



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara**

**NAYLA LIMA OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE IMPELIDORES INDUTORES DE GÁS PARA A  
PRODUÇÃO DE RIBOFLAVINA POR *BACILLUS SUBTILIS* EM FRASCOS DE  
ERLENMEYER**

**Araraquara**

**2026**

**NAYLA LIMA OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE IMPELIDORES INDUTORES DE GÁS PARA A  
PRODUÇÃO DE RIBOFLAVINA POR *BACILLUS SUBTILIS* EM FRASCOS DE  
ERLENMEYER**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Estadual  
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção  
do título de Engenheira de Bioprocessos e  
Biotecnologia em Engenharia de  
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri

Coorientador(a): Bruno Wilian Picão

**Araraquara**

**2026**

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| O48d | <p>Oliveira, Nayla Lima</p> <p>Desenvolvimento de impelidores indutores de gás para a produção de riboflavina por <i>Bacillus subtilis</i> em frascos de erlenmeyer / Nayla Lima Oliveira. -- Araraquara, 2026</p> <p>58 p.</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara</p> <p>Orientador: Marcel Otavio Cerri</p> <p>Coorientador: Bruno Willian Picão</p> <p>1. Impelidor indutor de gás. 2. Riboflavina. 3. Bioprocessos. I.</p> <p>Título.</p> |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**NAYLA LIMA OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE IMPELIDORES INDUTORES DE GÁS PARA A  
PRODUÇÃO DE RIBOFLAVINA POR *BACILLUS SUBTILIS* EM FRASCOS DE  
ERLENMEYER**

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

Data da defesa: 25/05/2026

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri  
UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

---

Prof. Dr. Fernando Lucas Primo  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

---

Prof. Dr. Alvaro de Baptista Neto  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

---

Prof. Dr. Heitor Buzetti Simões Bento  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

---

Prof. Dr. Guilherme Peixoto  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Neusa e Hamilton, que sob muito sol,  
fizeram-me chegar até aqui pela sombra.

## **AGRADECIMENTOS**

Se cheguei até aqui, foi porque Deus me sustentou em toda a minha caminhada. Toda honra e toda glória sejam dadas a Ti, meu Deus, que, nos momentos mais difíceis, me concedeu força, clareza e perseverança para seguir em frente. Nas incertezas, foi em Ti que encontrei o amparo necessário para superar cada desafio.

Aos meus pais, Neusa e Hamilton, deixo um agradecimento mais que especial. Mesmo sem terem tido a oportunidade de cursar o ensino superior, vocês sempre fizeram da educação uma prioridade e nunca mediram esforços para que eu alcançasse esse objetivo. Com muito trabalho e amor, me ensinaram valores que são a base de quem eu sou hoje. Essa conquista é, acima de tudo, nossa. À minha irmã, Alice, agradeço por dar tanto sentido à minha vida e por me inspirar todos os dias a ser mais forte e determinada. Amo vocês com todo o meu coração e com todo o meu entendimento.

A toda a minha família, minha gratidão por estarem sempre presentes ao longo de toda minha vida. Pelo incentivo constante, por acreditarem em meu potencial e celebrarem cada conquista comigo. Vocês são fundamentais na pessoa que me tornei.

Ao meu namorado, deixo meu sincero agradecimento. Sua presença foi essencial para que eu chegasse até aqui. Obrigada por me ouvir, pelo apoio de sempre e por me lembrar da minha capacidade nos dias mais difíceis.

Aos meus colegas de curso, obrigada pela parceria e pelo companheirismo. Vocês tornaram essa jornada leve e feliz.

Aos professores, registro minha eterna gratidão pelo conhecimento compartilhado e pela dedicação durante todos esses anos. Cada ensinamento contribuiu de forma importante para a minha formação, tanto profissional quanto pessoal.

Aos amigos que fiz durante meu período estágio, agradeço pelas trocas, apoio e por todo incentivo ao longo desse período. Gratidão a todos!

E, por fim, ao meu eu de 2019, que, apesar de tudo, não desistiu.

*“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”. – Ayrton Senna*

## RESUMO

A riboflavina (vitamina B2) é um micronutriente essencial para a manutenção do metabolismo fisiológico humano, atuando de forma determinante no processamento metabólico de carboidratos e aminoácidos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver dispositivos de agitação mecânica, conhecidos como impelidores indutores de gás, projetados para promover a indução, dispersão e distribuição homogênea de uma fase gasosa em um meio líquido em frascos de Erlenmeyer, aplicados à realização de testes com *Bacillus subtilis*, um microrganismo reconhecido por seu potencial biotecnológico, a fim de promover a produção de riboflavina. Adicionalmente, realizou-se a comparação entre dois métodos de vedação do sistema de cultivo, utilizando tampões de silicone e de algodão. Os impelidores foram projetados no software Autodesk® AutoCAD, produzidos por impressão 3D e, posteriormente, acoplados a vidrarias do tipo Erlenmeyer. Os resultados indicaram que reduções nos parâmetros geométricos das pás, especificamente altura e base (mm), exerceram influência positiva na produção de riboflavina. No que se refere à vedação do sistema, o tampão de algodão apresentou desempenho superior ao de silicone, demonstrando maior eficiência nas condições experimentais avaliadas.

**Palavras-chave:** indutor de gás; riboflavina; biotecnologia; bioprocessos.

## ABSTRACT

Riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) is an essential micronutrient for the maintenance of human physiological metabolism, playing a key role in the metabolic processing of carbohydrates and amino acids. The objective of this study was to develop mechanical agitation devices, known as gas-inducing impellers, designed to promote the induction, dispersion, and homogeneous distribution of a gaseous phase in a liquid medium within Erlenmeyer flasks. These devices were applied in experiments involving *Bacillus subtilis*, a microorganism recognized for its biotechnological potential, aiming to enhance riboflavin production. Additionally, a comparison was conducted between two cultivation system sealing methods, using silicone and cotton stoppers. The impellers were designed using Autodesk® AutoCAD software, manufactured by 3D printing, and subsequently coupled to Erlenmeyer flasks. The results indicated that reductions in the geometric parameters of the blades, specifically height and base (mm), positively influenced riboflavin production. Regarding the sealing system, the cotton stopper showed superior performance compared to the silicone stopper, demonstrating greater efficiency under the experimental conditions.

**Keywords:** gas inducer; riboflavin; biotechnology; bioprocesses.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Formação de linhas de fluxos referentes a cada componente estudado: a) radial; b) axial e c) tangencial (Martini, 2010).....                                                                    | 17 |
| Figura 2 - Ilustração dos impelidores indutores de gás segundo a classificação de Patwardhan e Joshi (Abyaneh et al., 2024).....                                                                           | 21 |
| Figura 3 - Estrutura química da riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina) (Smalley et al., 2024). ....                                                                                             | 24 |
| Figura 4 - Estrutura do open rib em bactéria (Zhang et al. 2021). ....                                                                                                                                     | 26 |
| Figura 5- Esquema biossíntese de riboflavina por <i>Bacillus subtilis</i> (Averianova et al., 2020). ....                                                                                                  | 28 |
| Figura 6 - Renderização feita no software Autodesk® AutoCAD para elaboração dos impelidores indutores de gás a) Grupo controle- sem impelidor b) Esboço impelidor e c) Impelidor completo. ....            | 33 |
| Figura 7 - Renderização feita no software Autodesk® AutoCAD em relação às configurações dos nove impelidores desenvolvidos no presente trabalho: a) 1; b) 2; c) 3; d) 4; e) 5; f) 6; g) 7; h) 8; i) 9..... | 34 |
| Figura 8 - Banco de células <i>Bacillus subtilis</i> .....                                                                                                                                                 | 35 |
| Figura 9 - Meio de reativação (MR) autoclavado.....                                                                                                                                                        | 36 |
| Figura 10 - Meio de produção (MP).....                                                                                                                                                                     | 37 |
| Figura 11 - Cultivo em Shaker.....                                                                                                                                                                         | 38 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Materiais utilizados na confecção dos tampões e seus respectivos custos estimados (2026). ..... | 30 |
| Tabela 2 - Planejamento experimental dos impelidores desenvolvidos. ....                                   | 32 |
| Tabela 3 - Valores obtidos em relação à concentração celular em 600 nm. ....                               | 40 |
| Tabela 4 - Valores obtidos em relação à concentração de riboflavina em 445 nm. ....                        | 43 |
| Tabela 5- Resultados grupo de controle referente à leitura da concentração celular. ....                   | 45 |
| Tabela 6- Resultados grupo de controle referente à leitura da concentração da riboflavina. ....            | 46 |
| Tabela 7- Análises comparativas referentes ao tamponamento de silicone e algodão. ....                     | 48 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 1 - Diagrama de Pareto referente a DO.....                                                                         | 41 |
| Gráfico 2 - Gráfico de contorno referente a DO.....                                                                        | 42 |
| Gráfico 3 - Diagrama de Pareto referente à produção riboflavina.....                                                       | 44 |
| Gráfico 4 - Gráfico de contorno referente à produção da riboflavina. ....                                                  | 45 |
| Gráfico 5- Influência da geometria dos impelidores na produção de riboflavina. Fonte:<br>Elaborado pelo autor (2026). .... | 47 |
| Gráfico 6 - Análise comparativa referente ao tamponamento de algodão e silicone. ....                                      | 48 |

## SUMÁRIO

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                         | <b>13</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                           | <b>15</b> |
| 2.1 Objetivo geral .....                                                          | 15        |
| 2.2 Objetivos específicos .....                                                   | 15        |
| <b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>                                                 | <b>16</b> |
| 3.1 Impelidor indutor de gás.....                                                 | 19        |
| 3.2 Transferência de oxigênio para microrganismos aeróbios .....                  | 22        |
| 3.3 Riboflavina .....                                                             | 24        |
| 3.4 Biossíntese de riboflavina por <i>Bacillus subtilis</i> .....                 | 26        |
| 3.5 Importância do tamponamento para vedação em cultivos .....                    | 29        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                | <b>32</b> |
| 4.1 Modelagem e impressão 3D .....                                                | 32        |
| 4.2 Microrganismo.....                                                            | 34        |
| 4.3 Preservação do microrganismo.....                                             | 34        |
| 4.4 Meio de cultura de reativação (MR) .....                                      | 35        |
| 4.5 Meio de cultura de produção (MP) .....                                        | 36        |
| 4.6 Cultivo em frascos erlenmeyers .....                                          | 37        |
| 4.6.1 Reativação .....                                                            | 37        |
| 4.6.2 Inóculo .....                                                               | 37        |
| 4.6.3 Produção.....                                                               | 38        |
| 4.6.4 Condições de cultivo .....                                                  | 38        |
| 4.7 Determinação da concentração celular.....                                     | 38        |
| 4.8 Determinação de riboflavina .....                                             | 39        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>                                             | <b>40</b> |
| <b>5.1 Influência da geometria dos impelidores sobre a concentração celular .</b> | <b>40</b> |

|                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2 Influência da geometria dos impelidores sobre a produção de riboflavina .....         | 42        |
| 5.3 Comparação grupo de controle em relação ao cultivo na presença de<br>impelidores..... | 45        |
| 5.4 Comparação referente ao tamponamento de silicone e algodão .....                      | 48        |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                                       | <b>50</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                   | <b>51</b> |
| <b>ANEXO A – Curva de calibração da biomassa (Picão, 2021).....</b>                       | <b>56</b> |
| <b>APÊNDICE A- Curva de calibração da riboflavina .....</b>                               | <b>57</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A riboflavina (vitamina B2) é um micronutriente orgânico do complexo B, é uma molécula hidrossolúvel e essencial ao ser humano, isto é, não é sintetizada pelo organismo em quantidades suficientes, por isso, deve ser obtida através da dieta e suplementos (Simões et al., 2020). Na natureza, essa vitamina é sintetizada principalmente por microrganismos e plantas.

No organismo humano, a riboflavina é convertida a formas coenzimáticas ativas denominadas flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Estas coenzimas atuam como cofatores de inúmeras flavoproteínas que participam de reações de oxirredução. Isto é, são moléculas essenciais no metabolismo energético das células e na oxidação de carboidratos, lipídeos e aminoácidos (Powers, 2003; Simões et al., 2020).

Na biotecnologia, a produção industrial moderna é baseada em fermentação microbiana submersa pelas vantagens de sustentabilidade e produtividade e, como produtores destacam-se os microrganismos *Ashbya gossypii* e *Bacillus subtilis* para produção em escala (Averianova et al., 2020). Estes microrganismos podem ser alterados geneticamente otimizados a fim de aumentar o rendimento e a produtividade.

Os processos fermentativos são realizados em biorreatores aerados e agitados, podendo estes podem variar de escala laboratorial até plantas industriais. Alguns fatores críticos influenciam a produção, como por exemplo, a agitação mecânica, a estrutura do biorreator e a transferência de oxigênio (Schwechheimer et al., 2016). A agitação mecânica é fornecida por impelidores que são montados em eixo central e são responsáveis por misturar o meio de cultura, dispersar bolhas de ar e manter os microrganismos em suspensão homogênea.

Nos processos industriais com *Bacillus subtilis*, a produtividade depende de manter os níveis adequados de oxigênio dissolvido, visto que a fermentação é, em geral, estritamente aeróbia e frequentemente limitada por transferência de oxigênio (Schwechheimer et al., 2016).

A agitação e a mistura constituem operações fundamentais na maioria dos processos industriais e, tem como finalidade, a obtenção de matérias-primas ou

produtos com composição homogênea. Quando o sistema de agitação não é adequado podem ocorrer formações de misturas inadequadas, isso resulta em perdas de produção e comprometimento da qualidade final do produto (Costa *et al.*, 2019 *apud* Picão, 2021).

