. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$).

A taxa de transferência de oxigênio em um biorreator depende do coeficiente de transferência da massa do líquido, k_L , da área total superficial específica disponível para transferência de massa, a , e da força motriz em termos de concentrações. Como os dois parâmetros, k_L e a , não podem ser medidos facilmente

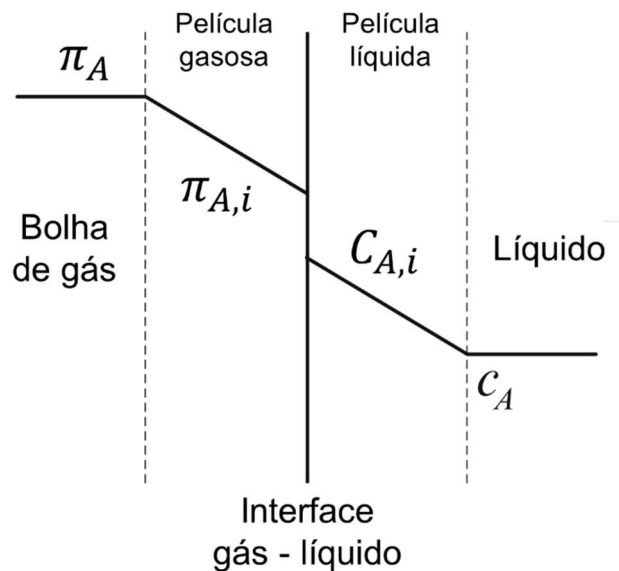
individualmente, eles são geralmente agrupados como um único parâmetro, chamado coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, $k_L a$ (Garcia-Ochoa, *et al.* 2010).

A taxa volumétrica de transferência de massa de oxigênio ($q_{O_2}^t$), pode ser quantitativamente descrita como o produto de um coeficiente de transferência de massa volumétrica ($k_L a$) e uma força motriz, sendo a diferença da concentração de saturação do O_2 ($c_{O_2}^*$) e a concentração real do componente na fase líquida (c_{O_2}).

$$q_{O_2}^t = k_L a (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \quad \text{Equação 2}$$

A transferência de massa gás-líquido é normalmente modelada pela teoria de dois filmes como mostra a Figura 7, que foi introduzido por (WHITMAN W. G., 1923).

Figura 7 - Perfis de concentração em película gás – líquido para a transferência de um composto gasoso A em fase líquida



Fonte: Adaptado de Nielsen e Villadsen (2011)

O fluxo J_A do composto A através dos dois filmes é descrito como o produto da diferença de concentração através da camada de filme, ou seja, uma força motriz linear e um coeficiente de transferência de massa (k_G). Assim, o fluxo através do filme de gás é dado por:

$$J_{A,g} = k_G (\pi_A - \pi_{A,i}) \quad \text{Equação 3}$$

π_A é a pressão parcial do composto A na bolha de gás, e $\pi_{A,i}$ é a pressão parcial na bolha de gás que corresponde a concentração de equilíbrio ($C_{A,i}$), de A na interface gás-líquido.

Da mesma forma, para o fluxo através do filme líquido:

$$J_{A,l} = k_L(C_{A,i} - C_A) \quad \text{Equação 4}$$

Em meios de cultivo aquosos diluídos, as concentrações de equilíbrio de ambos os lados da interface gás-líquido podem ser relacionadas entre si pela lei de Henry:

$$\pi_{A,i} = H_A C_{A,i} \quad \text{Equação 5}$$

H_A é a constante de Henry para o composto A (atm L mol⁻¹).

Uma vez que as concentrações interfaciais não são mensuráveis diretamente, especificamos o fluxo total do componente A da bolha de gás para a fase líquida como um coeficiente de transferência de massa geral multiplicado pela força motriz na fase líquida:

$$J_A = K_l(C_A^* - C_A) \quad \text{Equação 6}$$

C_A^* é a concentração de saturação no líquido correspondente a fase gasosa:

$$C_A^* = \frac{\pi_A}{H_A} \quad \text{Equação 7}$$

Em estado estacionário, $J_{A,g} = J_{A,l} = J_A$ e inserindo as equações 5 e 7 na equação 3, obtemos:

$$\frac{1}{K_l} = \frac{1}{H_A k_G} + \frac{1}{k_L} \quad \text{Equação 8}$$

Devido ao alto valor da constante da lei de Henry (H_A) a resistência na transferência de massa na fase gasosa é desprezível comparada a da fase líquida, com isso o coeficiente de transporte (K_l) é, portanto, aproximadamente igual ao coeficiente de transporte da película do líquido (k_L). Para encontrar a taxa de transferência de massa do composto A por unidade de volume do reator, ou seja, a taxa de transferência de massa volumétrica (q_A^t), multiplicamos o fluxo total (J_A) pela área interfacial gás-líquido por unidade de volume (a). Portanto:

$$q_A^t = J_A a = k_L a (C_A^* - C_A) \quad \text{Equação 9}$$

Para modelos em que a transferência de oxigênio não se encontra no estado estacionário, a variação da concentração de oxigênio no meio líquido é dada por:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_A^* - C_A) \quad \text{Equação 10}$$

É importante ressaltar que as propriedades do fluido e o método empregado para determinar o valor de $k_L a$ figuram entre os principais fatores que

afetam a transferência de oxigênio para às células, bem como a eficiência da mistura (CYTIVA, 2020).

2.4.3. Métodos para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}).

Existem diversos métodos para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), cada um com características específicas que devem ser consideradas dependendo das condições experimentais e do tipo de bioprocessamento em estudo. Esses métodos podem ser amplamente classificados em químicos e físicos, com vantagens e limitações distintas.

Os métodos químicos foram os primeiros amplamente aceitos para a determinação do k_{La} , mas apresentam limitações significativas. Esses métodos alteram as propriedades físico-químicas do meio líquido, como a coalescência, devido à adição de produtos químicos. Isso pode levar à superestimação dos valores de k_{La} , uma vez que as reações químicas rápidas na fase líquida aumentam a taxa de absorção de oxigênio, caso as condições experimentais não sejam rigorosamente controladas (Garcia-Ochoa e Gomez, 2009).

Um método químico tradicional é o método do sulfito, que utiliza a reação de oxidação do sulfito (SO_3^{2-}) em sulfato (SO_4^{2-}) pelo oxigênio



Essa reação é catalisada por íons metálicos, sendo comum a adição de uma quantidade conhecida de cobre ou um sal de cobalto ao meio, o que torna a reação quase instantânea. Nesse contexto, a taxa de consumo do sulfito passa a ser determinada exclusivamente pela taxa de transferência de oxigênio da fase gasosa. O método do sulfito era amplamente utilizado por ser relativamente simples de implementar. Contudo, apresenta várias limitações.

Uma das principais desvantagens é que a oxidação do sulfito pode intensificar a absorção de oxigênio, uma vez que a rápida reação química pode ocorrer não apenas no interior do líquido, mas também na superfície da película gás-líquido. Assim, a suposição de um perfil de concentração linear na película torna-se questionável. Além disso, a redução significativa da coalescência das bolhas resulta em uma área interfacial específica mais elevada, o que também afeta os resultados.

Isso leva a uma superestimativa do k_{La} em relação ao que seria observado em um meio de fermentação normal. O que representa uma limitação significativa do

método. Outra desvantagem prática é que o método do sulfito não pode ser aplicado durante uma fermentação real (Nielsen e Villadsen, 2011).

Já os métodos físicos se destacam por não alterarem as propriedades do meio e se basearem em medições diretas de oxigênio dissolvido. Esses métodos utilizam sondas de oxigênio para monitorar alterações na concentração de oxigênio em condições não estacionárias (Garcia-Ochoa e Gomez, 2009).

O modelo *gassing-out* é um método físico que tem sido amplamente utilizada para medições da transferência de oxigênio em biorreatores, devido à sua simplicidade. Nesta técnica o oxigênio dissolvido é removido da fase líquida através do borbulhando de nitrogênio, até que a concentração de oxigênio na fase líquida chegue a zero. Ar ou oxigênio é então introduzido novamente, e a mudança (aumento) na concentração de oxigênio no líquido é medida através da utilização de um eletrodo. A Equação 12 descreve a relação teórica entre a concentração de oxigênio e o tempo, assumindo que k_La permanece constante. Nessa expressão, C_A é a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida e C_A^* é a concentração de saturação do oxigênio nessa fase (CERRI *et al.* 2016).

$$\ln\left(1 - \frac{C_A}{C_A^*}\right) = -k_La * t \quad \text{Equação 12}$$

O valor de k_La pode, portanto, ser determinado a partir da inclinação do gráfico $\ln\left(1 - \frac{C_A}{C_A^*}\right)$ pelo tempo. Devido à sua simplicidade, essa técnica é bastante vantajosa para estudar a influência das condições operacionais sobre o k_La . No entanto, é necessário levar em consideração o fato de que o atraso do eletrodo pode causar erros na determinação do k_La . Entretanto, já existe uma alternativa para esse problema, uma metodologia que permite determinar simultaneamente o valor do k_La junto com a sensibilidade do eletrodo a partir de dados da concentração de oxigênio dissolvido como uma função do tempo, sem a necessidade de experimentos adicionais foi desenvolvida por Cerri *et al.*, 2016. Tornando o procedimento mais rápido e mais simples.