Diante do exposto, torna-se evidente que o adequado desempenho dos processos fermentativos está diretamente relacionado à eficiência dos sistemas de agitação e dispersão de gás. O desenvolvimento de impelidores de gás assume um papel estratégico, uma vez que estes influenciam parâmetros fundamentais durante os processos de produção da riboflavina. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é desenvolver um impelidor indutor de gás em frascos de erlenmeyer aplicado para cultivo de *Bacillus subtilis*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver um impelidor indutor de gás aplicado a frascos de Erlenmeyer visando à melhoria da transferência de oxigênio em sistemas de cultivo, bem como avaliar a influência de diferentes métodos de vedação sobre o desempenho do processo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Projetar e construir um impelidor indutor de gás utilizando modelagem em software e impressão 3D;
- Avaliar a aplicação de vedação com película de silicone no sistema de cultivo;
- Comparar o desempenho de diferentes materiais de vedação (silicone e algodão) quanto à eficiência na transferência de oxigênio;
- Analisar a produção de riboflavina por *Bacillus subtilis* utilizando os sistemas desenvolvidos, em comparação com o modelo padrão.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

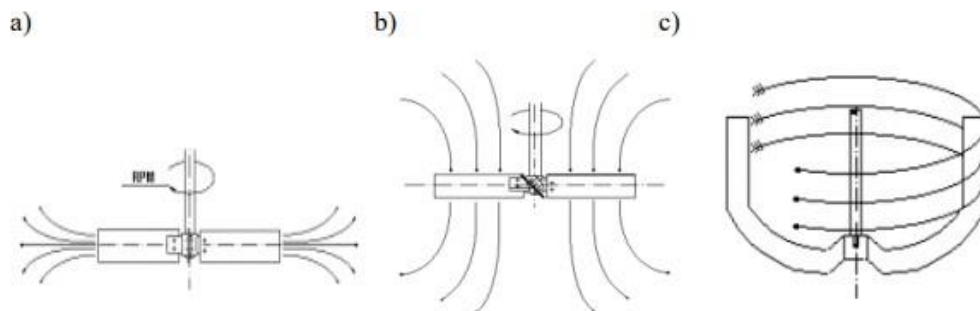
A produção em escala da riboflavina é considerada um marco dentro da biotecnologia industrial devido à sua ampla aplicação nutricional, sua relevância econômica e os avanços tecnológicos que permitiram a substituição de métodos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes. Segundo Averianova et al. (2020) a síntese fermentativa de riboflavina por microrganismos como *Ashbya gossypii* e *Bacillus subtilis* se mostrou mais econômica e sustentável, reduzindo etapas e custos associados à produção industrial.

Em bioprocessos, a transferência de oxigênio para o meio de cultivo é um fator limitante e exige atenção no projeto de um biorreator e na escolha de seus componentes, inclusive os impelidores de gás (Campos, 2021). Os impelidores apresentam múltiplas funções nos biorreatores agitados como homogeneização do material, transferência de oxigênio, transferência de calor, além de manter a uniformidade do meio durante todo o processo fermentativo (Lorenzini, 2012 *apud* Campos, 2021).

A utilização de impelidores para processos industriais que envolvem etapas de mistura possui inúmeras aplicabilidades em diversas áreas como indústria farmacêutica, alimentícia, química e petrolífera (Sato et al., 2020). Os impelidores são amplamente utilizados para a realização de misturas entre líquidos, sólido-líquido e dispersão de gás em líquidos (Guida et al., 2010 *apud* Freitas, 2020). Ao escolher uma determinada conformação de impelidor, informações referentes às propriedades do fluido, condições iniciais e características específicas do mesmo devem ser analisadas, pois a geometria do impelidor influencia a hidrodinâmica da mistura, o consumo de potência e a taxa de transferência de massa e energia (Tang et al., 2015 *apud* Almeida et al., 2021).

Durante o processo de agitação, o movimento do impelidor gera diferentes padrões de escoamento no fluido, sendo os principais o fluxo axial, radial e tangencial (Figura 1). A forma como esses padrões se distribui no interior do tanque influencia diretamente a homogeneidade da mistura, o nível de turbulência gerado e as forças de cisalhamento presentes no sistema. Esses fatores, por sua vez, desempenham papel fundamental na eficiência geral do processo de mistura (Xie, 2025).

**Figura 1** - Formação de linhas de fluxos referentes a cada componente estudado: a) radial; b) axial e c) tangencial (Martini, 2010).



Fonte: (Martini, 2010)

O fluxo axial corresponde ao movimento do fluido ao longo do eixo do impelidor, sendo normalmente gerado por impelidores com formato de hélice, como hélices marinhas ou turbinas de pás inclinadas. Esse tipo de escoamento promove um padrão de circulação vertical no tanque, geralmente de cima para baixo, o que favorece o processo de mistura. Devido à elevada taxa de escoamento associada a esse padrão e às suas características de cisalhamento relativamente baixas, o fluxo axial é particularmente indicado para sistemas com grandes volumes de fluido e baixa viscosidade. Em suspensões sólido-líquido, por exemplo, esse tipo de escoamento é frequentemente empregado para manter as partículas distribuídas de maneira uniforme no meio, evitando sua sedimentação. Na indústria de fermentação, o uso do fluxo axial também é comum, pois contribui para manter a distribuição homogênea de microrganismos no interior de biorreatores (Paul et al., 2004 *apud* Xie, 2025).

O fluxo tangencial corresponde ao movimento circular do fluido ao longo da direção horizontal do tanque, sendo gerado principalmente pela inércia do impelidor durante sua rotação. Esse padrão de escoamento tende a predominar em tanques que não possuem chicanas, condição na qual podem ocorrer a formação de vórtices e o aparecimento de recirculações nas regiões próximas às paredes do recipiente. Como consequência desse comportamento, a eficiência da mistura pode ser comprometida, uma vez que há menor movimentação do fluido nas direções axial e radial. Ainda assim, em determinadas aplicações o fluxo tangencial pode ser desejável, como em processos de cristalização, nos quais uma circulação mais suave do fluido é necessária (Nagata, 1975 *apud* Xie, 2025).

O fluxo radial caracteriza-se pela saída do fluido de forma perpendicular ao eixo do impelidor, deslocando-se em direção às paredes do tanque e, após o impacto, sendo redirecionado para cima ou para baixo. Esse tipo de escoamento é geralmente

produzido por turbinas de disco com pás planas, como a turbina Rushton. Esse padrão de fluxo gera elevadas forças de cisalhamento, sendo particularmente indicado para operações que requerem mistura local intensa. Entre essas aplicações estão processos como dispersão gás-líquido e emulsificação líquido-líquido. Na indústria química, por exemplo, esse tipo de escoamento é frequentemente empregado na produção de emulsões finas, além de ser utilizado no tratamento de águas residuais para aumentar a eficiência da transferência de oxigênio. Impelidores que geram escoamentos na direção radial apresentam grande eficiência na dispersão de gás em fases líquidas, devido às regiões de elevado cisalhamento formadas próximas às pás do impelidor. Entretanto, o padrão de circulação gerado tende a ser mais localizado, o que reduz sua eficiência em processos de mistura em grande escala quando utilizado isoladamente, sendo mais efetivo quando combinado com outros tipos de fluxo (Armenante et al., 1998 *apud* Xie, 2025).

A eficiência de mistura em biorreatores está diretamente relacionada ao tipo de impelidor utilizado e à configuração do sistema de agitação. Os impelidores empregados atualmente em aplicações biotecnológicas foram, em grande parte, originalmente desenvolvidos para outras áreas industriais, especialmente para processos da engenharia química. Dessa forma, diversos estudos já avaliaram o desempenho de diferentes tipos de impelidores e das configurações entre impelidor e tanque, considerando parâmetros como potência consumida, eficiência de mistura, número de fluxo, suspensão de partículas e comportamento da dinâmica dos fluidos. Como resultado, esses aspectos encontram-se amplamente documentados na literatura voltada à engenharia química (Lamotte et al., 2017; Ducci et al., 2008 *apud* Wyrobnik, et al., 2024).

O desenvolvimento de novos projetos de impelidores tem sido frequentemente baseado em modificações na geometria das pás, incluindo alterações no ângulo de inclinação, dimensões, espessura e orientação. Além disso, diferentes configurações entre o impelidor e o reator também têm sido investigadas com o objetivo de alterar os padrões de escoamento dentro do sistema. Entre essas variações, destacam-se a relação entre o diâmetro do impelidor e o diâmetro do tanque, bem como a distância do impelidor em relação ao fundo do reator. Estudos envolvendo diferentes tipos de impelidores, como turbinas Rushton, que são responsáveis por gerar fluxo radial e impelidores de pás inclinadas que geram fluxo axial, demonstram que essas modificações podem influenciar significativamente o comportamento do escoamento

no interior do reator (Hoseini et al., 2021; Steiros et al., 2017; Gu et al., 2017; Jirout e Rieger, 2011; Jossen et al., 2014; Loubière et al., 2019; Rotondi et al., 2021 *apud* Wyrobnik et al., 2024).

### 3.1 Impelidor indutor de gás

Processos que envolvem sistemas gás-líquido são frequentemente utilizados nos setores químico, bioquímico e farmacêutico, uma vez que possibilitam o contato eficiente entre as fases reagentes. Para promover essa interação, diferentes configurações de impelidores são utilizadas, entre as quais se destacam os impelidores de aeração superficial (SAR), os impelidores com injeção de gás (GSR) e os impelidores indutores de gás (GIR) (Abyaneh et al., 2024).

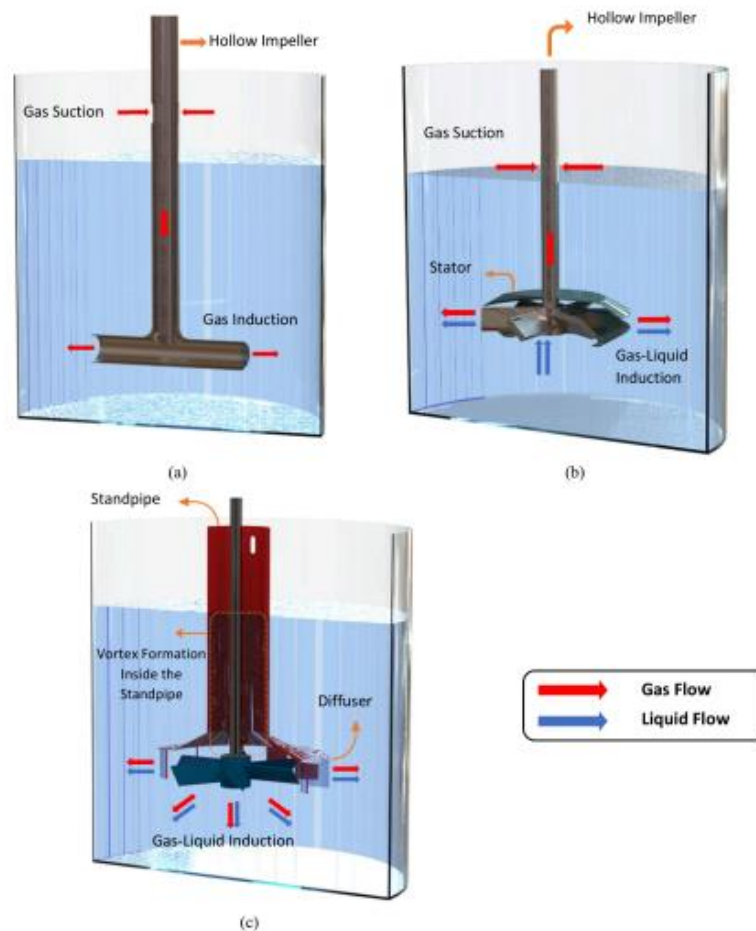
Nos reatores de aeração superficial (SAR), o gás é incorporado ao meio líquido a partir da interface gás-líquido por meio da ação de um impelidor posicionado próximo à superfície livre do fluido. Esse tipo de sistema é amplamente empregado em processos de tratamento de águas residuais, principalmente devido à sua eficiência na promoção da transferência de oxigênio para a fase líquida (Patil, S. S et al., 2004 *apud* Abyaneh et al., 2024).

Por outro lado, os reatores com injeção de gás (GSR) operam promovendo a dispersão de bolhas gasosas a partir da região inferior do reator, sendo frequentemente utilizados em processos industriais de maior escala. Apesar de sua ampla aplicação, esses sistemas apresentam algumas limitações operacionais, como a baixa conversão de gás por passagem. Esse comportamento está associado ao curto tempo de residência das bolhas no meio líquido, permitindo que parte do gás não reagido seja liberada do sistema. Além disso, o desempenho dos GSRs pode ser afetado pelo possível entupimento dos orifícios do difusor de gás por partículas sólidas, o que reduz a eficiência da dispersão gasosa. Nessas condições, torna-se frequentemente necessário o uso de equipamentos adicionais para promover a recirculação do gás não reagido, o que pode aumentar os custos operacionais do processo (Patwardhan; Joshi, 1999; Shah et al., 2012 *apud* Abyaneh et al., 2024).

Nesse contexto, os reatores com indução de gás (GIR) surgem como uma alternativa capaz de superar algumas das limitações observadas nos sistemas anteriores, uma vez que permitem a recirculação do gás não reagido presente no

espaço superior do reator de volta à fase líquida (Deshmukh et al, 2006 *apud* Abyaneh et al., 2024). Nesses sistemas, os impelidores indutores de gás operam gerando um gradiente de pressão durante sua rotação. Inicialmente, o nível do líquido no interior do eixo oco do impelidor permanece alinhado com o nível do líquido presente no reator. Com o aumento da velocidade de rotação, ocorre uma redução da pressão na região do orifício do impelidor, o que provoca a diminuição do nível do líquido no interior do eixo oco. Quando a velocidade crítica de operação é atingida, o sistema passa a gerar um efeito de sucção, aspirando o gás do espaço superior do reator e reinserindo-o na fase líquida. Dessa forma, elimina-se a necessidade de compressores para a recirculação do gás, contribuindo para a redução dos custos de capital do processo. Devido a essas características operacionais, os GIRs têm sido amplamente aplicados em diferentes processos industriais, incluindo o tratamento de águas residuais, a produção de vinagre, a produção de biocombustíveis e o cultivo de microrganismos. Além disso, esses sistemas são particularmente adequados para aplicações nas quais a recirculação externa de gás pode representar riscos operacionais, como em processos de hidrogenação, alquilação ou cloração (Sardeing, et al., 2006 *apud* Abyaneh et al., 2024). A figura 2 a seguir ilustra esquematização operação dos impelidores indutores de gás segundo a classificação de Patwardhan e Joshi.

**Figura 2** - Ilustração dos impelidores indutores de gás segundo a classificação de Patwardhan e Joshi (Abyaneh et al., 2024).



Fonte: (Abyaneh et al., 2024).

A Figura 2 apresenta a classificação dos sistemas de indução de gás proposta por Patwardhan e Joshi, na qual os impelidores são agrupados em três categorias distintas com base em suas características mecânicas e na forma de indução do gás. Essa classificação é fundamental visto que, com ela é possível compreender os princípios operacionais envolvidos na indução e dispersão de gás, permitindo correlacionar aspectos de projeto dos impelidores com seu desempenho hidrodinâmico e potencial aplicação em bioprocessos biotecnológicos. O tipo 11 (a) é caracterizado pela presença de um eixo oco acoplado a um impelidor que possui entradas e saídas exclusivas para o gás, sendo considerado a configuração mais simples, na qual o gás é conduzido diretamente até a região de dispersão. No tipo 12 (b), embora também haja a utilização de eixo oco, o sistema incorpora componentes adicionais, como difusores, que apresentam entradas para a fase líquida, permitindo que o processo de indução ocorra simultaneamente nas fases

gás e líquido, além de possibilitar maior controle da introdução e dispersão do gás. Por fim, o tipo 22 (c) é composto por um impelidor convencional associado a um tubo de indução junto ao difusor, sendo a principal distinção em relação aos demais a ausência da necessidade de um impelidor oco, uma vez que o gás é conduzido externamente até a zona de mistura. Essa configuração permite a utilização de impelidores convencionais sem modificações estruturais significativas, mantendo a capacidade de autoindução e promovendo a dispersão simultânea das fases (Patwardhan;Joshi, 1999; Shah et al., 2012 *apud* Abyaneh et al., 2024).

### **3.2 Transferência de oxigênio para microrganismos aeróbios**

Processos biotecnológicos que envolvem o cultivo de células em condições aeróbias apresentam elevada relevância industrial, uma vez que diversos produtos, como vitaminas, antibióticos e inoculantes, são obtidos por essa via. Entretanto, a viabilidade desses processos depende do adequado dimensionamento da transferência de oxigênio, que consiste na dissolução do oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, onde será consumido pelos microrganismos durante a respiração celular. Do ponto de vista bioquímico, o oxigênio atua comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória, sendo reduzido a água. Esse processo possibilita a reoxidação de coenzimas envolvidas em reações de desidrogenação, como as que ocorrem na glicólise e no ciclo de Krebs, além de viabilizar a síntese de ATP a partir de ADP. O ATP, por sua vez, fornece energia para reações metabólicas essenciais, incluindo a síntese de biomoléculas e a multiplicação celular (Schmidell et al., 2001 *apud* Heinen, 2018).

A aplicação de altas taxas de agitação e aeração, visando suprir a demanda de oxigênio, pode, contudo, favorecer a formação rápida de espumas estáveis, ocasionando problemas operacionais significativos e comprometendo a viabilidade do processo (Kronemberger et al. 2008; Ha et al. 2018; Deng et al. 2022 *apud* Martins et al., 2025). Dessa forma, o fornecimento de oxigênio deve ser equilibrado de modo a atender às necessidades metabólicas sem gerar complicações operacionais. Diante dessas limitações, estratégias adicionais de controle tornam-se necessárias para manter a estabilidade do processo.

Em muitas situações, torna-se necessário interromper as fermentações ou adicionar agentes antiespumantes para controlar a formação excessiva de espuma

(Chen et al., 2006 *apud* Martins et al., 2025). No entanto, o uso desses agentes não é considerado ideal, pois pode reduzir a taxa de transferência de oxigênio, aumentar os custos de produção e introduzir componentes adicionais que necessitam ser removidos em etapas downstream (Davis et al., 2001; Guez et al., 2008; Winterburn et al., 2010 *apud* Martins et al., 2025). Portanto, o sucesso do processo depende de um equilíbrio delicado entre oxigenação adequada e controle da formação de espuma. Essa necessidade de equilíbrio evidencia a complexidade inerente aos bioprocessos aeróbios industriais.

A maioria dos processos microbianos industriais ocorre em condições aeróbias, geralmente em meios aquosos contendo sais e compostos orgânicos, que frequentemente apresentam alta viscosidade e comportamento não newtoniano. Nesse contexto, a transferência de massa gás-líquido tem sido amplamente estudada em bioprocessos aeróbios, uma vez que a disponibilidade de oxigênio frequentemente constitui um fator limitante ao crescimento celular e à formação de produtos de interesse. Dessa forma, diversas estratégias têm sido propostas para aumentar a eficiência da transferência de oxigênio, incluindo modificações na geometria dos impelidores, alterações nas condições hidrodinâmicas do sistema e o desenvolvimento de dispositivos capazes de intensificar a dispersão da fase gasosa. Tais abordagens visam elevar o coeficiente volumétrico de transferência de massa ( $k_La$ ), considerado um dos principais parâmetros para a avaliação do desempenho de sistemas aerados (Garcia-Ochoa et al., 2000; Calik et al., 2004; Liu et al., 2006 *apud* Ochoa et al., 2009). Consequentemente, garantir uma transferência eficiente de oxigênio da fase gasosa para o meio de cultivo é fundamental para o sucesso dos bioprocessos. Para isso, torna-se necessário quantificar e compreender os parâmetros que governam esse fenômeno.

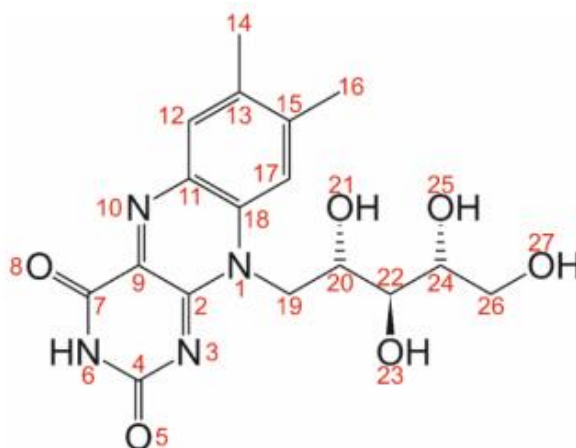
A determinação precisa da taxa de transferência de oxigênio (OTR) é, portanto, crucial em culturas aeróbias, pois permite prever o crescimento celular e a produção de metabólitos, sendo essencial para o planejamento, projeto e escalonamento de biorreatores. Além disso, os bioprocessos são conduzidos sob condições previamente otimizadas de temperatura, pH, pressão, agitação e concentrações de biomassa e nutrientes, com modos operacionais definidos (batelada, batelada alimentada, células em repouso ou contínuo). A OTR é influenciada por múltiplos fatores, incluindo propriedades físicas do gás e do líquido, geometria do biorreator, condições operacionais e consumo de oxigênio pelas células, tornando sua medição direta

complexa. Portanto, o controle e a otimização da transferência de oxigênio constituem elementos centrais para a eficiência, viabilidade e escalabilidade de processos aeróbios industriais (Van et al., 1992; Benbelkacem et al., 2003 *apud* Ochoa et al., 2009).

### 3.3 Riboflavina

A riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina) (Figura 3) é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B2, que apresenta coloração amarela e fluorescente (Powers, 2003 *apud* Souza et al., 2005). Ela atua principalmente como molécula precursora na formação intracelular de nucleotídeos e coenzimas flavínicas, como o mononucleotídeo de flavina (FMN) e o dinucleotídeo de adenina flavina (FAD), os quais desempenham papel fundamental como coenzimas em reações de oxirredução no metabolismo celular (Abbas et al., 2011 *apud* Liu et al., 2023). Dessa forma, a riboflavina destaca-se como uma vitamina indispensável para o funcionamento adequado do metabolismo

**Figura 3** - Estrutura química da riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina) (Smalley et al., 2024).



Fonte: (Smalley et al., 2024).

Vale ressaltar que as células de mamíferos não são capazes de sintetizar a riboflavina, portanto, se faz necessário obter essa vitamina por meio da suplementação e alimentação. Além disso, podemos encontrar a Riboflavina em ingredientes cosméticos e produtos de saúde (Yang et al., 2021).

Atualmente, aproximadamente 70% do uso comercial da riboflavina está voltado para o ramo de aditivo alimentar, já os outros 30% são utilizados para

aplicações farmacêuticas. Alguns exemplos de alimentos ricos em vitamina B2 são, principalmente, os de origem animal, como: leite, queijos, iogurtes, ovos e vegetais folhosos (Schwechheimer et al., 2016; Wang et al., 2019 *apud* Liu et al., 2023).

Em relação à rota química, a produção por via microbiana apresenta benefícios significativos, incluindo redução de custos, menor tempo de processo e menor impacto ambiental. Por esse motivo, os processos biotecnológicos vêm progressivamente substituindo os métodos químicos tradicionais na obtenção de riboflavina (Liu et al., 2023).

Entre os microrganismos mais investigados quanto às vias metabólicas envolvidas na biossíntese de riboflavina e aos mecanismos de regulação gênica destacam-se *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii* e *Corynebacterium ammoniagenes* (Averianova et al., 2020 *apud* Liu et al., 2023).

No contexto industrial atual, a produção em larga escala dessa vitamina é realizada predominantemente utilizando o fungo *A. gossypii* e a bactéria *B. subtilis*. Dentre elas a bactéria *B. subtilis* possui vantagens como ciclo de fermentação mais curto, alto rendimento e requisitos mais simples de matéria-prima. Por isso, tem demonstrado forte competitividade na indústria de fermentação microbiana para produção de riboflavina (Perkins et al., 1999 *apud* Liu et al., 2023).

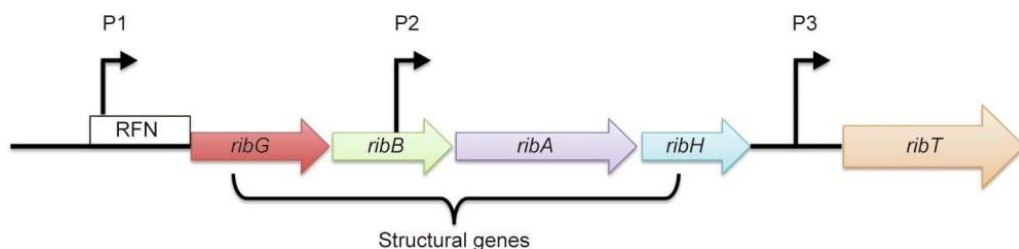
Além de sua importância nutricional e fisiológica, a riboflavina apresenta ampla aplicação industrial. De acordo com Souza et al. (2005), essa vitamina é utilizada na fortificação de alimentos e rações animais, bem como na formulação de produtos farmacêuticos e cosméticos. Adicionalmente, a riboflavina é empregada na indústria alimentícia como corante natural de coloração amarela, sendo regulamentada como aditivo alimentar sob o código E101 (EFSA, 2013). Sua utilização como corante é favorecida pela capacidade de conferir tonalidades amarelas a produtos alimentícios, contribuindo simultaneamente para o enriquecimento nutricional com vitamina B2. Em razão de suas diversas aplicações industriais, a demanda por riboflavina tem impulsionado o desenvolvimento de processos biotecnológicos mais eficientes e sustentáveis para sua produção em larga escala.

### 3.4 Biossíntese de riboflavina por *Bacillus subtilis*

O microrganismo *Bacillus subtilis* utiliza carboidratos como principal fonte de carbono. A biossíntese de riboflavina (RF) inicia-se a partir dos precursores trifosfato de guanosina (GTP) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), sendo que a RF formada pode posteriormente ser convertida em mononucleotídeo de flavina (FMN) e dinucleotídeo de adenina flavina (FAD). A formação de FMN e FAD confere relevância biológica à riboflavina, uma vez que esses cofatores participam de múltiplas vias metabólicas relacionadas ao transporte de elétrons, respiração celular e metabolismo energético. As rotas metabólicas envolvidas desde o consumo do substrato até a produção de flavinas incluem processos como  $\beta$ -oxidação, ciclo do glicerato, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), gliconeogênese, via das pentoses fosfato (ramo oxidativo), via das purinas e a própria via de biossíntese de flavinas (LIU et al., 2020 *apud* Picão.,2021).

A engenharia biotecnológica de cepas com alta produção de flavinas baseia-se, de modo geral, na superexpressão de genes envolvidos nas vias metabólicas de interesse, na eliminação de rotas concorrentes e na inativação de genes regulatórios associados à repressão enzimática. Em *Bacillus subtilis*, a biossíntese de riboflavina (RF) é predominantemente regulada pelo operon rib, composto por cinco genes: ribDG, ribE, ribAB, ribH e ribT (Figura 4). Nesse contexto, a superexpressão dos genes diretamente relacionados à síntese de RF constitui uma das estratégias mais empregadas para aumentar sua produção em *B. subtilis* (Pedrolli et al., 2015 *apud* Picão.,2021).