2.5. Retenção gasosa.

A retenção gasosa refere-se à fração de gás presente na dispersão gás-líquido durante o processo de aeração em um biorreator. A retenção gasosa global (ε_G) é a medida do gás disperso em todo o volume do biorreator (CHISTI *et al.*, 1990).

Em biorreatores do tipo *Airlift*, a retenção gasosa é um parâmetro fundamental devido à sua influência direta no processo. Ela atua como força motriz para a circulação do sistema, resultado da diferença na retenção gasosa entre as seções de riser e downcomer. Além disso, está diretamente relacionada à área interfacial gás-líquido (a), um dos fatores críticos para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_La).

Maiores valores de retenção gasosa aumentam o tempo de contato para a transferência de massa, o que melhora a eficiência global do processo. Estudos mostram que ajustes na retenção gasosa podem ser empregados como estratégias para otimizar o desempenho de biorreatores *Airlift* (Chisti e Moo-Young, 1988; Gumery *et al.*, 2009; Cerri, Marcel Otavio, 2009).

2.6. Promotores de escoamento.

Os promotores de escoamento têm desempenhado um papel essencial na otimização da hidrodinâmica e na melhoria da eficiência de biorreatores. Esses dispositivos modificam a dinâmica do fluxo no interior dos reatores, promovendo alterações na direção do movimento do líquido e no comportamento das bolhas de gás. O k_La é diretamente influenciado pelo tamanho das bolhas e pelo tempo de retenção do gás, pois ambos impactam a área de superfície específica da interface gás-líquido (Grace *et al.*, 1978; Guo *et al.*, 2016; Liu, Jingru *et al.*, 2014).

A utilização de promotores de fluxo helicoidal é uma abordagem eficiente para otimizar esses parâmetros, uma vez que essa geometria pode transformar o fluxo do líquido de axial para angular, prolongando o tempo de retenção do gás e melhorando a distribuição das bolhas (Merchuk e Ben-Zvi(Yona), 1992; Räsänen *et al.*, 2016; Sanjari *et al.*, 2014). Além disso, os promotores helicoidais aumentam a capacidade de fluidização de partículas sólidas, contribuindo para maior homogeneidade no sistema (Schlötterburg *et al.*, 1999).

Estudar novas geometrias e configurações de reatores é fundamental para caracterizar e prever esses parâmetros, permitindo uma compreensão mais abrangente do sistema (Räsänen *et al.*, 2016). Zheng *et al.* (2018) avaliaram a instalação de placas helicoidais em um biorreator *Airlift*, onde nove helicoides com diferentes combinações geométricas foram fixados no riser. Utilizando um intervalo de velocidade superficial do gás (U_{gs}) de 0,009 a 0,09 m/s, os autores concluíram que

esses promotores de escoamento intensificaram a retenção gasosa e a transferência de oxigênio em todos os testes com a adição dos helicoides.

Räsänen *et al.* (2016) adicionaram tubos helicoidais às regiões de riser e/ou downcomer de um biorreator *Airlift* e observaram que os valores de transferência de oxigênio foram três vezes maiores em comparação com testes sem a adição desses promotores. O aumento do k_{LA} foi atribuído à formação de bolhas menores devido à presença das hélices em ambas as regiões, sendo a transferência de massa ainda mais acentuada ao utilizar hélices situadas na região do downcomer. Essa nova configuração mostrou-se altamente eficiente em termos energéticos, melhorando a hidrodinâmica do biorreator e reduzindo os custos operacionais.

Särkelä *et al.* (2019) estudaram um biorreator *Airlift* com tubos helicoidais acoplados ao riser, downcomer ou ambos, que atuavam como promotores de fluxo e aspersores de gás adicionais. Eles verificaram que esses helicoides geraram bolhas finamente pulverizadas, melhorando o desempenho da transferência de oxigênio. Também observaram que a introdução de ar através do promotor de fluxo helicoidal na zona de descida prolongou o tempo de circulação, mas reduziu o tempo de mistura.

O uso de promotores de escoamento tem sido aplicado em diferentes configurações de biorreatores *Airlift* com o objetivo de melhorar a transferência de massa, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Revisão dos estudos em reatores *Airlift* com inclusão de promotores de escoamento.

Promotores	Referência
Anéis Pall de aço inoxidável	(Gopal e Sharma, 1982)
Misturador estático Kenics de 180°	(Stejskal e Potůček, 1985)
Misturador estático	(Gaspillo e Goto, 1991)
Tampas defletoras, placas de peneira	(Zhao <i>et al.</i> , 1994)
3 placas defletoras perfuradas	(Vorapongsathorn <i>et al.</i> , 2001)
Placas perfuradas	(Krichnavaruk e Pavasant, 2002)
2 impelidores mecanicamente agitados	(Chisti e Jauregul-Haza, 2002)
Pratos perfurados	(Michelin <i>et al.</i> , 2013)
Auto agitado	(Tekić <i>et al.</i> , 2014)
Hélice	(Räsänen <i>et al.</i> , 2016)

Auto agitado	(Lukić <i>et al.</i> , 2017)
Placas de peneira helicoidal	(Zheng <i>et al.</i> , 2018)
Helicoidal	(Särkelä <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: Autor (2025)

Embora haja na literatura diversos estudos acerca da adição de helicoides em biorreatores *Airlift*, ainda é pouco discutido os efeitos gerados pela modificação geométrica desses promotores de escoamento em processos biotecnológicos.

2.7. Fed-batch

As operações em Fed-batch são amplamente utilizadas em processos microbianos industriais, sendo reconhecidas por sua eficiência em aumentar a concentração de produto, rendimento e produtividade. Essas operações também evitam a inibição pelo substrato e a repressão catabólica. A principal vantagem desse modo de operação é o controle preciso das concentrações de substratos no meio de cultivo, alcançado pela modulação da taxa de fluxo de alimentação. O sucesso de um processo em Fed-batch depende tanto do design adequado do meio quanto do desenvolvimento de uma estratégia de alimentação bem modelada que favoreça a síntese da biomolécula desejada (Oztürk *et al.*, 2016).

As estratégias de alimentação em Fed-batch podem ser divididas em operações com e sem feedback, como descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros e estratégias de alimentação para o modo Fed-batch.

Operações sem feedback	
Pulso	Pulsos de substrato são introduzidos para que o mesmo não seja completamente consumido.
Constante	O substrato é alimentado a uma taxa constante predeterminada.
Exponencial	O substrato é alimentado com base na taxa de crescimento exponencial celular.
Linear	Os substratos são alimentados com uma taxa de fluxo volumétrica predeterminada.
Operações com feedback	

Direto	A concentração de substrato no biorreator é monitorada e mantida na faixa predeterminada, controlando sua alimentação de forma direta.
Indireto	A alimentação do substrato é baseada na alteração de parâmetros físicos como pH, concentração de oxigênio dissolvido (DO), Taxa de saída CO ₂ entre outros.

Fonte: Autor (2025)

3. OBJETIVO

O objetivo principal deste projeto foi aumentar a produção de riboflavina (RF) por *Bacillus subtilis* utilizando diferentes configurações de biorreatores. Para alcançar esse objetivo, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolver um modelo de promotor de escoamento helicoidal para o biorreator *Airlift*, visando aprimorar a taxa de transferência de oxigênio no sistema, promovendo melhorias nos parâmetros hidrodinâmicos e, como consequência, aumentando a eficiência na produção de riboflavina.
- Realizar cultivos em modo Fed-batch no biorreator STR implementando estratégias de alimentação exponencial, otimizando as condições de operação para maximizar a produção de riboflavina, com foco no aumento da produtividade e do rendimento do processo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Biorreator *Airlift*

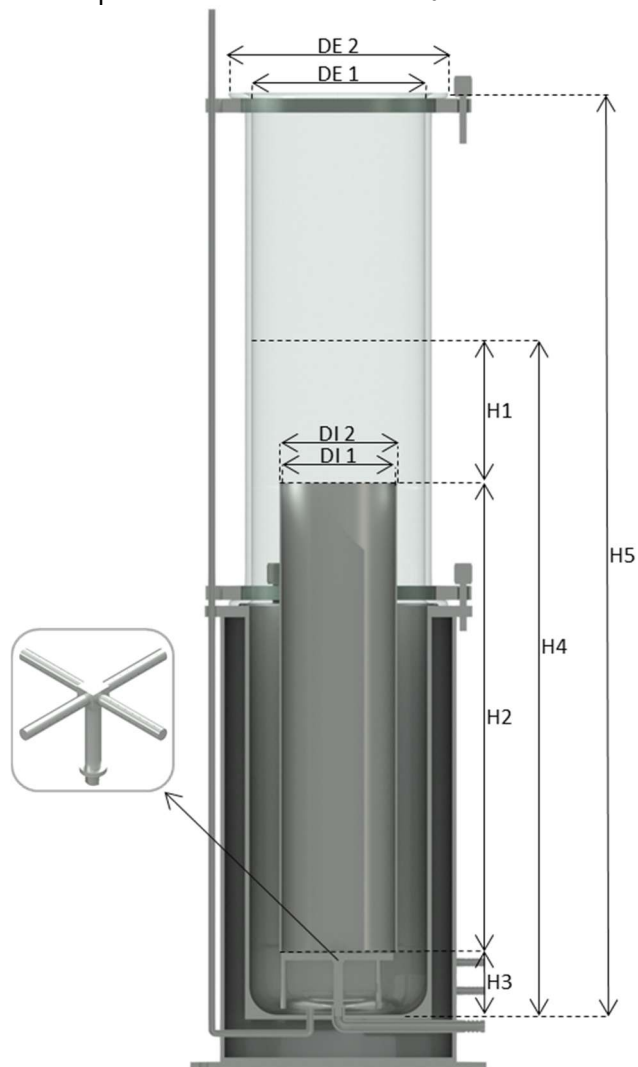
Os experimentos foram conduzidos em um biorreator *Airlift* com volume útil de 5 litros, conforme ilustrado na Figura 8. O sistema foi projetado com uma tampa que contém entradas para diversos acessórios, incluindo eletrodos para oxigênio dissolvido e pH, condensador, amostrador e portas dedicadas à adição de ácido, base e antiespumante.

A estrutura principal do biorreator consiste em um cilindro interno de aço inoxidável e um externo de vidro transparente, permitindo a visualização dos processos internos. As dimensões do biorreator são apresentadas na Tabela 6.

O biorreator *Airlift* foi equipado com um aspersor de ar de aço inoxidável tipo “cruzeta”, projetado com orifícios de 0,5 mm de diâmetro, espaçados a 5 mm ao longo do comprimento das hastes do dispositivo. Essa configuração foi escolhida para

garantir uma dispersão uniforme do gás no sistema, promovendo maior eficiência na transferência de oxigênio (Badino, A. C. *et al.*, 2004).

Figura 8 - Desenho esquemático do biorreator *Airlift* com cotas e detalhe do aspersor.



Fonte: Autor (2025)

Tabela 6 - Dimensões dos biorreatores *Airlift* 5 Litros de capacidade.

Dimensões (mm)	
H1	55
H2	350
H3	45
H4	450
H5	600
DE 1	125
DE 2	135
DI 1	75
DI 2	85
H4/DE 1	3,60

Relação de área transversal (A_D/A_S)	1,78
DI 1/DE 1	0,60

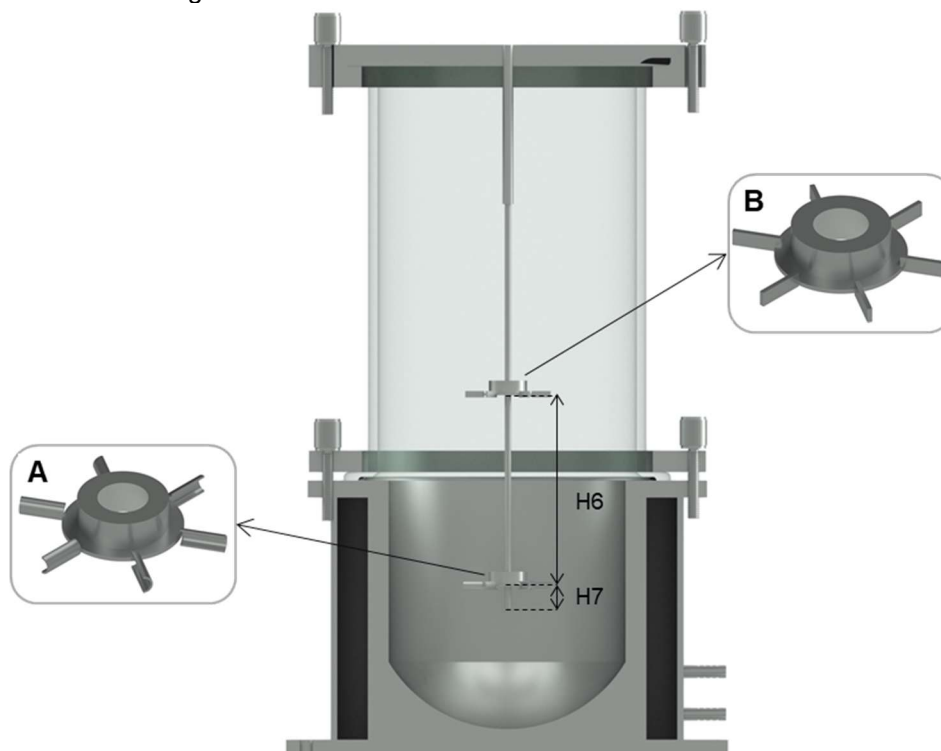
Fonte: Autor (2025)

4.2. Biorreator convencional (STR)

Os experimentos também foram realizados em um biorreator convencional de tanque agitado da marca Tecnal (modelo TEC-BIO-7,5VI, Piracicaba - SP, Brasil). O equipamento é equipado com um controlador integrado para monitoramento e ajuste de variáveis críticas, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e velocidade de agitação. Além disso, dispõe de um rotâmetro para controle da aeração e bombas para alimentação de nutrientes, adição de antiespumante e ajuste de pH por soluções ácidas e básicas.

O biorreator possui um volume total de 7,5 L e um volume útil de 5,0 L. Suas dimensões incluem um diâmetro interno de 0,190 m e um diâmetro externo de 0,217 m. O sistema é equipado com quatro chicanas opostas diametralmente, cada uma com largura de 0,015 m, para garantir uma mistura eficiente e minimizar a formação de vórtices. O tanque foi configurado com dois impelidores: uma turbina Rushton e uma turbina Smith, posicionadas de acordo com as dimensões apresentadas na Tabela 7, visando maximizar a transferência de oxigênio no processo. Essa configuração é ilustrada na Figura 9.

Figura 9 - Vista frontal de um Biorreator convencional



Legenda: (A) Impelidor do tipo turbina Smith; (B) Impelidor do tipo turbina Rushton.

Fonte: Autor (2025)

Tabela 7 - Dimensão do posicionamento das turbinas no biorreator STR.

Dimensões (mm)	
H6	100
H7	10
Ø Rushton	100
Ø Smith	100

Fonte: Autor (2025)

4.3. Sistema de aquisição de dados e controle dos biorreatores.

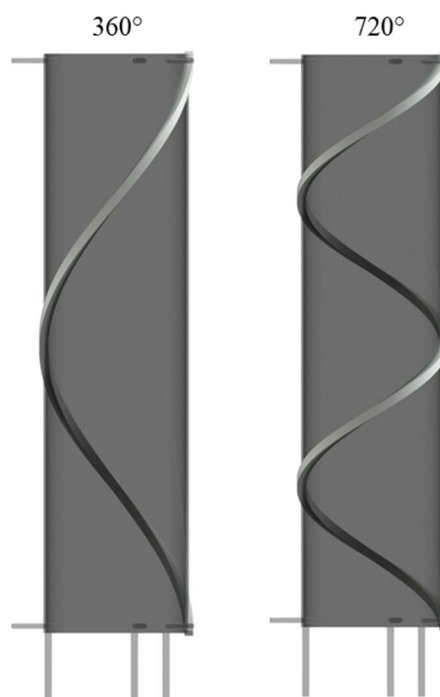
Os experimentos foram realizados utilizando o controlador Tecnal TEC-BIO-FLEX (Piracicaba - SP, Brasil), projetado para o monitoramento e controle das principais variáveis operacionais dos biorreatores. Esse sistema incluiu um sensor de temperatura Pt-100, um medidor de fluxo de gás Aalborg GFC37 para controle preciso da aeração, e quatro bombas peristálticas para adição de nutrientes, antiespumante, e soluções de ácido e base. Além disso, o sistema contava com sensores de oxigênio dissolvido (Mettler Toledo O₂ Transmitter 4500) e de pH (Mettler Toledo 405-DPAS-SCK8S/225), garantindo medições contínuas e ajustes automáticos durante os experimentos. Todos os dados foram adquiridos e monitorados em tempo real por

uma plataforma dedicada de aquisição de dados, o que permitiu maior precisão e reprodutibilidade.