**Figura 4** - Estrutura do open rib em bactéria (Zhang et al. 2021).

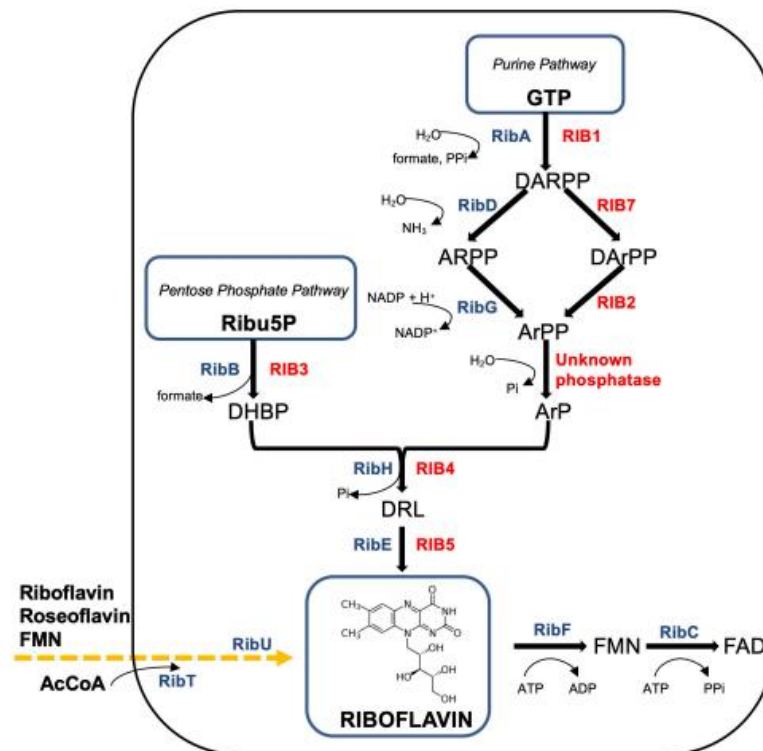


Fonte: (Zhang et al. 2021).

A etapa inicial da via de purinas envolvida na biossíntese de riboflavina ocorre de forma semelhante entre diferentes microrganismos, iniciando-se pela transformação do GTP em 2,5-diamino-6-ribosil-amino-4(3H)pirimidinodiona 5'-fosfato (DARPP), além da formação de formiato e pirofosfato, reação catalisada pela enzima GTP ciclohidrolase II (Liu et al., 2020 *apud* Averianova et al., 2020). Em *A. gossypii*, essa enzima é codificada pelo gene RIB1, enquanto em *B. subtilis* é codificada pelo gene híbrido bifuncional *ribAB* (Figura 5). Estudos demonstram que a superexpressão do gene *ribAB* em *B. subtilis* promoveu um aumento de aproximadamente 25% na produção de riboflavina, sugerindo que essa etapa representa um possível ponto limitante da via biossintética (Hümbelin et al., 1999 *apud* Averianova et al., 2020).

Em seguida, o DARPP é transformado em 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)pirimidinodiona (ArP) por meio de uma sequência de reações que envolvem desaminação, redução da cadeia lateral e desfosforilação. No caso de *A. gossypii*, essa conversão ocorre inicialmente por uma etapa de redução, seguida de desaminação, catalisadas respectivamente pelas enzimas DARPP redutase (codificada por *RIB7*) e DArPP desaminase (codificada por *RIB2*), resultando na formação de 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)pirimidinodiona 5'-fosfato (ArPP). Por outro lado, em *B. subtilis* — assim como em plantas — a sequência dessas reações ocorre de maneira inversa, com a desaminação precedendo a redução, sendo ambas catalisadas por uma enzima bifuncional codificada pelo gene *ribDG* (Pedrolli et al., 2015; Revuelta et al., 2016 *apud* Averianova et al., 2020).

**Figura 5** - Esquema biossíntese de riboflavina por *Bacillus subtilis* (Averianova et al., 2020).



Fonte: (Averianova et al., 2020)

A etapa seguinte pode envolver a desfosforilação de ArPP (Figura 5). Entretanto, o mecanismo responsável por essa reação, assim como a identificação da fosfatase que converte ArPP em ArP, ainda não está completamente esclarecido na via de biossíntese de riboflavina, apesar de diversos estudos já terem investigado a origem dos quatro carbonos presentes em ArP. Em plantas, como *Arabidopsis*, foi identificada uma fosfatase específica capaz de catalisar essa conversão, dentre oito enzimas pertencentes à superfamília das desidrogenases de haloácidos (HAD). Por outro lado, em *B. subtilis*, a investigação por enzimas com funções promíscuas semelhantes não conseguiu apontar um candidato responsável por essa atividade (Sa et al., 2016 *apud* Averianova et al., 2020).

A via alternativa derivada das pentoses fosfato na biossíntese de riboflavina envolve a conversão do Rib5P em 3,4-diidroxi-2-butanona-4-fosfato (DHBP), reação catalisada pela enzima DHBP sintase. Em *A. gossypii*, essa etapa é codificada pelo gene *RIB3*, enquanto em *B. subtilis* está associada ao gene *ribAB*. Cabe destacar que, em *B. subtilis*, o produto do gene *ribAB* corresponde a uma enzima bifuncional, que reúne as atividades de GTP ciclodrolase II e DHBP sintase. Dessa forma, essa

proteína é capaz de catalisar tanto a clivagem do GTP quanto a formação de DHBP a partir de Rib5P, atuando nas etapas iniciais das duas ramificações da via de biossíntese de riboflavina (Averianova et al., 2020).

Em etapas posteriores, as duas ramificações da via biossintética da riboflavina passam a convergir em uma única rota metabólica. A partir da condensação entre ArP e DHBP, ocorre a formação de 6,7-dimetil-8-ribitilumazina (DRL), reação catalisada pela enzima DRL sintase, também conhecida como lumazina sintase. Em *A. gossypii*, essa enzima é codificada pelo gene *RIB4*, enquanto em *B. subtilis* corresponde ao gene *ribH* (subunidade beta). Além disso, em conjunto com o produto do gene *ribE* (subunidade alfa, associada à riboflavina sintase), forma-se um complexo pós-traducional do tipo lumazina sintase/riboflavina sintase, com organização estrutural RibE e RibH (Schwechheimer et al., 2016; Han e Woycechowsky, 2017 *apud* Averianova et al., 2020).

### 3.5 Importância do tamponamento para vedação em cultivos

Em cultivos microbiológicos conduzidos em frascos do tipo erlenmeyer, a manutenção de condições assépticas é essencial para garantir a confiabilidade dos resultados experimentais. A presença de microrganismos contaminantes pode interferir no crescimento celular e na produção de metabólitos, uma vez que esses organismos competem por nutrientes e podem alterar o metabolismo do sistema (Madigan et al., 2016).

Para evitar contaminações provenientes do ambiente externo, são utilizados sistemas de vedação nos recipientes de cultivo. Entre esses, os tampões de algodão são amplamente empregados em práticas laboratoriais, principalmente devido à sua simplicidade, baixo custo e eficiência na proteção do sistema.

Os tampões de algodão atuam como uma barreira física, reduzindo a entrada de partículas e microrganismos presentes no ar. Essa função está associada à sua estrutura fibrosa, que promove retenção mecânica de contaminantes, sendo um princípio básico de filtração em meios porosos (Madigan et al., 2016).

Além da função de proteção, o sistema de vedação deve permitir a troca gasosa entre o interior do frasco e o ambiente externo. Em cultivos aeróbios, o oxigênio é um nutriente essencial, atuando como acceptor final de elétrons no metabolismo celular e

sendo determinante para o crescimento microbiano e produção de metabólitos (Garcia-choa et al., 2009).

Nesse contexto, a presença de sistemas de vedação pode influenciar a transferência de oxigênio, uma vez que introduz uma resistência adicional à de gases. Estudos clássicos em cultivos agitados demonstram que a configuração do fechamento dos frascos pode alterar a taxa de transferência de oxigênio e a composição gasosa no interior do sistema, especialmente em condições de alta demanda metabólica (Finn, 1974 *apud* Corman et al., 1975).

Dessa forma, o sistema de vedação deve ser selecionado considerando um equilíbrio entre a prevenção de contaminação e a eficiência da transferência de oxigênio, fatores fundamentais para o desempenho do cultivo.

**Tabela 1** - Materiais utilizados na confecção dos tampões e seus respectivos custos estimados (2026).

| Tamponamento | Ilustração                                                                          | Material             | Unidade comercial      | Custo estimado (R\$) |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| Algodão      |  | Algodão hidrofóbico  | Pacote (50–100 g)      | 10,00 – 25,00        |
|              |  | Gaze hidrofóbico     | Pacote (~100 unidades) | 15,00 – 40,00        |
|              |  | Barbante             | Rolo (~100 m)          | 10,00 – 25,00        |
| Silicone     |  | Película de silicone | Unidade                | 20,00 – 60,00        |

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

O tampão de algodão foi selecionado por ser amplamente empregado em cultivos em frascos erlenmeyer, devido à sua capacidade de atuar simultaneamente como barreira física à contaminação e como meio permeável à difusão gasosa, sendo considerado um padrão em práticas laboratoriais microbiológicas (Madigan et al., 2016). Por outro lado, a película de silicone foi escolhida como alternativa de vedação devido às suas propriedades físico-químicas, como flexibilidade, resistência térmica e possibilidade de esterilização por autoclavagem. Diferentemente do algodão, o silicone apresenta características de menor porosidade, podendo atuar como uma barreira mais eficiente contra contaminantes, porém com potencial impacto na transferência de gases (Suresh et al., 2009).

Dessa forma, a comparação entre os dois materiais permitiu avaliar o efeito do sistema de vedação sobre o desempenho do cultivo, considerando simultaneamente aspectos de assepsia e de transferência de oxigênio, fatores diretamente relacionados ao crescimento microbiano e à produção de riboflavina. Nesse sentido, estudos que avaliam a influência dos sistemas de vedação sobre a transferência de massa são importantes para a otimização de cultivos aeróbios, permitindo a seleção de materiais que conciliem eficiência na troca gasosa, controle de contaminação e viabilidade operacional em aplicações biotecnológicas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos de forma sequencial, envolvendo as etapas de planejamento experimental, desenvolvimento dos impelidores, preparo do microrganismo, condução dos cultivos em frascos erlenmeyer e análises dos parâmetros de crescimento celular e produção de riboflavina.

### 4.1 Modelagem e impressão 3D

O planejamento experimental foi elaborado com o auxílio do software Minitab, conforme apresentado na Tabela 2. Nessa etapa, foram definidos os parâmetros geométricos dos impelidores, incluindo a base (mm) e a altura das pás (mm), bem como o número de ensaios realizados.

Foram avaliados diferentes modelos de impelidores, totalizando nove configurações distintas. Vale ressaltar que o impelidor 1 foi replicado três vezes ao longo do experimento, com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

**Tabela 2** - Planejamento experimental dos impelidores desenvolvidos.

| Impelidor | Base (mm) | Altura (mm) |
|-----------|-----------|-------------|
| 1         | 10        | 20          |
| 2         | 5         | 10          |
| 3         | 15        | 10          |
| 4         | 5         | 30          |
| 5         | 15        | 30          |
| 6         | 3         | 20          |
| 7         | 17        | 20          |
| 8         | 10        | 6           |
| 9         | 10        | 34          |

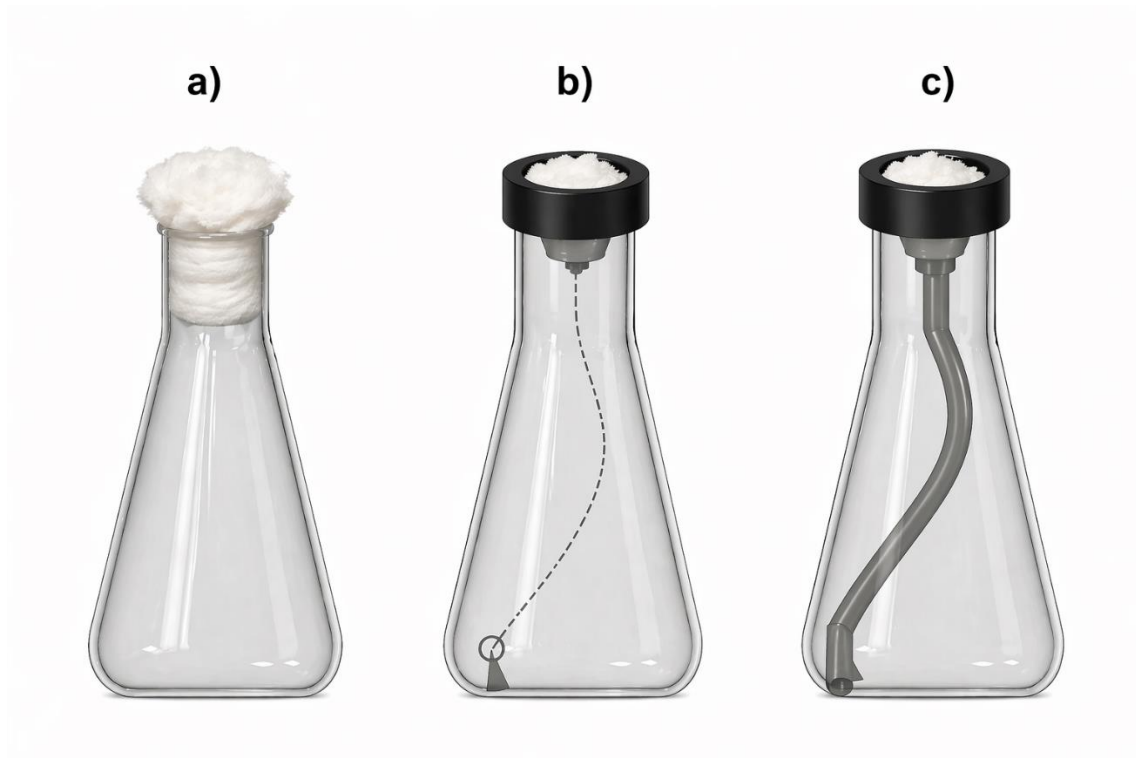
Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Os impelidores indutores de gás foram projetados com o auxílio do software Autodesk® AutoCAD, considerando diferentes variações geométricas de base e altura das pás. Após a etapa de modelagem, os impelidores foram produzidos por meio de impressão 3D Creality Ender-3, empregando filamento de ácido polilático (PLA). A impressão foi realizada por meio da tecnologia Fused Deposition Modeling (FDM), na

qual o filamento termoplástico é fundido em um bico extrusor aquecido e depositado sucessivamente em camadas, formando a peça tridimensional a partir do modelo digital previamente desenvolvido. O equipamento dispõe de uma mesa aquecida, que auxilia na adesão das primeiras camadas ao leito de impressão e contribui para a estabilidade dimensional das peças durante o processo de fabricação. A escolha dessa tecnologia deve-se à sua capacidade de produzir peças com boa precisão dimensional, adequado acabamento superficial e baixo custo de fabricação, características importantes para a produção dos impelidores utilizados neste estudo e posteriormente acoplados aos sistemas de cultivo em frascos erlenmeyer, sendo utilizados para promover a agitação e a indução de gás durante os experimentos.