4.4. Promotores de Fluxo Radial

Os promotores de fluxo radial (helicoides) foram projetados utilizando um software de modelagem CAD e confeccionados em uma impressora 3D Makerbot Replicator+ (Brooklyn, NY, EUA), com poliácido láctico (PLA) como material de impressão. Esses promotores foram integrados ao tubo interno do biorreator *Airlift*, sendo instalados nas regiões de subida (Riser) e/ou descida (Downcomer) para avaliar seus efeitos na hidrodinâmica e na transferência de oxigênio. Os promotores foram dispostos de forma a circundar a estrutura interna do biorreator, como ilustrado na Figura 10, e foram projetados em dois ângulos de rotação: 360° e 720° .

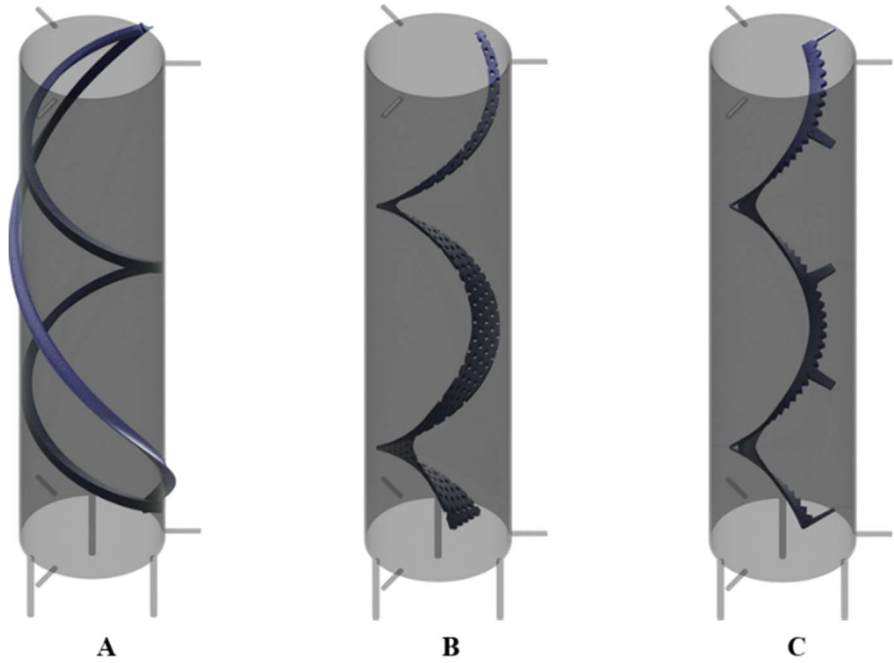
Figura 10: Modelo de posição promotores de escoamento com relação a rotação.



Fonte: Autor (2025)

Os modelos desenvolvidos tiveram suas geometrias projetadas com o objetivo de transformar a energia cinética do fluido de fluxo axial para angular. Isso visa otimizar a distribuição das bolhas, aumentar o tempo de retenção do gás, e melhorar a transferência de oxigênio no sistema. As geometrias testadas incluem modelos em formato de onda (360° e 720°), peneira e serrilhado, conforme ilustrado na Figura 11.

Figura 11 - Demonstração da conformação geométrica dos promotores desenvolvidos.



Legenda: (A) Onda 360° e 720°; (B) Peneira; (C) Serrilhado.

Fonte: Autor (2025)

A Tabela 8 apresenta as configurações geométricas dos promotores helicoidais testados no biorreator *Airlift*, levando em consideração a geometria, a rotação e a posição dos modelos no tubo interno.

Tabela 8 - Dados dos promotores helicoidais utilizados no biorreator *Airlift*.

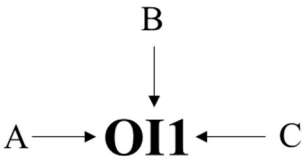
Geometria	Corte transversal	Posição	Rotação	Código
Onda		Interno	360°	OI1
		Externo	360°	OE1
		Interno	720°	OI2
		Externo	720°	OE2
		Interno e Externo	360°	OIE1
		Interno e Externo	720°	OIE2

Peneira		Interno	720°	PI2
Serrilhado		Interno	720°	SI2

Fonte: Autor (2025)

O modelo de codificação foi desenvolvido para identificar de forma sistemática as diferentes configurações dos promotores helicoidais, levando em conta as variáveis de geometria, posição e rotação. O esquema utilizado é descrito na Figura 12.

Figura 12 - Esquema do modelo de código utilizado para identificar os promotores de escoamento helicoidais.



Fonte: Autor (2025)

- A:** Letra inicial que representa a geometria do helicoide: O (Onda), P (Peneira) ou S (Serrilhado).
- B:** Representa a posição do helicoide no tubo interno: I (Interno) ou E (Externo).
- C:** Indica a rotação do helicoide: 1 (360°) ou 2 (720°).

4.5. Determinação do Coeficiente volumétrico de Transferência de Oxigênio (k_La)

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi determinado utilizando o método “gassing-out”, conforme descrito por Cerri *et al.* (2016). Esse método permite a determinação simultânea de k_La a e da sensibilidade do eletrodo (k_e), com base nos dados da concentração de oxigênio dissolvido (c_e) como uma função do tempo.

O eletrodo de oxigênio dissolvido foi posicionado na região de subida (Riser) do biorreator *Airlift* e calibrado sob condições de saturação de oxigênio. O procedimento consistiu nas seguintes etapas:

- Remoção do Oxigênio Dissolvido por meio do borbulhamento de nitrogênio (N₂) no biorreator, até que os níveis de oxigênio no líquido fossem reduzidos a zero.

- Reintrodução do Ar após a remoção do oxigênio, onde que o biorreator foi novamente abastecido com ar em fluxo constante. A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada continuamente pelo eletrodo, até que a saturação fosse atingida.

Os dados obtidos durante o processo de re-saturação foram utilizados para calcular o k_{LA} e o k_e , permitindo a caracterização precisa do sistema em termos de transferência de oxigênio (Cerri, Marcel Otavio *et al.*, 2016).

4.5.1. Aquisição de dados para análise de k_{LA} .

Para a análise do k_{LA} , foi utilizado um sistema de monitoramento integrado composto por um sensor de oxigênio óptico Vernier Optical DO (Beaverton, OR, EUA) e um sistema de aquisição de dados Vernier LabQuest (Beaverton, OR, EUA). Durante os experimentos, o biorreator foi coberto para bloquear a entrada de luz e o sensor foi posicionado na região central do biorreator, permitindo a captura contínua da concentração de oxigênio dissolvido no meio líquido. O processo ocorreu com água destilada a 37°C com vazões de 1, 2,3 e 4 vvm.

4.6. Retenção gasosa global

Para avaliar a retenção gasosa global (ε_G), foi empregada a metodologia descrita por Chisti (1989). Nesse método, a altura da coluna de líquido no biorreator *Airlift* foi medida em duas condições distintas:

- Altura do líquido (h_L): Medida na ausência de injeção de gás no sistema, representando o nível estático do líquido no biorreator.
- Altura da dispersão (h_D): Determinada durante a aeração, com variações em função das diferentes vazões de ar aplicadas durante os experimentos.

A retenção gasosa global foi calculada utilizando a Equação 13, que considera a relação entre a altura da dispersão e a altura do líquido estático:

$$\varepsilon_G = \frac{h_D - h_L}{h_D} \quad \text{Equação 13}$$

Os valores obtidos para ε_G foram convertidos para porcentagem para facilitar a interpretação dos resultados. Esse parâmetro é essencial para caracterizar

o desempenho hidrodinâmico do biorreator, uma vez que reflete a fração de gás retida na fase líquida durante o processo de aeração.

4.7. Cálculo de Potência

4.7.1. Potência Mecânica (STR)

Para quantificar a potência de agitação em biorreatores equipados com impelidor (STR), utilizou-se a equação clássica que relaciona a potência consumida pelo motor às variáveis do impelidor e do regime de escoamento (Doran, 2013). Em regime turbulento, essa potência P_{mec} é dada por:

$$P_{mec} = N_p \rho N^3 D^5 \quad \text{Equação 14}$$

em que:

N_p é o número de potência (adimensional), determinado pela geometria do impelidor.

ρ é a densidade do fluido (kg/m³);

N é a velocidade de rotação (s⁻¹) do impelidor;

D é o diâmetro do impelidor (m).