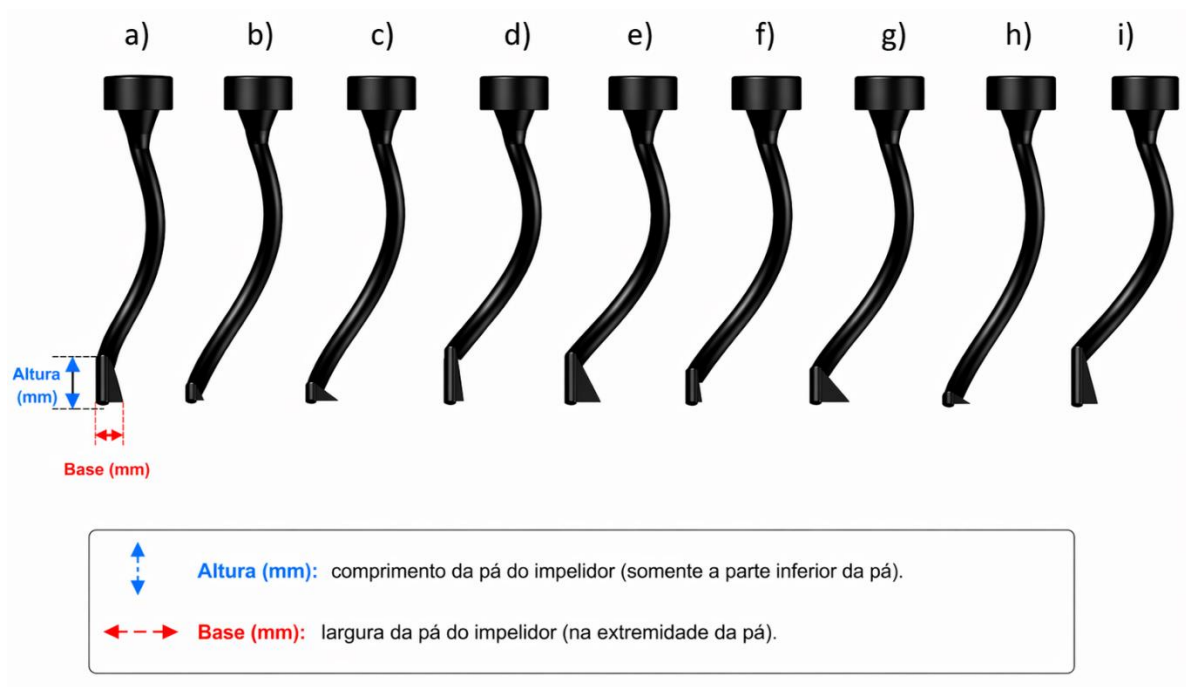
A Figura 6 apresenta a renderização do frasco erlenmeyer (A), bem como as configurações dos impelidores empregados (B) e (C), enquanto a Figura 7 ilustra os nove impelidores desenvolvidos neste estudo. Vale ressaltar que, as pás dos impelidores foram inclinadas a  $60^\circ$ , com o objetivo de intensificar os padrões de escoamento e promover maior interação entre o fluido e as paredes do erlenmeyer durante a agitação a 220 rpm.

**Figura 6** - Renderização feita no software Autodesk® AutoCAD para elaboração dos impelidores indutores de gás a) Grupo controle- sem impelidor b) Esboço impelidor e c) Impelidor completo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

**Figura 7** - Renderização feita no software Autodesk® AutoCAD em relação às configurações dos nove impelidores desenvolvidos no presente trabalho: a) 1; b) 2; c) 3; d) 4; e) 5; f) 6; g) 7; h) 8; i) 9.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

## 4.2 Microrganismo

Foi utilizado o microrganismo *Bacillus subtilis* superprodutor de riboflavina (RF) geneticamente modificado, conservado em criotubos contendo 40% de glicerol à temperatura de -80°C em ultra freezer modelo THERMO FORMA® (Picão, 2021).

## 4.3 Preservação do microrganismo

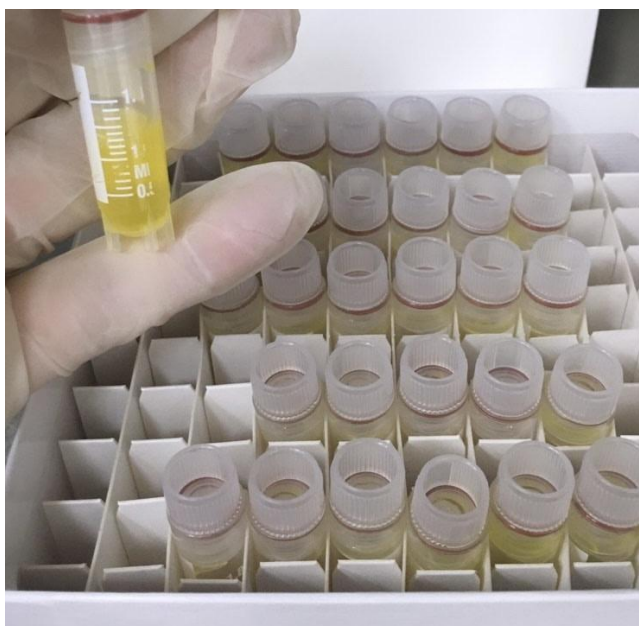
Para a preparação do pré-inóculo da cepa de *Bacillus subtilis* geneticamente modificada e superprodutora de riboflavina (RF), foi utilizado meio líquido contendo 20 g·L<sup>-1</sup> de componente Luria-Bertani (LB) e 20 g·L<sup>-1</sup> de sacarose. O cultivo foi conduzido sob agitação orbital de 220 rpm, a 37 °C, por aproximadamente 16–18 horas (overnight), visando a obtenção de células em fase exponencial de crescimento (Picão, 2021).

A partir do cultivo obtido, foi retirada uma alíquota de 720 µL, a qual foi transferida assepticamente para criotubos estéreis (Figura 8). Em seguida, foram adicionados 480 µL de solução de glicerol a 50% (v/v), utilizado como agente

crioprotetor, totalizando um volume final de 1200  $\mu\text{L}$ . O glicerol atua na proteção das células durante o congelamento, reduzindo a formação de cristais de gelo intracelulares e preservando a viabilidade celular (Picão, 2021).

Posteriormente, os criotubos foram armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , condição que permite a conservação de longo prazo da cepa com manutenção de suas características fisiológicas e produtivas (Picão, 2021).

**Figura 8** - Banco de células *Bacillus subtilis*



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

#### **4.4 Meio de cultura de reativação (MR)**

O meio de cultura empregado na etapa de reativação foi composto por meio LB na concentração de  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , suplementado com  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarose, conforme apresentado na Figura 9 (Picão, 2021).

**Figura 9** - Meio de reativação (MR) autoclavado.



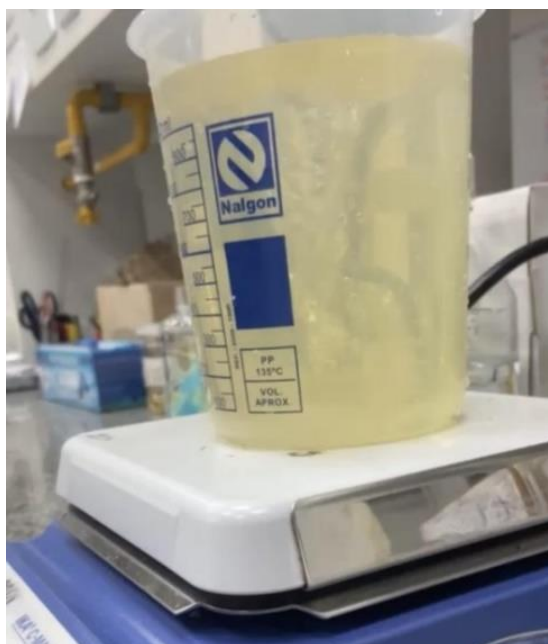
Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

#### **4.5 Meio de cultura de produção (MP)**

Para a elaboração do meio de cultura de produção (MP) (Figura 10), foram utilizados os seguintes componentes:  $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarose;  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura;  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ );  $0,333 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ );  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de fosfato dissódico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ );  $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ );  $0,0075 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ); e  $0,006 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sulfato de manganês monohidratado ( $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e  $0,006 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sulfato de ferro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Picão, 2021).

Após a completa dissolução dos componentes sob agitação orbital, o pH do meio foi ajustado para 7,0, sendo posteriormente submetido ao processo de esterilização (Wang et al. 2018 *apud* Picão, 2021).

**Figura 10** - Meio de produção (MP).



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

## **4.6 Cultivo em frascos Erlenmeyer**

### **4.6.1 Reativação**

Para elaboração do meio de reativação (MR) composto de LB 20 g.L<sup>-1</sup> e sacarose 20 g.L<sup>-1</sup> e misturados a 100 ml de água destilada. Logo após a mistura foram adicionados 10 ml de MR em 2 falcons (50 mL) e autoclavados. Depois desta etapa, foram adicionados em cada falcon o conteúdo de um criotubo contendo cepa de *B. subtilis* superprodutor de RF. Os Falcons foram mantidos em 220 rpm a 37°C por 24h (Picão, 2021).

### **4.6.2 Inóculo**

Nesta etapa foram adicionados 10 mL de meio contidos nos 2 Falcons após o processo de reativação em 2 frascos de erlenmeyers (500 mL) contendo 90 mL cada de MR já autoclavado. Os frascos foram mantidos em 220 rpm a 37°C por 24h (Picão, 2021).

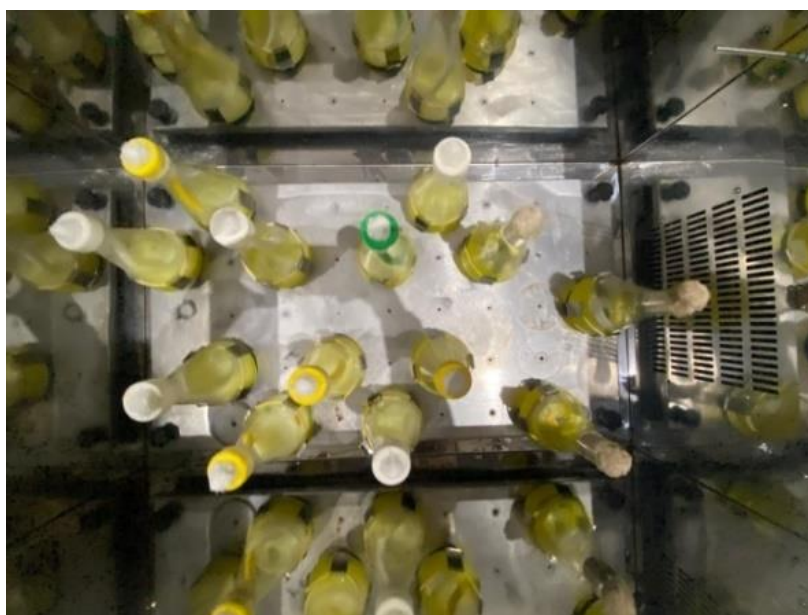
#### 4.6.3 Produção

Ao final do processo de Inóculo o meio contido nos 2 frascos de erlenmeyers serão reunidos e um volume de 10 mL foi transferido para 14 frascos de erlenmeyers (500 mL) já contendo 90 mL cada de MP já autoclavado. Logo em seguida os impelidores foram acoplados e mantidos à 220 rpm a 37°C por 48h (Picão, 2021).

#### 4.6.4 Condições de cultivo

A etapa de produção foi conduzida a partir do inóculo previamente preparado, sob condições controladas de temperatura, agitação e volume de trabalho, conforme estabelecido no planejamento experimental (Picão, 2021). Os cultivos foram realizados em shaker de agitação a 220 rpm e 37°C (Figura 11).

**Figura 11** - Cultivo em Shake.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

#### 4.7 Determinação da concentração celular

Foram realizadas análises para quantificação da densidade celular através da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro GENESYS 10S, THERMO SCIENTIFIC®. As amostras foram diluídas com água destilada, totalizando um volume

de 2 mL por cubeta. A cubeta contendo só meio de cultura foi utilizada como branco (Jesuino, 2019 *apud* Picão, 2021). Ressalta-se que, para todas as amostras, os valores obtidos foram previamente multiplicados por 10, em função da diluição de 10 vezes realizada. A conversão dos valores de absorbância em concentração celular foi realizada por meio da curva de calibração apresentada no Anexo A.