4.7.2. Potência Fornecida ao Líquido em Biorreatores *Airlift*

Em biorreatores *Airlift*, a principal fonte de energia para movimentar o fluido é a expansão do gás injetado no fundo, conforme descrito por Chisti. Nessas colunas, a diferença de densidade entre riser e downcomer gera a circulação do fluido (Guieysse *et al.*, 2011). A equação básica para a velocidade superficial de gás U_{GS} no riser, levando em conta a expansão isotérmica, pode ser escrita como:

$$U_{GS} = \frac{Q_m R T}{\rho_L g H_L A_r} \ln \left(1 + \frac{\rho_L g H_L}{P_h} \right) \quad \text{Equação 15}$$

em que:

Q_m é a vazão molar de gás (mol/s);

R a constante universal dos gases (J/mol·K);

T a temperatura absoluta (K);

ρ_L a densidade do líquido (kg/m³);

g a aceleração da gravidade (m/s²);

H_L a altura de líquido estático (m);

A_r a área de secção transversal do riser (m²);

P_h a pressão no headspace (Pa).

A partir dessa velocidade superficial, a potência fornecida ao líquido P_G é estimada relacionando-se a energia de expansão do gás com a coluna de líquido. Uma forma prática de expressar essa potência (total ou específica) é:

$$\frac{P_G}{V_L} \approx \rho_L g U_{GS} \left(\frac{A_R}{A_R + A_D} \right) \quad \text{Equação 16}$$

onde V_L é o volume de líquido no reator, e $\left(\frac{A_R}{A_R + A_D} \right)$ é um fator geométrico que representa a fração efetivamente aerada (riser) em relação à seção total (riser + downcomer). Multiplicando $\rho_L g U_{GS}$, obtém-se a potência total (P_G) em watts (W).

Dessa forma, no *Airlift*, a convecção do fluido e a transferência de massa são promovidas pelo trabalho realizado pelo gás ao expandir-se da pressão do fundo até a superfície (Guieysse *et al.*, 2011)

4.8. Microrganismo.

A linhagem utilizada neste estudo foi uma versão geneticamente modificada de *Bacillus subtilis*, desenvolvida para a superprodução de riboflavina (Lins, *et al.*, 2021). Essa linhagem foi obtida por meio de mutações específicas, induzidas pela seleção com a antivitamina roseoflavina, e projetada para aprimorar sua eficiência na biossíntese de RF.

Uma das principais modificações genéticas realizadas foi uma mutação no gene *ribC*, que codifica a flavokinase. Essa alteração resultou em uma redução drástica na atividade enzimática da enzima, que passou a apresentar apenas 1% da atividade observada na linhagem selvagem. Essa redução limitou a fosforilação da riboflavina, levando ao seu acúmulo intracelular (Mack; Van Loon; Hohmann, 1998). Além disso, o promotor natural do operon da via biossintética de RF foi substituído pelo promotor *veg*, caracterizado por sua alta atividade constitutiva em *B. subtilis*, o que garantiu a expressão contínua dos genes envolvidos na síntese de riboflavina.

Outra mutação introduzida foi no gene *tkt*, responsável pela codificação da enzima transketolase. Essa modificação reduziu a atividade da enzima, resultando no acúmulo de ribulose 5'-fosfato, um precursor essencial da via biossintética da riboflavina (García-Angulo, 2017). Adicionalmente, foi integrado um pequeno RNA regulatório (sRNA) que interage com o riboswitch *ribDG*, o qual normalmente regula a produção de riboflavina ao detectar níveis elevados de flavina mononucleotídeo

(FMN). A ligação do sRNA ao riboswitch desativa sua função regulatória, permitindo a produção contínua de riboflavina, independentemente da concentração de FMN.

Essa linhagem geneticamente modificada de *B. subtilis* foi gentilmente fornecida pela Dra. Danielle Biscaro Pedrolli, Professora Assistente Doutora em RDIDP no Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus de Araraquara.

4.8.1. Preservação do microorganismo.

O banco de trabalho foi estabelecido a partir da cepa de *Bacillus subtilis* superprodutora de riboflavina (RF), retirada do banco-mãe. O preparo inicial consistiu na produção de um pré-inóculo em meio líquido, contendo 20 g/L de LB (Luria-Bertani) e 20 g/L de sacarose, incubado sob agitação de 220 rpm a 37°C por um período de overnight.

A partir do pré-inóculo preparado, uma alíquota de 720 µL foi transferida assepticamente para um criotubo estéril. Como crioprotetor, foram adicionados 480 µL de glicerol a 50% (v/v), obtendo-se um volume final de 1200 µL. Após a mistura, os criotubos foram devidamente identificados e armazenados a -80°C, garantindo a viabilidade da cepa para futuros experimentos.

4.9. Meios de Cultura.

4.9.1. Meio de reativação (MR).

O meio de reativação foi composto por 20,0 g/L de Meio LB (Luria-Bertani) e 20,0 g/L de sacarose. Esse meio foi utilizado para promover a reativação das células da cepa de *Bacillus subtilis* superprodutora de riboflavina, retiradas do banco de trabalho

4.9.2. Meio de Inóculo (MI).

O meio de inóculo foi formulado com os seguintes componentes:

Tabela 9 - Composição do Meio de Inóculo (MI)

Componente	Concentração
Sacarose	70 g/L
Extrato de levedura	1 g/L
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	25 g/L
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	0,333 g/L

Fosfato dissódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1 g/L
Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,15 g/L
Cloreto de cálcio (CaCl_2)	7,5 mg/L
Sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	6 mg/L
Sulfato de ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	6 mg/L

Fonte: Autor (2025)

O pH do meio foi ajustado para 7,0 antes do processo de esterilização. A esterilização foi realizada em autoclave a 121°C por 30 minutos. Essa composição foi definida para fornecer os nutrientes necessários ao crescimento de *Bacillus subtilis* e produção de RF (Wang *et al.*, 2018).

4.9.3. Meio de Produção (MP).

O meio de produção apresentou a mesma composição do meio de inóculo, porém com um aumento de 10% na concentração de todos os componentes. Após o processo de esterilização em autoclave a 121°C por 30 minutos, o pH do meio foi ajustado para 7,0 diretamente no biorreator.

4.10. Cultivo em biorreator.

4.10.1. Reativação

A reativação da cepa *Bacillus subtilis* superprodutora de RF foi realizada utilizando dois tubos Falcon (50 mL), cada um contendo 9 mL de meio de reativação (MR). A inoculação foi feita a partir da adição de 1 mL da cepa congelada. Os tubos foram mantidos sob agitação de 220 rpm, a 37°C, por um período de 24 horas, promovendo a reativação celular e o preparo para as etapas subsequentes.

4.10.2. Pré-Inóculo

Após o processo de reativação, o conteúdo dos dois tubos Falcon (10 mL cada) foi transferido para dois frascos de Erlenmeyer (500 mL), cada um contendo 90 mL de MR, totalizando um volume final de 100 mL por frasco. Os frascos foram incubados sob agitação de 220 rpm, a 37°C, por 24 horas, permitindo o crescimento celular necessário para a etapa de inóculo.

4.10.3. Inóculo.

Na etapa de inóculo, o conteúdo dos dois frascos de Erlenmeyer, obtido ao final da etapa de pré-inóculo, foram misturados formando um *pool*. A partir dessa mistura, foram transferidos 10 mL para cada um de seis frascos de Erlenmeyer (500 mL), cada um contendo 90 mL de meio de inóculo (MI). Os frascos foram mantidos sob agitação de 220 rpm, a 37°C, por 24 horas, promovendo o crescimento celular em condições controladas antes do cultivo no biorreator.

4.10.4. Produção.

Ao final da etapa de inóculo, o conteúdo dos seis frascos de Erlenmeyer foram reunidos formando um *pool*. Antes de iniciar o processo de produção, ajustes na densidade óptica (DO₆₀₀) foram realizados, assegurando que o valor inicial estivesse dentro da faixa de $1,0 \pm 0,2$ UA (unidade de absorbância). Para atingir essa condição, diluições ou concentrações foram feitas conforme necessário. Após o ajuste, 500 mL deste pool foi transferido para o biorreator, correspondendo a 10% do volume total de operação do cultivo (5 L).

4.10.5. Condições de Cultivo em biorreator *Airlift*.

Os cultivos conduzidos no biorreator *Airlift* foram realizados em modo batelada. Os experimentos foram realizados tanto com quanto sem a adição de promotores de escoamento helicoidais, visando avaliar os efeitos dessa modificação nos parâmetros hidrodinâmicos e na eficiência de transferência de oxigênio. As condições experimentais estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Cultivo em biorreator *Airlift* condições de operação.

Vazão (vvm)	Promotor de escoamento	Temperatura (°C)	pH	Volume (L)
0,5	Sem helicoide	37	7	5
1				
2				
0,5	Com helicoide	37	7	5
1				
2				

Fonte: Autor (2025)

Os experimentos foram realizados em diferentes vazões de ar (0,5 vvm, 1 vvm e 2 vvm) para avaliar o impacto da aeração nos parâmetros hidrodinâmicos e na produção de riboflavina. A temperatura foi mantida constante a 37°C, e o pH mantido em $7 \pm 0,15$ ao longo de todo o processo. Os valores de pH foram ajustados automaticamente por meio da adição de soluções de ácido (H_2SO_4 1m) ou base (NaOH 1m), conforme necessário. O volume operacional do biorreator foi de 5 L.

A inclusão dos helicoides como promotores de escoamento teve como objetivo aumentar a eficiência da transferência de oxigênio e otimizar a circulação do líquido no biorreator. Para comparar os efeitos dessa modificação, os cultivos foram realizados com as mesmas condições operacionais, tanto na presença quanto na ausência dos helicoides.

4.10.6. Condições de Cultivo em biorreator STR.

Os cultivos foram realizados com taxa de aeração de 1 vvm, temperatura de 37 °C e pH mantido em $7 \pm 0,15$ ao longo de todo o processo. O ajuste de pH ocorreu de forma automática, pela adição de ácido (H_2SO_4 1 M) ou base (NaOH 1 M), conforme necessário. O oxigênio dissolvido foi controlado por meio de variações na frequência de agitação (entre 100 e 1000 rpm), enquanto a concentração de açúcar e demais parâmetros do meio de cultivo foram definidos antes de cada experimento.

Para a avaliação das condições ideais de cultivo para a produção de riboflavina, foi conduzido um planejamento experimental fatorial com três variáveis independentes, cada uma analisada em três níveis codificados (-1, 0 e 1). As variáveis consideradas foram X1 o oxigênio dissolvido, representado pelos níveis 10% (-1), 20% (0) e 30% (1), visando avaliar o impacto da disponibilidade de oxigênio na produção microbiana. X2 a fonte de carbono foi testada em concentrações de 100 g/L (-1), 250 g/L (0) e 400 g/L (1), com o objetivo de verificar o efeito da quantidade de substrato disponível no metabolismo celular. X3 os demais nutrientes foram avaliados em três níveis, correspondendo à concentração base (-1), ao dobro da concentração base (0) e ao triplo da concentração base (1), permitindo compreender a influência da composição do meio no desempenho do cultivo.

As combinações experimentais foram organizadas em nove condições (Cultivos A a I), conforme descrito na Tabela abaixo:

A Tabela 11 apresenta o planejamento experimental empregado para determinar as condições ótimas de cultivo,

Tabela 11 - Matriz Delineamento de Composto Central (DCC) de 3 variáveis.

Cultivo	Variáveis		
	O ₂ % (X ₁)	Açúcar g/L (X ₂)	Meio (X ₃)
A	1	0	-1
B	1	-1	0
C	-1	-1	-1
D	0	-1	1
E	0	1	-1
F	1	1	1
G	0	0	0
H	-1	0	1
I	-1	1	0

Fonte: Autor (2025)

A estratégia de alimentação exponencial do meio de cultura foi realizada de acordo com a Equação 17.

$$Q(t) = \frac{\mu_0 V_0 C_{x_0}}{C_s^0 Y_{x/s}} \exp(\mu_0 t) \quad \text{Equação 17}$$

Onde:

Q = Fluxo de alimentação

μ_0 = Taxa de crescimento

V_0 = Volume inicial

C_s^0 = Concentração de substrato inicial

$Y_{x/s}$ = Coeficiente de rendimento célula por substrato

Os parâmetros cinéticos foram determinados com base no histórico de dados do grupo de pesquisa.

4.11. Métodos Analíticos.

4.11.1. Determinação da Concentração Celular

O crescimento celular foi monitorado por dois métodos complementares: a medição da densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) e a determinação de massa seca. As medições de densidade óptica foram realizadas utilizando o espectrofotômetro

THERMO SCIENTIFIC® GENESYS 10S (Waltham - MA, EUA), permitindo o acompanhamento em tempo real do crescimento das culturas.

A conversão dos valores de DO_{600nm} em massa celular seca (g/L) foi realizada com base em uma curva de calibração previamente construída. Para estabelecer essa curva, cultivos em shaker foram utilizados como modelo experimental. Volumes conhecidos das amostras foram pipetados e transferidos para placas de Petri previamente secas e pesadas. As amostras foram submetidas a secagem em estufa a 60°C por 24 horas e, em seguida, pesadas novamente. A diferença de massa foi utilizada para calcular a concentração celular em termos de massa seca.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos resultados e a confiabilidade da curva de calibração. Esse método permitiu a obtenção de uma relação precisa entre os valores de DO_{600nm} e a massa celular, assegurando a acurácia das estimativas do crescimento celular durante os experimentos (Jesuino, 2019).

4.11.2. Determinação de riboflavina

Inicialmente, as amostras foram analisadas por espectrometria para uma determinação preliminar e rápida da concentração de RF. A absorbância foi medida a um comprimento de onda de 444 nm, utilizando uma curva de calibração preparada com riboflavina padrão de pureza 98% (Sigma Aldrich, San Luis – MI, EUA), conforme descrito por Abbas e Sibirny (2011). Esse método permitiu uma avaliação inicial da concentração de RF nas amostras, durante o processo de cultivo.

Para uma análise quantitativa mais detalhada, as amostras foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O equipamento utilizado foi da marca SHIMADZU, equipado com controladora CBM20A e bomba NexeraXR LC20AD, operando com um fluxo de fase móvel de 0,5 mL.min⁻¹. A coluna utilizada foi a Poroshell 120 EC-C18 (tamanho de partícula: 2,7 µm; dimensões: 50 × 3 mm), com a fase móvel composta por 18% (v/v) de metanol, 20 mM de ácido fórmico e 20 mM de formato de amônio, ajustados para um pH de 3,7, conforme metodologia adaptada de Pedrolli *et al.* (2015a). A detecção foi realizada a 445 nm, com a curva de calibração utilizando a mesma riboflavina padrão empregada na espectrometria.

4.11.3. Determinação da concentração de Açúcar.

Para análise das amostras, estas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C, em uma centrífuga HETTICH® UNIVERSAL 320R. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e filtrado em membrana de 0,22 µm. A concentração de sacarose presente no meio de cultura foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um sistema SHIMADZU. O conjunto cromatográfico era composto por uma controladora CBM20A, equipada com bomba NexeraXR LC20AD. A separação foi realizada em uma coluna Aminex® HPX-87P, específica para análises de carboidratos, utilizando água ultrapura como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL·min⁻¹. A coluna foi mantida a 80°C, e a detecção ocorreu por meio de um detector de índice de refração (RID) 20A (Jesuino, 2019).

4.11.4. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular (µ_{máx}).

A velocidade específica de crescimento foi definida por meio de um balanço de massa em reator em batelada representado pela Equação 18

$$\frac{d(Cx \cdot V)}{dt} = \mu \cdot Cx \cdot V \quad \text{Equação 18}$$

Na fase exponencial do crescimento $\mu = \mu_{\text{máx}}$ portanto, após integrar e rearranjar a Equação 18, a velocidade específica de crescimento pode ser calculada através da Equação 19.

$$\ln Cx/Cx_0 = \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad \text{Equação 19}$$

Onde Cx_0 (g/L) é a concentração celular no tempo zero e t é o tempo de cultivo (JESUINO, 2019).

4.11.5. Determinação do coeficiente de rendimento de substrato em células (Y_{x/s}).

Para o cálculo do coeficiente de rendimento de substrato em células (Y_{x/s}) (g/g) será utilizada a Equação 20.

$$Cx - Cx_0 = Y_{\frac{x}{s}} \cdot (Cs_0 - Cs) \quad \text{Equação 20}$$

Onde Cx_0 (g/L) é a concentração celular no tempo zero, Cs_0 (g/L) é a concentração inicial do substrato, e Cx (g/L) e Cs (g/L) são as concentrações celular e de substrato, respectivamente, variando com o tempo.

A partir do cálculo do consumo de sacarose e da produção de biomassa correspondente para cada intervalo de tempo, é possível calcular o valor do $Y_{x/s}$. (g/g) (Jesuino, 2019).

4.11.6. Determinação da produção específica ($Y_{p/x}$), ($Y_{p/s}$).

Para o cálculo da produção específica ($Y_{p/x}$) (g/g) ou ($Y_{p/s}$) (g/g) foram utilizadas as equações 21 e 22 respectivamente.

$$Y_{p/x} = \frac{Cp - Cp_0}{Cx - Cx_0} \quad \text{Equação 21}$$

$$Y_{p/s} = \frac{Cp - Cp_0}{Cs - Cs_0} \quad \text{Equação 22}$$

Onde Cp (g/L) é a concentração de RF. (JESUINO, 2019).

4.11.7. Modelagem para Consumo de Substrato

Para avaliar a cinética de consumo de substrato (C_s) ao longo do tempo (t) em diferentes condições de cultivo, utilizou-se o modelo de 1ª ordem, descrito pela Equação 23 (SHULER *et al.*, 2017).

$$\frac{dC_s}{dt} = -KC_s \quad \text{Equação 23}$$

onde $K \text{ h}^{-1}$ é a constante aparente de consumo de substrato. A solução geral dessa equação diferencial é dada por:

$$C_s(t) = C_{s0}e^{-kt} \quad \text{Equação 24}$$

Desse modo, as variáveis $\ln [C_s(t)]$ e t podem ser relacionadas por uma regressão linear simples $y = a + bx$.