#### **4.8 Determinação de riboflavina**

Para análise da concentração de riboflavina nas amostras, uma alíquota foi retirada e centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e separado para a leitura em 445 nm em espectrofotômetro GENESYS 10S, THERMO SCIENTIFIC® (Picão, 2021). Ressalta-se que, para todas as amostras, os valores obtidos foram previamente multiplicados por 100, em função da diluição de 100 vezes realizada. A determinação da concentração de riboflavina foi realizada com base na curva de calibração apresentada no Apêndice A.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o objetivo de avaliar a influência da geometria dos impelidores na produção de riboflavina e no crescimento celular de *Bacillus subtilis*, foram realizados experimentos variando-se os parâmetros de base e altura das pás. Os resultados obtidos, bem como sua interpretação, são apresentados de forma integrada a seguir.

### 5.1 Influência da geometria dos impelidores sobre a concentração celular

A partir da curva de calibração utilizada, foi possível converter os valores de absorbância em concentração celular de biomassa e, assim, comparar o efeito das diferentes configurações geométricas dos impelidores sobre o crescimento celular de *Bacillus subtilis*. Os resultados apresentados na Tabela 3 evidenciam que a geometria do impelidor influenciou diretamente a concentração celular obtida ao final dos cultivos. Entre os sistemas avaliados, o impelidor 2 apresentou a maior média de biomassa (5,96), seguido do impelidor 6 (5,35). Em contrapartida, os impelidores 4, 5 e 9 apresentaram os menores valores médios, correspondendo a 0,65, 0,71 e 0,75, respectivamente. As repetições realizadas para o impelidor 1 resultaram em médias de 4,99, 4,81 e 4,95, indicando boa reprodutibilidade experimental.

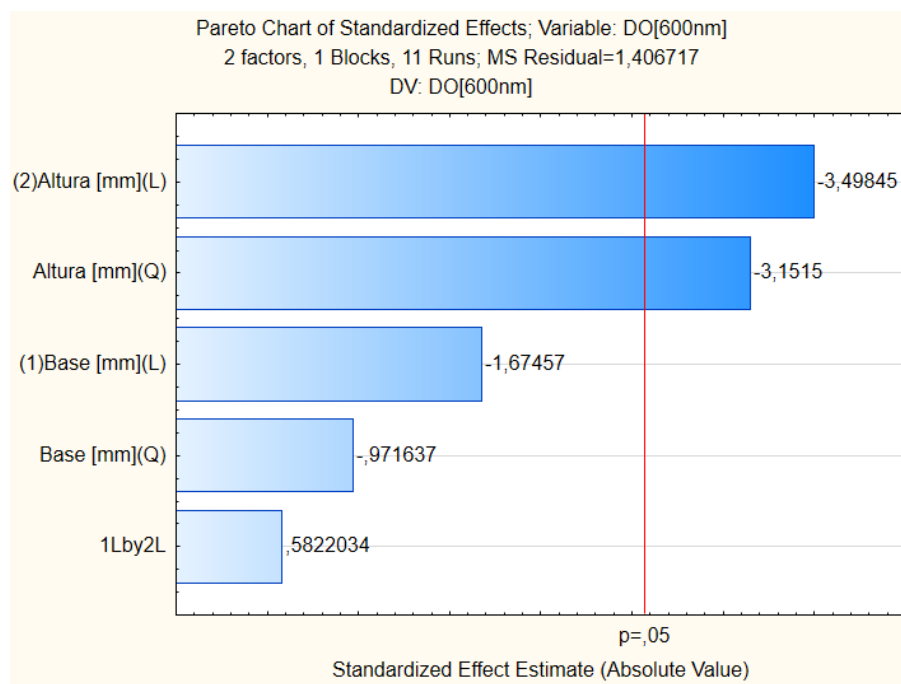
**Tabela 3** - Valores obtidos em relação à concentração celular em 600 nm.

| Cultivo     | Leitura DO<br>(600 nm) |      |      | Concentração<br>biomassa<br>$y=0,5134 x$ |      |      | Média<br>Biomassa |
|-------------|------------------------|------|------|------------------------------------------|------|------|-------------------|
| Impelidor 1 | 0,96                   | 0,97 | 0,99 | 4,9                                      | 4,99 | 5,07 | 4,99              |
| Impelidor 1 | 0,93                   | 0,94 | 0,94 | 4,78                                     | 4,83 | 4,82 | 4,81              |
| Impelidor 1 | 0,95                   | 0,96 | 0,98 | 4,89                                     | 4,94 | 5,01 | 4,95              |
| Impelidor 2 | 1,15                   | 1,17 | 1,16 | 5,91                                     | 6,02 | 5,96 | 5,96              |
| Impelidor 3 | 0,9                    | 0,91 | 0,9  | 4,63                                     | 4,69 | 4,61 | 4,64              |
| Impelidor 4 | 0,13                   | 0,13 | 0,13 | 0,65                                     | 0,65 | 0,66 | 0,65              |
| Impelidor 5 | 0,14                   | 0,13 | 0,14 | 0,74                                     | 0,69 | 0,71 | 0,71              |
| Impelidor 6 | 1,04                   | 1,05 | 1,03 | 5,35                                     | 5,39 | 5,31 | 5,35              |
| Impelidor 7 | 0,44                   | 0,45 | 0,44 | 2,25                                     | 2,32 | 2,24 | 2,27              |
| Impelidor 8 | 0,48                   | 0,47 | 0,52 | 2,45                                     | 2,42 | 2,68 | 2,52              |
| Impelidor 9 | 0,14                   | 0,14 | 0,15 | 0,72                                     | 0,74 | 0,79 | 0,75              |

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Dessa forma, a concentração celular (DO) foi determinada por meio da substituição dos valores de absorbância obtidos na equação da reta, seguida do cálculo da média entre as três concentrações. Com o auxílio do software STATISTICA, foram elaborados o diagrama de Pareto (Gráfico 1) e sua respectiva análise gráfica (Gráfico 2).

**Gráfico 1** - Diagrama de Pareto referente a DO.



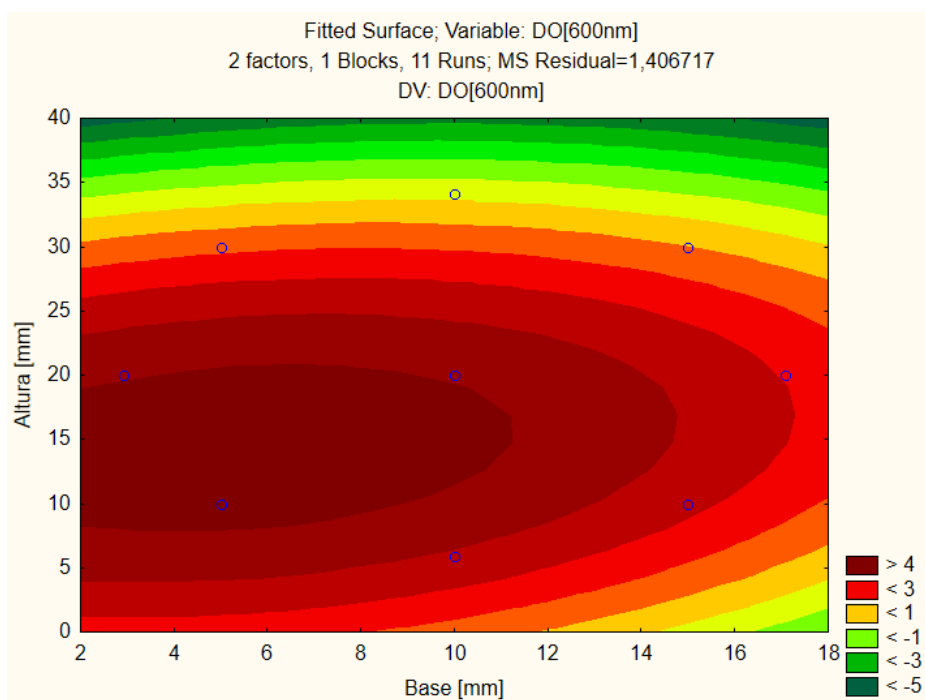
Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Esses resultados demonstram que pequenas alterações geométricas nas pás dos impelidores foram suficientes para provocar diferenças significativas no crescimento celular. Estatisticamente, observou-se que determinadas combinações de base e altura favoreceram o cultivo, enquanto outras prejudicaram de forma acentuada o desempenho do sistema. Esse comportamento sugere que a geometria do impelidor influenciou a dinâmica de mistura e, conseqüentemente, as condições de cultivo às quais as células foram expostas (Forrester et al., 1998; Buffo et al., 2016).

A análise estatística apresentada no diagrama de Pareto (Gráfico 1) mostrou que a variável altura exerceu o efeito mais pronunciado sobre a densidade óptica, tanto em seu termo linear quanto quadrático, superando a influência observada para a base. Além disso, a interação entre base e altura apresentou menor contribuição, indicando que, nas condições estudadas, a altura foi o parâmetro geométrico de maior relevância para a resposta analisada. O sinal negativo observado para os coeficientes

associados à altura indica que o aumento desse parâmetro esteve relacionado à diminuição da concentração celular (Buffo et al., 2016).

**Gráfico 2** - Gráfico de contorno referente a DO.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

O gráfico de contorno (Gráfico 2) confirma essa tendência ao evidenciar que a região de maior resposta se concentrou em faixas intermediárias de base e altura, com destaque para valores próximos de 10 mm de base e alturas moderadas. Em contrapartida, geometrias mais extremas tenderam a reduzir a biomassa, o que está de acordo com os resultados experimentais observados para os impelidores de menor desempenho. Dessa forma, os dados indicam que o crescimento celular não foi favorecido pelas maiores dimensões geométricas, mas sim por configurações intermediárias, capazes de proporcionar condições mais adequadas ao cultivo (Buffo et al., 2016).

## 5.2 Influência da geometria dos impelidores sobre a produção de riboflavina

Com base na curva de calibração previamente estabelecida, foi possível converter os valores de absorbância em concentração de riboflavina, permitindo a comparação entre as diferentes configurações de impelidores avaliadas. Os

resultados apresentados na Tabela 4 evidenciam que a geometria dos impelidores exerceu influência significativa sobre a produção de riboflavina.

**Tabela 4** - Valores obtidos em relação à concentração de riboflavina em 445 nm.

| Cultivo     | Leitura<br>Riboflavina<br>(445 nm) |      |      | Concentração<br>Riboflavina $y = 0,0482 x$ |      |      | Média<br>Riboflavina |
|-------------|------------------------------------|------|------|--------------------------------------------|------|------|----------------------|
|             |                                    |      |      |                                            |      |      |                      |
| Impelidor 1 | 0,23                               | 0,25 | 0,26 | 1,13                                       | 1,19 | 1,23 | 1,18                 |
| Impelidor 1 | 0,21                               | 0,22 | 0,3  | 1,03                                       | 1,07 | 1,44 | 1,18                 |
| Impelidor 1 | 0,22                               | 0,24 | 0,24 | 1,08                                       | 1,14 | 1,15 | 1,12                 |
| Impelidor 2 | 0,42                               | 0,41 | 0,44 | 2,01                                       | 2,00 | 2,12 | 2,04                 |
| Impelidor 3 | 0,19                               | 0,19 | 0,19 | 0,92                                       | 0,89 | 0,93 | 0,91                 |
| Impelidor 4 | 0,04                               | 0,03 | 0,03 | 0,17                                       | 0,16 | 0,14 | 0,16                 |
| Impelidor 5 | 0,03                               | 0,04 | 0,03 | 0,14                                       | 0,2  | 0,15 | 0,17                 |
| Impelidor 6 | 0,31                               | 0,31 | 0,31 | 1,5                                        | 1,48 | 1,48 | 1,49                 |
| Impelidor 7 | 0,13                               | 0,12 | 0,13 | 0,64                                       | 0,59 | 0,64 | 0,62                 |
| Impelidor 8 | 0,14                               | 0,15 | 0,14 | 0,69                                       | 0,71 | 0,68 | 0,69                 |
| Impelidor 9 | 0,04                               | 0,05 | 0,06 | 0,21                                       | 0,22 | 0,27 | 0,23                 |

Fonte: Elaborado pelo autor, (2026).

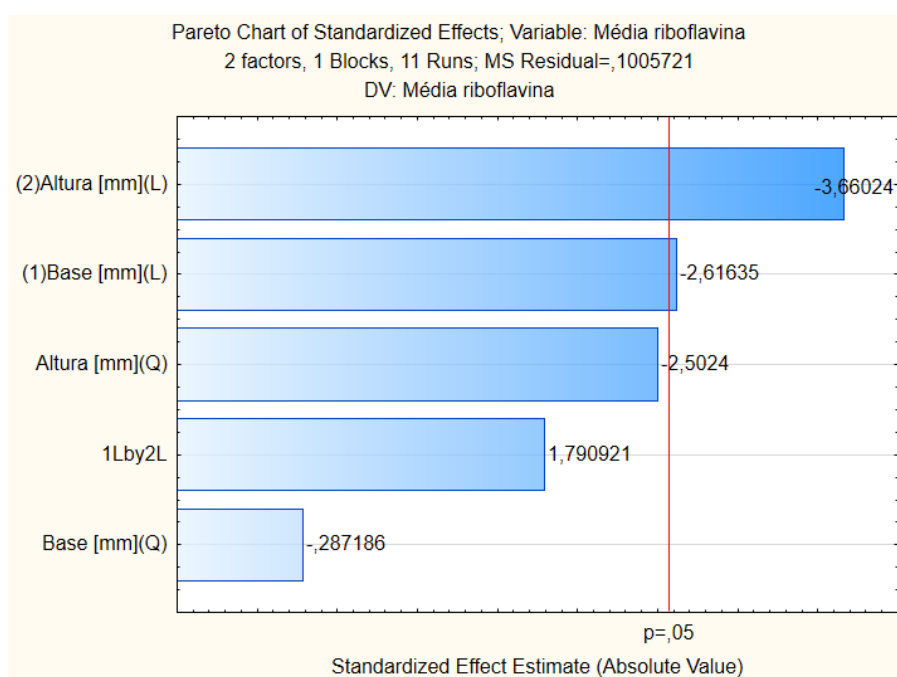
Entre os sistemas analisados, o impelidor 2 apresentou a maior média de produção (2,04), seguido pelo impelidor 6 (1,49). Em contrapartida, os impelidores 4, 5 e 9 apresentaram os menores valores, correspondendo a 0,16, 0,17 e 0,23, respectivamente. Os ensaios realizados com o impelidor 1 apresentaram médias próximas entre si (1,18; 1,18 e 1,12), indicando boa reprodutibilidade experimental.

Esses resultados demonstram que a produção de riboflavina seguiu tendência semelhante à observada para a concentração celular, sugerindo uma relação direta entre crescimento microbiano e síntese do metabólito nas condições avaliadas. De modo geral, os impelidores que favoreceram maior crescimento celular também apresentaram maior produção de riboflavina, indicando que as condições hidrodinâmicas geradas influenciaram simultaneamente ambos os parâmetros (HU et al., 2017).

A análise estatística por meio do diagrama de Pareto (Gráfico 3) mostrou que as variáveis geométricas base e altura linear exerceram efeitos significativos sobre a produção de riboflavina. Observa-se que a altura apresentou o maior efeito padronizado, seguida pela base, indicando que ambos os parâmetros contribuíram de forma relevante para a resposta analisada. O sinal negativo observado indica que o

aumento desses parâmetros geométricos esteve associado à redução da produção de riboflavina. Esse comportamento sugere que dimensões excessivas das pás não favoreceram as condições de mistura e transferência de oxigênio necessárias para a síntese do metabólito. Dessa forma, observa-se que a produção de riboflavina foi maximizada em faixas intermediárias de base e altura, enquanto valores mais elevados dessas variáveis tenderam a exercer efeito negativo sobre a resposta analisada.

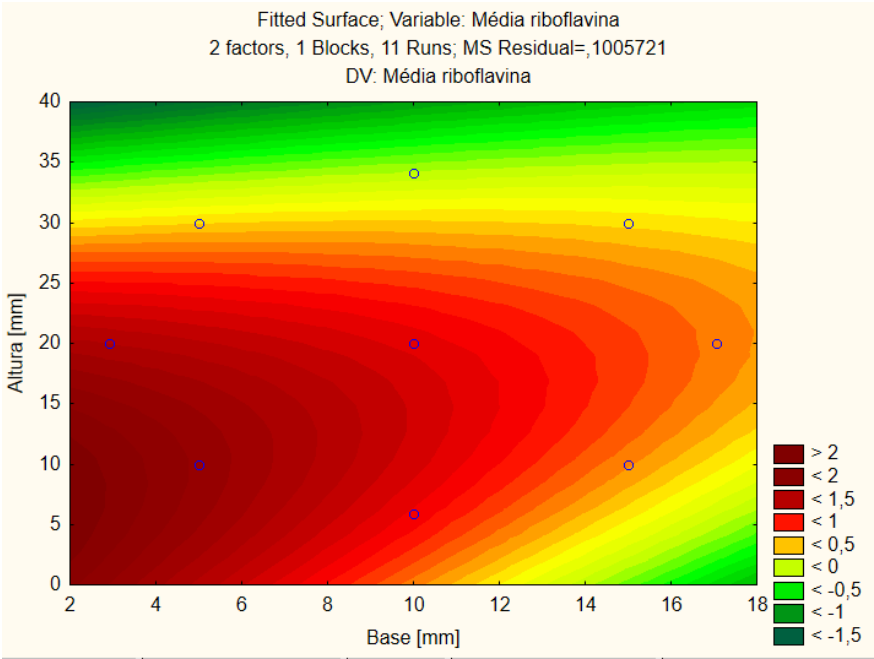
**Gráfico 3** - Diagrama de Pareto referente à produção riboflavina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

O gráfico de contorno (Gráfico 4) reforça essa interpretação ao evidenciar que a região de maior produção de riboflavina está associada a valores intermediários de base e altura. Observa-se que as maiores concentrações foram obtidas em faixas próximas a 10 mm de base e alturas moderadas, enquanto valores extremos dessas variáveis resultaram em menor produção do metabólito (Hu et al., 2017; You et al., 2021).

**Gráfico 4** - Gráfico de contorno referente à produção da riboflavina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

**5.3 Comparação grupo de controle em relação ao cultivo na presença de impelidores.**

Com o objetivo de avaliar a influência da presença dos impelidores no sistema, foram realizados ensaios em triplicata utilizando um grupo controle, no qual os cultivos foram conduzidos nas mesmas condições experimentais, porém na ausência de impelidores. Os resultados obtidos para concentração celular e produção de riboflavina estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5** - Resultados grupo de controle referente à leitura da concentração celular.

| Controle  | Leitura Riboflavina<br>(600 nm) |      |      | Concentração<br>Biomassa<br>$y= 0,5134 x$ |      |      | Média<br>Biomassa |
|-----------|---------------------------------|------|------|-------------------------------------------|------|------|-------------------|
| Cultivo 1 | 0,88                            | 0,89 | 0,88 | 4,49                                      | 4,54 | 4,51 | 4,51              |
| Cultivo 2 | 0,93                            | 0,93 | 0,95 | 4,77                                      | 4,77 | 4,9  | 4,82              |
| Cultivo 3 | 0,96                            | 0,99 | 0,98 | 4,95                                      | 5,06 | 5,01 | 5,00              |

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

**Tabela 6** - Resultados grupo de controle referente à leitura da concentração da riboflavina.

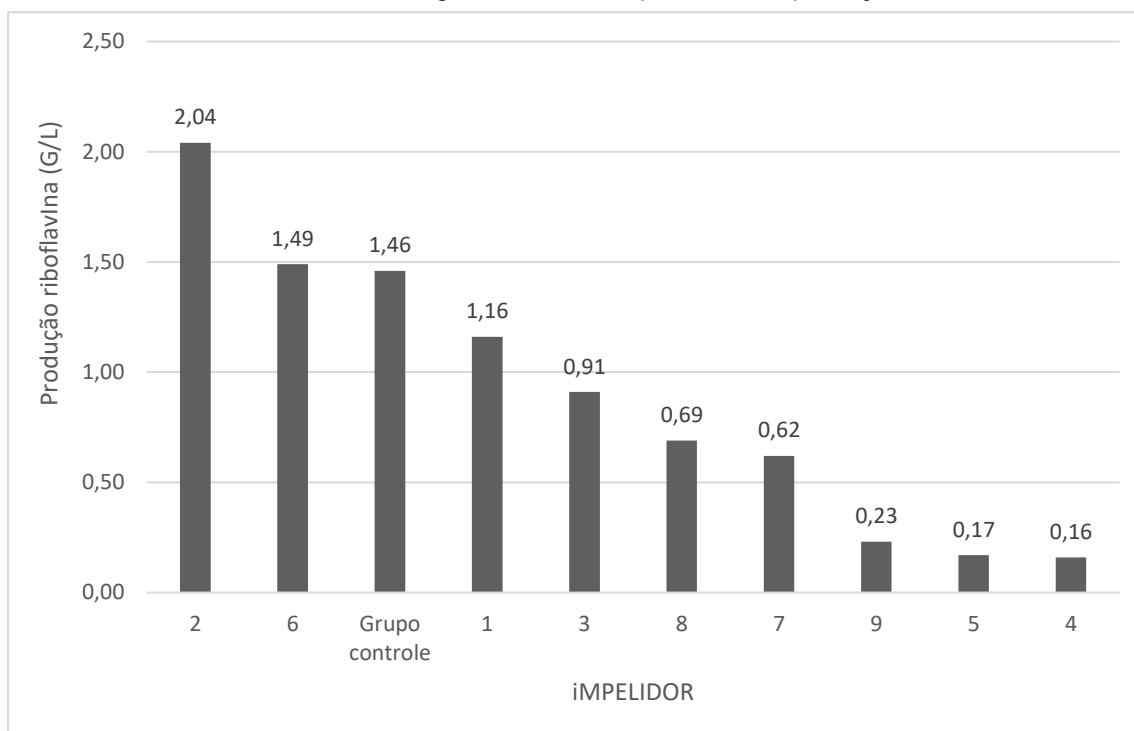
| Controle  | Leitura<br>Riboflavina<br>(445 nm) |      |      | Concentração<br>Riboflavina<br>$y = 0,0482 x$ |      |      | Média Riboflavina |
|-----------|------------------------------------|------|------|-----------------------------------------------|------|------|-------------------|
| Cultivo 1 | 0,28                               | 0,29 | 0,3  | 1,35                                          | 1,41 | 1,44 | 1,4               |
| Cultivo 2 | 0,3                                | 0,31 | 0,33 | 1,47                                          | 1,47 | 1,58 | 1,51              |
| Cultivo 3 | 0,3                                | 0,31 | 0,32 | 1,43                                          | 1,48 | 1,56 | 1,49              |

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Para a concentração celular, os valores médios obtidos para o grupo controle foram de 4,51; 4,82 e 5,00, evidenciando crescimento celular consistente mesmo na ausência de impelidores. Esses resultados indicam que o sistema de agitação convencional em shake foi suficiente para sustentar o crescimento de *Bacillus subtilis*, ainda que sem a intensificação promovida pelos impelidores.

Ao comparar esses valores com os obtidos nos ensaios com impelidores, observa-se que alguns sistemas apresentaram desempenho superior ao controle, como o impelidor 2 (5,96) e o impelidor 6 (5,35), enquanto outros apresentaram desempenho inferior, como os impelidores 4, 5 e 9. Esse comportamento demonstra que a simples presença do impelidor não garante melhoria no processo, sendo a geometria um fator determinante para o desempenho do sistema (Knorr et al., 2007).

Em relação à produção de riboflavina, o grupo controle apresentou médias de 1,40; 1,51 e 1,49, valores que se situam em uma faixa intermediária quando comparados aos sistemas com impelidores. O impelidor 2 apresentou a maior produção (2,04), indicando que sua configuração provavelmente proporcionou condições de mistura e transferência de oxigênio mais adequadas ao crescimento e metabolismo de *Bacillus subtilis*. Por outro lado, os impelidores 4 e 5 apresentaram produções significativamente inferiores, sugerindo que os padrões de escoamento gerados por esses sistemas podem não ter favorecido a distribuição homogênea de nutrientes e oxigênio no meio de cultivo. Dessa forma, os resultados indicam que a geometria do impelidor influenciou diretamente as condições do cultivo e, consequentemente, a produção de riboflavina (Gráfico 5).

**Gráfico 5** - Influência da geometria dos impelidores na produção de riboflavina.

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

A comparação entre os resultados evidencia que os impelidores, quando adequadamente projetados, são capazes de intensificar tanto o crescimento celular quanto a produção de riboflavina. Por outro lado, geometrias inadequadas podem comprometer o desempenho do sistema, resultando em valores inferiores ao próprio grupo controle (Knorr et al., 2007; Buffo et al., 2016).

A análise conjunta dos resultados de biomassa, riboflavina e controle sem impelidor mostra uma correlação clara entre a geometria dos impelidores e o desempenho do cultivo. Os impelidores que proporcionaram maiores concentrações celulares, especialmente os impelidores 2 e 6, também foram os que apresentaram as maiores produções de riboflavina, enquanto geometrias associadas a baixa biomassa também resultaram em baixa produção do metabólito. Além disso, o fato de apenas alguns impelidores superarem o controle demonstra que o ganho de desempenho não esteve relacionado apenas à inserção de um elemento mecânico no frasco, mas à obtenção de uma geometria capaz de favorecer simultaneamente mistura, indução gasosa e condições adequadas de cultivo.

A correlação observada entre crescimento celular e produção de riboflavina indica que as condições de cultivo desempenham papel fundamental no desempenho do processo. A literatura demonstra que tanto a geometria do impelidor quanto a

disponibilidade de oxigênio influenciam diretamente a eficiência de processos biotecnológicos, afetando simultaneamente crescimento e produção de metabólitos (Buffo et al., 2016; You et al., 2021).

Assim, os resultados obtidos neste trabalho reforçam que a otimização da geometria dos impelidores é essencial para maximizar o desempenho do sistema, sendo possível identificar configurações que superam inclusive o grupo controle.

#### 5.4 Comparação referente ao tamponamento de silicone e algodão

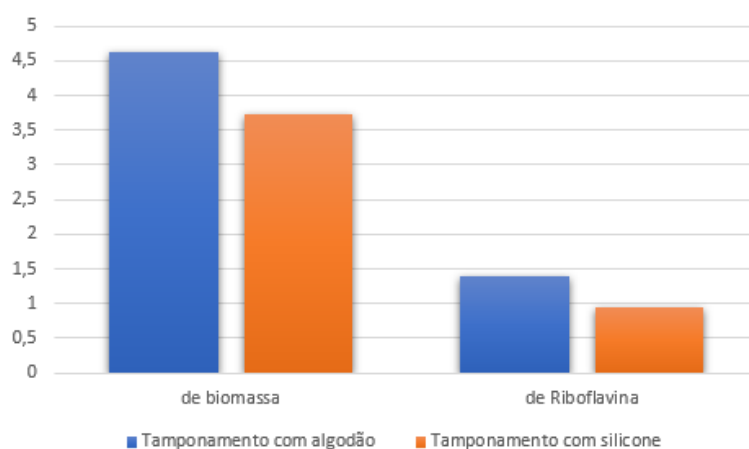
O mesmo procedimento experimental foi realizado para avaliar a influência do tipo de tamponamento sobre o cultivo, comparando o uso de algodão e silicone em sistemas conduzidos na ausência de impelidores. Os resultados estão apresentados na Tabela 7, enquanto a comparação visual é apresentada no Gráfico 6.