Todos os dados experimentais de tempo (em horas) e concentração de substrato (em g/L) foram organizados em planilhas ou vetores numéricos. Em seguida, aplicou-se uma rotina de ajuste linear, utilizando o método de mínimos quadrados, para determinar os parâmetros a (intercepto) e b (inclinação). Por fim, a constante de consumo é calculada como $K = -b$, e o valor de C_s ajustado provém de e^a .

O coeficiente de determinação (R^2) foi empregado como principal indicador de qualidade de ajuste, auxiliando na verificação de quão bem o modelo de 1ª ordem descreve a variação experimental de C_s . Os ajustes e cálculos de regressão foram

realizados no software MATLAB, o código para o tratamento dos dados está apresentado no Anexo I.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indisponível no momento.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou o potencial da modificação geométrica de biorreatores *Airlift* como estratégia eficaz para intensificação de processos biotecnológicos, com foco na produção de RF por *Bacillus subtilis*. A introdução de helicoides com geometria tipo “Onda” e rotação de 360° resultou em melhorias significativas nos parâmetros hidrodinâmicos do sistema, especialmente no k_La , com menor consumo energético (W / k_La). Dentre os modelos avaliados, os helicoides OI1, OE1 e OIE1 se destacaram, sendo que os modelos com rotação de 720° apresentaram desempenho inferior, devido às maiores perdas de carga e menor eficiência.

O modelo OE1, posicionado externamente ao tubo interno do reator, apresentou o melhor desempenho global, promovendo aumentos significativos em k_La e na retenção gasosa. A aplicação do helicóide OE1 em cultivos com *Bacillus subtilis* confirmou sua eficiência em escala laboratorial. A condição com 2 vvm resultou em uma produção de 2,49 g/L de riboflavina, representando um aumento de 43,9% em relação ao tubo padrão sob a mesma taxa de aeração. Mesmo em condições com menor vazão de ar (1 vvm), o helicóide manteve desempenho superior.

Complementando o estudo, a formulação do meio de alimentação em biorreatores STR foi otimizada por meio de um planejamento fatorial. A peptona e o nitrato de sódio ($NaNO_3$) destacaram-se como fontes de nitrogênio promissoras para o crescimento celular e produção de RF, enquanto o fosfato dipotássico (K_2HPO_4) mostrou-se essencial para a síntese do metabólito.

Por fim, os cultivos em biorreatores STR operados em modo Fed-batch evidenciaram a forte influência das variáveis operacionais sobre a biossíntese de RF. O oxigênio dissolvido foi identificado como o principal fator, seguido pelas interações entre a concentração de açúcar e os componentes do meio. O cultivo A obteve o melhor desempenho (2,29 g/L e $Y_{p/x} = 0,593$ g/g), porém mais estudos são necessários, visto que o resultado alcançado foi inferior ao obtido no biorreator *Airlift* em modo batelada, o que indica a necessidade de otimização.

7. PERSPECTIVAS

Para trabalhos futuros, é essencial investigar as limitações observadas na produção de RF, que parecem estar associadas à cepa de *Bacillus subtilis* utilizada neste estudo. Os resultados indicam que a linhagem empregada apresenta uma faixa produtiva limitada, com produção máxima em torno de 2,5 g/L. Assim, recomenda-se a avaliação de outras cepas com potencial biossintético superior, possibilitando comparações mais robustas quanto à produtividade e à eficiência do processo.

Além disso, sugere-se a realização de cultivos em modo Fed-batch no biorreator *Airlift*, a fim de permitir uma comparação mais completa com os resultados obtidos no reator STR. Para viabilizar essa etapa, será necessário solucionar a limitação relacionada à variação de volume típica do processo Fed-batch, que afeta diretamente a dinâmica de circulação do fluido nos sistemas *Airlift*. Essa abordagem estava prevista inicialmente neste trabalho, mas não pôde ser concluída dentro do prazo experimental.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 321-360, 2011.
- AIZAWA, S.-I. *Bacillus subtilis*: The representative of gram-positive bacteria. In: AIZAWA, S.-I. **The Flagellar World: Electron Microscopic Images of Bacterial Flagella and Related Surface Structures**. Oxford: Academic Press, 2014. cap. 4, p. 22-23. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417234-0.00004-9>. Acesso em: 14 ago. 2024.
- AVERIANOVA, L. A. *et al.* Production of vitamin B2 (riboflavin) by microorganisms: An overview. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, e570828, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.570828>. Acesso em: 14 ago. 2024.
- BADINO, A. C.; MENDES, C.; CERRI, M. O. Biorreatores pneumáticos: Simples e eficientes. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, p. 24-33, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/307512660>. Acesso em: 14 ago. 2024.
- CHISTI, M. Y.; MOO-YOUNG, M. Hydrodynamics and oxygen transfer in pneumatic bioreactor devices. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, n. 5, p. 487-494, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.260310514>.
- COSTA JÚNIOR, C. C.; CORREA, L. J. Avaliação de parâmetros de desempenho em reator convencional: aplicação em processos industriais. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 3, e3783745, 2019.
- CYTIVA. **What do cells need from a bioreactor?**. [S.l.]: Gelifesciences, 2020. Folder.
- DEBABOV, V. G. *et al.* **Strain of bacterium *Bacillus subtilis*: A producer of riboflavin**. RU2081906C1, 1997.
- DMYTRUK, K. *et al.* Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production. **Journal of Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 11-17, 2014.
- DORAN, P. M. Reactor engineering. In: DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. London: Academic Press, 2013. p. 761-852.
- ESPERANÇA, M. N. **Influência de aspectos geométricos na hidrodinâmica e transferência de oxigênio de biorreatores Airlift de circulação interna**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- GARCÍA-ANGULO, V. A. Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 196-209, 2017.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153-176, 2009.

GARCIA-OCHOA, F. *et al.* Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 289-307, 2010.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; GOMEZ, E. Stirred Tank Bioreactors. In: **Comprehensive Biotechnology**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 179-198. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00108-2>.

GU, Y. *et al.* Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. **Metabolic Engineering**, v. 50, p. 109-121, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.006>. Acesso em: 14 ago. 2024.

GUIEYSSE, B.; QUIJANO, G.; MUÑOZ, R. Bioreactors—Design | Airlift Bioreactors. In: MOO-YOUNG, M. (ed.). **Comprehensive Biotechnology**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. v. 2, p. 199-212.

HÄRTIG, E.; JAHN, D. Regulation of the anaerobic metabolism in *Bacillus subtilis*. **Advances in Microbial Physiology**, v. 61, p. 195-216, 2012.

HEMIDA ABD-ALLA, M. *et al.* Activation of riboflavin production by *Bacillus subtilis* (KU559874) and *Bacillus tequilensis* (KU559876). **EC Bacteriology and Virology Research**, v. 2, p. 131-150, 2016.

HU, J. *et al.* Mixomics analysis of *Bacillus subtilis*: effect of oxygen availability on riboflavin production. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 150, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0764-z>. Acesso em: 14 ago. 2024.

JESUINO, A. C. B. M. **Diferentes estratégias de cultivo de *Escherichia coli* recombinante para produção de proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein - GFP)**. 2019. Exame de Qualificação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2019.

KOVÁCS, Á. T. *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 724-725, 2019.

LEE, K. H. *et al.* **Microorganism for producing riboflavin and method for producing riboflavin using the same**. United States Patent US 7,078.222 B2, 2004a. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/88/43/80/7e564bb5ca4857/US7078222.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2024.

LEE, K. H. *et al.* **Microorganisms and process for the production of riboflavin by fermentation**. European Patent Specification EP 1 426 450 B1, 2004b. Disponível em:

<https://patentimages.storage.googleapis.com/46/10/e7/65ece998e2ad38/EP1426450B1.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2024.

LI, X. *et al.* Power-saving Airlift bioreactor with helical sieve plates: Developmental and performance studies. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 158, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.03.014>. Acesso em: 14 ago. 2024.

LINS, M. R. C. R. *et al.* Targeting riboswitches with synthetic small RNAs for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 68, p. 59-67, 2021. DOI: 10.1016/j.ymben.2021.09.003.

LIU, S. Bioreactor design and operation. In: LIU, S. **Bioprocess Engineering: kinetics, sustainability, and reactor design**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2020. cap. 18, p. 819-856.

LIU, S. *et al.* Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 31, 2020.

LOPES, M. D. **Comparação experimental da troca térmica entre tanque com serpentina helicoidal e com chicana tubular, para impelidor radial e axial**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Santa Cecília, Santos, 2013. Disponível em: https://unisanta.br/arquivos/mestrado/mecanica/dissertacoes/dissertacao_marcilio.pdf. Acesso em: 14 ago. 2024.

LUO, L. *et al.* Hydrodynamics and mass transfer characteristics in an internal loop Airlift reactor with sieve plates. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 12, p. 2377-2388, 2013.

MACK, M.; VAN LOON, A. P. G. M.; HOHMANN, H.-P. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 4, p. 950-955, 1998.

MAN, Z. W. *et al.* Enhanced riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RF1 through the optimization of agitation speed. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 661-667, 2014.

MANDENIUS, C.-F. **Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016.

MESTRE, J. C. *et al.* Aeration step method for *k_{La}* measurement under growth conditions in pneumatic bioreactors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 7, p. 2327-2332, 2019.

MORDOR INTELLIGENCE. **Riboflavin market - growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021 - 2026)**. 2021. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5012365/industrial-hempmarket-growth-trends-covid-19>. Acesso em: 26 ago. 2021.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. **Bioreaction Engineering Principles**. 2. ed. New York: Springer, 2003.

ORAEI, M.; RAZAVI, S. H.; KHODAIYAN, F. Optimization of effective minerals on riboflavin production by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051 using statistical designs. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 49-55, 2018.

PARK, E. Y. *et al.* The improvement of riboflavin production in *Ashbya gossypii* via disparity mutagenesis and DNA microarray analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1315-1326, 2011.

PAWAR, S. B. Process engineering aspects of vertical column photobioreactors for mass production of microalgae. **ChemBioEng Reviews**, v. 3, n. 3, p. 101-115, 2016.

PEDROLI, D. *et al.* The ribB FMN riboswitch from *Escherichia coli* operates at the transcriptional and translational level and regulates riboflavin biosynthesis. **FEBS Journal**, v. 282, n. 16, p. 3230-3242, 2015a.

PEDROLI, D. B. *et al.* A dual control mechanism synchronizes riboflavin and sulphur metabolism in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 45, p. 14054-14059, 2015b.

PERKINS, J. B. *et al.* Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 8-18, 1999.

RIBEIRO, R. M. M. G. P. **Efeitos da velocidade de cisalhamento e transferência de oxigênio em biorreator convencional na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2017.

SABIONI, E. C. S. L. M. **Sistemas de agitação e mistura**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Mecatrônica Industrial) - Centro Paula Souza, FATEC Garça, 2013.

SAUER, U. *et al.* Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3687-3696, 1996.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Blücher, 2001. v. 2.

SCHWECHHEIMER, S. K. *et al.* Biotechnology of riboflavin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2107-2119, 2016.

SHI, S. *et al.* Transcriptome analysis guided metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for riboflavin production. **Metabolic Engineering**, v. 11, n. 4-5, p. 243-252, 2009.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 3. ed. Boston: Pearson, 2017.

SILVA, D. D. V. *et al.* Via fermentativa parte 2: Aminoácidos e vitaminas. **Revista Analytica**, v. 19, p. 62-73, 2005.

SOUZA, A. C. S. *et al.* RF: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.

STUANI, F. H. **Avaliação da transferência de oxigênio e biorreatores de agitação mecânica e Airlift visando à produção de pectinases por *Aspergillus oryzae***. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos e Tecnologias) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2015.

SUGIMOTO, T. *et al.* Isolation of an oxalate-resistant *Ashbya gossypii* strain and its improved riboflavin production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 57-64, 2010.

USUI, N.; YAMAMOTO, Y.; NAKAMATU, T. **Process for producing riboflavin by fermentation**. United States Patent 5,334,510, 1994. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/d7/d4/48/341bdce2b234ed/US5334510.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2024.

WANG, Q. *et al.* Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis* through promoter replacement and *Vitreoscilla* hemoglobin co-expression. **Process Biochemistry**, v. 70, p. 36-44, 2018.

WANG, S.-J.; ZHONG, J.-J. Bioreactor Engineering. In: WANG, S.-J.; ZHONG, J.-J. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 131-161. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-044452114-9/50007-4>.

WU, Q.-L. *et al.* Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 783-794, 2007.

XU, J.; WANG, C.; BAN, R. Improving riboflavin production by modifying related metabolic pathways in *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 74, p. 78-83, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/lam.13584>. Acesso em: 14 ago. 2024.

YİZTÜRK, S.; YALIK, P.; YİZDAMAR, T. H. Fed-batch biomolecule production by *Bacillus subtilis*: A state of the art review. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 329-345, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.008>. Acesso em: 14 ago. 2024.

ZAMBONI, N. *et al.* Reducing maintenance metabolism by metabolic engineering of respiration improves riboflavin production by *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 5, n. 1, p. 49-55, 2003.

ZHANG, J.-R. *et al.* Biotechnological strategies of riboflavin biosynthesis in microbes. **Engineering**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.018>. Acesso em: 14 ago. 2024.

ZHANG, T. *et al.* Advances in Airlift reactors: Modified design and optimization of operation conditions. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 163-182, 2017.

ANEXO A – SCRIPT PARA AJUSTE DE 1ª ORDEM.

```
: S(t) = S0 * exp(-k*t)
```

```
clear; clc; close all;
```

```
% ===== PARTE 1: LOGARITMO =====
```

```
lnS = log(S);
```

```
% ===== PARTE 2: REGRESSAO LINEAR =====
```

```
% A função polyfit(x, y, n) faz ajuste polinomial de grau n;
```

```
% para regressão linear de  $\ln(S) = a + b*t$ , usamos  $n=1$ .
```

```
p = polyfit(t, lnS, 1);
```

```
slope = p(1);      % b
```

```
intercept = p(2);  % a
```

```
% ===== PARTE 3: PARAMETROS DO MODELO =====
```

```
k = -slope;        % constante de 1a ordem
```

```
S0_ajustado = exp(intercept);
```

```
% ===== PARTE 4: CALCULO DO R2 =====
```

```
% Podemos calcular R2 no espaço de  $\ln(S)$ .
```

```
lnS_calc = polyval(p, t); % valores de  $\ln(S)$  preditos pelo modelo
```

```
residuos = lnS - lnS_calc;
```

```
SQR = sum((lnS_calc - mean(lnS)).^2); % soma dos quadrados explicados
```

```
SQT = sum((lnS - mean(lnS)).^2);    % soma dos quadrados total
```

```
R2 = SQR / SQT;
```

```
% ===== PARTE 5: PLOTS =====
```

```
% ----- Plot 1:  $\ln(S)$  vs. t com a reta ajustada
```

```
figure('Name','Plot  $\ln(S)$  vs t');
```

```
plot(t, lnS, 'ko','MarkerSize',6,'LineWidth',1.5); hold on;
```

```

plot(t, lnS_calc, 'r-', 'LineWidth', 1.5);
xlabel('Tempo (h)');
ylabel('ln(S) [-]');
title('Regressão linear de ln(S) vs. t');
legend('Dados experimentais', 'Ajuste linear', 'Location', 'best');
grid on;

```

```

% ----- Plot 2: S vs. t com a curva exponencial no espaço original
% Para isso, fazemos S_calc = exp(lnS_calc) = S0 * exp(-k*t)

```

```

S_calc = exp(lnS_calc);
figure('Name', 'Plot S vs t');
plot(t, S, 'bo', 'MarkerSize', 6, 'LineWidth', 1.5); hold on;
plot(t, S_calc, 'r-', 'LineWidth', 1.5);
xlabel('Tempo (h)');
ylabel('Concentração de Substrato S (g/L)');
title('Ajuste de  $S(t) = S_0 e^{-k t}$ ');
legend('Dados experimentais', 'Ajuste 1ª ordem', 'Location', 'best');
grid on;

```

```

% ----- Plot 3: Resíduos (lnS_exp - lnS_calc) vs. t

```

```

figure('Name', 'Resíduos ln(S)');
plot(t, residuos, 'ks-', 'MarkerSize', 6, 'LineWidth', 1.5);
xlabel('Tempo (h)');
ylabel('Resíduo = ln(S)_exp - ln(S)_modelo');
title('Resíduos do ajuste de 1ª ordem (espaço log)');
grid on;

```

```

% ===== PARTE 6: EXIBIR RESULTADOS NA JANELA CMD
fprintf('-----\n');
fprintf('RESULTADOS DO AJUSTE (Tubo Padrao 1 VVM)\n');
fprintf('-----\n');

```

```

fprintf('Slope (b)          = %8.4f (h^-1)\n', slope);
fprintf('Intercept (a)      = %8.4f\n', intercept);
fprintf('Constante de decaimento k = %8.4f (h^-1)\n', k);
fprintf('S0 (ajustado)       = %8.4f (g/L)\n', S0_ajustado);
fprintf('R2 (no espacio ln(S)) = %8.4f\n', R2);
fprintf('-----\n');

```