**Tabela 7** - Análises comparativas referentes ao tamponamento de silicone e algodão.

| <b>Amostra</b>            | <b>Média concentração de biomassa</b> | <b>Média concentração de Riboflavina</b> |
|---------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|
| Tamponamento com algodão  | 4,63                                  | 1,39                                     |
| Tamponamento com silicone | 3,73                                  | 0,94                                     |

Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

**Gráfico 6** - Análise comparativa referente ao tamponamento de algodão e silicone.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Os dados mostram que o tamponamento com algodão resultou em maiores valores tanto para concentração de biomassa (4,63) quanto para produção de riboflavina (1,39), em comparação ao tamponamento com silicone, que apresentou valores de 3,73 e 0,94, respectivamente. Essa diferença é claramente evidenciada no Gráfico 6, no qual se observa superioridade consistente do sistema com algodão para ambas as variáveis analisadas.

Esse comportamento pode estar associado às características de permeabilidade dos materiais utilizados no fechamento dos frascos. O algodão é amplamente utilizado em cultivos microbiológicos por permitir trocas gasosas eficientes com o meio externo, favorecendo a entrada de oxigênio e a liberação de dióxido de carbono, sem comprometer a assepsia do sistema. Por outro lado, materiais menos permeáveis, como o silicone, podem impor maior resistência à difusão gasosa, limitando a disponibilidade de oxigênio no interior do frasco.

A limitação de oxigênio pode impactar diretamente tanto o crescimento celular quanto a produção de metabólitos em processos aeróbios. No caso de *Bacillus subtilis*, a produção de riboflavina é altamente dependente da disponibilidade de oxigênio, sendo reduzida sob condições de baixa aeração (Hu et al., 2017; You et al., 2021).

Além disso, estudos clássicos sobre cultivos em frascos agitados indicam que sistemas de vedação, como tampões de algodão, podem influenciar significativamente a taxa de transferência de oxigênio, atuando como uma barreira parcial à difusão gasosa, porém ainda permitindo trocas gasosas suficientes para sustentar o crescimento microbiano (Corman et al., 1957).

Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho são consistentes com o comportamento esperado para sistemas aeróbios, indicando que o tamponamento com algodão proporcionou condições mais adequadas de aeração em comparação ao silicone, refletindo em maior crescimento celular e maior produção de riboflavina.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a geometria dos impelidores exerceu influência significativa tanto sobre o crescimento celular quanto sobre a produção de riboflavina por *Bacillus subtilis*. Foi possível observar que diferentes configurações geométricas resultaram em variações expressivas nos valores de biomassa e do metabólito produzido, evidenciando a relevância do projeto do sistema de agitação mesmo em cultivos conduzidos em frascos agitados.

Entre os sistemas avaliados, os impelidores 2 e 6 apresentaram os melhores desempenhos, com maiores concentrações celulares e maiores produções de riboflavina, superando inclusive o grupo controle em algumas condições. Em contrapartida, determinadas geometrias, como as observadas para os impelidores 4, 5 e 9, resultaram em desempenho inferior ao controle, demonstrando que a simples inserção de um impelidor não garante melhoria no processo, sendo a sua configuração geométrica um fator determinante.

A análise estatística corroborou esses resultados ao indicar que as variáveis geométricas, especialmente a altura, exerceram influência significativa sobre as respostas avaliadas, sendo observada a existência de uma região ótima associada a valores intermediários de base e altura. Esse comportamento sugere que geometrias extremas podem comprometer o desempenho do sistema, possivelmente devido a efeitos relacionados à mistura e à transferência de oxigênio.

A comparação com o grupo controle permitiu validar a influência dos impelidores no sistema, evidenciando que apenas determinadas configurações foram capazes de promover melhorias efetivas no cultivo. Esse resultado reforça a importância da otimização dos parâmetros geométricos para obtenção de melhores desempenhos em processos biotecnológicos.

Adicionalmente, a avaliação do tamponamento demonstrou que o uso de algodão proporcionou melhor resultados em comparação ao silicone, tanto para biomassa quanto para produção de riboflavina. Esse comportamento está associado à maior eficiência de trocas gasosas promovida pelo algodão, favorecendo a disponibilidade de oxigênio no sistema, fator essencial em processos aeróbios.

De forma geral, os resultados indicam que tanto a geometria dos impelidores quanto as condições de aeração, influenciadas pelo tipo de vedação, desempenham papel fundamental no desempenho do cultivo.

## REFERÊNCIAS

- ABYANEH, E. Z.; EIN-MOZAFFARI, F.; LOHI, A. Critical review of gas–liquid mixing using gas-inducing impellers: modeling, CFD simulation, and ANN applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 63, p. 15325–15350, 2024. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.4c01758>
- ALMEIDA, A. G.; CAGNINI, P. **Avaliação de diferentes tipos de impelidores na taxa de transferência de calor e tempo de mistura em um biorreator de bancada**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2021.
- AVERIANOVA, L. A. et al. Production of vitamin B2 (riboflavin) by microorganisms: an overview. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828>
- BUFFO, M. M. et al. Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 130–147, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.07.003>
- CAMPOS, G. B. **Análise da influência de diferentes impelidores na transferência de oxigênio em biorreatores agitados e efeitos no cultivo de *Bradyrhizobium japonicum***. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2021.
- CORMAN, J. et al. Effect of cotton closures on oxygen absorption in shaken flasks. **Applied Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 313–316, 1957.
- CORMAN, J.; MICHAELS, A. S.; CHARLES, M. E. Oxygen absorption in shake flasks. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 49, p. 1547–1550, 1957.
- 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, 2019. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v8i3.745>

EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (ANS). Re-evaluation of riboflavin (E101(i)) and riboflavin-5'-phosphate sodium (E101(ii)) as food additives. *EFSA Journal*, v. 11, n. 10, p. 3357, 2013. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3357

FINN, R. K. Agitation-aeration in the laboratory and in industry. ***Bacteriological Reviews***, v. 18, n. 4, p. 254–274, 1954. doi: 10.1128/br.18.4.254-274.1954.

FORRESTER, S. E. et al. Gas-inducing impeller design and performance characteristics. ***Chemical Engineering Science***, v. 53, n. 4, p. 603–615, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(97\)00352-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)00352-7)

FREITAS, L. F. L. **Características turbulentas de um tanque agitado com medidas PIV 2C-2D**. 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2020. <https://orcid.org/0000-0002-8730-8045>

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. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.006.

GUIDA, A.; NIENOW, A. W.; BARIGOU, M. The effects of the azimuthal position of the measurement plane on the flow parameters determined by PIV within a stirred vessel. ***Chemical Engineering Science***, v. 65, p. 2454–2463, 2010. DOI: 10.1016/j.ces.2009.12.012

HEINEN, K. F. **Caracterização da transferência de oxigênio em sistema aerado e agitado para aplicação na produção de biossurfactante**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

HU, J. et al. Effects of oxygen availability on riboflavin production by *Bacillus subtilis*. ***Microbial Cell Factories***, v. 16, p. 150, 2017. DOI: 10.1186/s12934-017-0764-z

JESUINO, A. C. B. M. **Diferentes estratégias de cultivo de *Escherichia coli* recombinante para produção de proteína verde fluorescente (GFP)**. 2019. Exame de Qualificação (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.

KNORR, B. et al. Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 3, p. 195–206, 2007. DOI: 10.1016/j.bej.2006.10.023

LIU, Y. et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for riboflavin production: a review. **Microorganisms**, v. 11, 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11010164

LORENZINI, G. C. **Estudo da transferência de oxigênio em cultivo de *Bacillus megaterium***. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARTINI, T. L. **Influência de impelidores e condições de mistura na produção e insumos químicos para o setor coureiro**. 2010. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MARTINS, T. B. et al. Effect of oxygen mass transfer coefficient (kLa) on surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2025. DOI: 10.21203/rs.3.rs-4701611/v1

PICÃO, B. W. **Estudo da velocidade de agitação na produção de riboflavina por *Bacillus subtilis***. 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2021.

POWERS, H. J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1352–1360, 2003. DOI: 10.1093/ajcn/77.6.1352

SATO, R. et al. XXVIII Congresso Virtual de Iniciação Científica da Unicamp. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2020.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SCHWECHHEIMER, S. K.; STAHMANN, K.-P. Biotechnology of riboflavin. In: WENDISCH, V. F. (org.). **Microbial vitamin production**. Cham: Springer, 2016. p. 243–259. doi: 10.1007/s00253-015-7256-z

SIMÕES, G. D. et al. Função da riboflavina no metabolismo humano, alimentos fontes e suplementação. **Revista Científica da FAMINAS**, 2020.

SMALLEY, C. J. H. et al. Understanding the solid-state structure of riboflavin. **Crystal Growth & Design**, v. 24, n. 15, p. 6256–6266, 2024.  
<https://doi.org/10.1021/acs.cgd.4c00480>

SOUZA, A. C. S. et al. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 887–891, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500028>

SURESH, S.; SRINIVASAN, R.; RAMACHANDRAN, K. B. Oxygen transfer in bioreactors: fundamentals and applications. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 131–143, 2009.

TANG, W. et al. Improvement of glucoamylase production using axial impellers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 99, p. 167–176, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.025>

WANG, Q. et al. Enhanced biosynthesis of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 70, p. 36–44, 2018.  
DOI: 10.1016/j.procbio.2018.04.003

WYROBNIK, T. A. et al. Insights into the fluid dynamics of the Bach impeller. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 206, p. 511–523, 2024.  
<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2024.05.026>

XIE, Z. Comparative analysis of flow field characteristics in stirring equipment. In: **PROCEEDINGS OF THE 3RD INTERNATIONAL CONFERENCE ON MECHATRONICS AND SMART SYSTEMS**. 2025. DOI: 10.54254/2755-2721/2025.23355

YANG, J. Y. et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for enhancing riboflavin production. **Bioresource Technology**, v. 333, 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125228

YOU, J. et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for enhancing riboflavin production. **Bioresource Technology**, v. 334, 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125228

ZHANG, J. R. et al. Biotechnological strategies of riboflavin biosynthesis in microbes. **Engineering**, v. 12, p. 115–127, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.018>

### ANEXO A – Curva de calibração da biomassa (Picão, 2021)

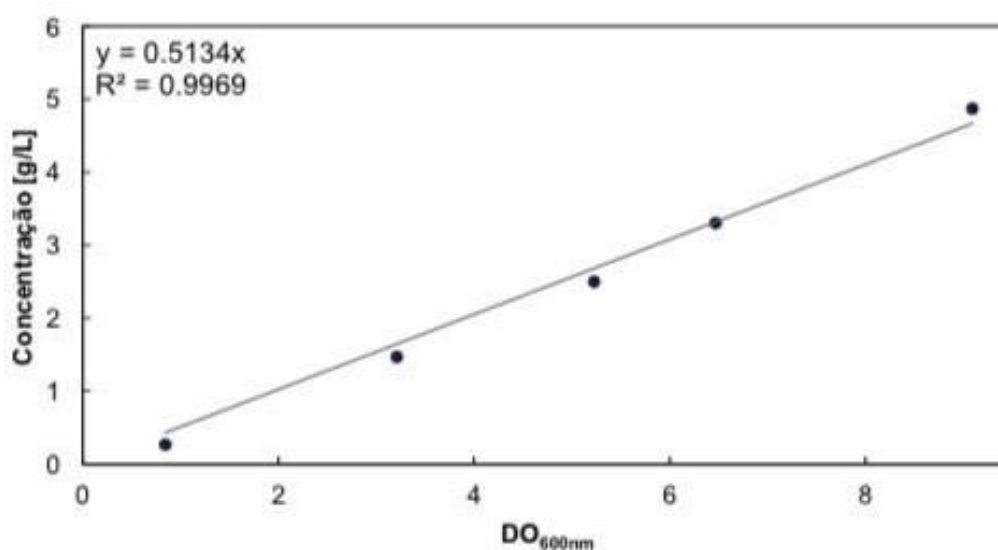
A curva de calibração da densidade óptica em relação à massa seca da biomassa foi criada através da leitura de suspensões de células, feita em duplicata, obtidas por diluição de uma suspensão com densidade óptica e concentração de peso seco conhecidas. A densidade óptica das suspensões variou de 0,843 a 9,09 unidades de absorbância (Picão, 2021). A Tabela A1 ilustra os resultados obtidos. Já a Gráfico B1 ilustra a curva de calibração referente aos dados obtidos biomassa.

**Tabela A1** - Resultados obtidos para elaboração da curva de calibração da densidade óptica versus massa seca (g/L) (Picão, 2021).

| DO <sub>600nm</sub> |       |       |       | Massa Seca (g/L) |     |       |       |
|---------------------|-------|-------|-------|------------------|-----|-------|-------|
| Análise             |       | Média |       | Análise          |     | Média |       |
| 0,842               | 0,812 | 0,892 | 0,843 | 0,3              | 0,2 | 0,3   | 0,267 |
| 3,232               | 3,228 | 3,164 | 3,208 | 1,5              | 1,4 | 1,5   | 1,467 |
| 5,24                | 5,168 | 5,272 | 5,227 | 2,4              | 2,5 | 2,6   | 2,5   |
| 6,56                | 6,56  | 6,28  | 6,467 | 3,5              | 3,1 | 3,3   | 3,3   |
| 8,7                 | 9,36  | 9,22  | 9,093 | 4,9              | 4,8 | 4,9   | 4,867 |

Fonte: (Picão, 2021).

**Gráfico B1** - Curva de calibração da biomassa (Picão, 2021).



Fonte: (Picão, 2021).

## APÊNDICE A- Curva de calibração da riboflavina

Para construção da curva de calibração da riboflavina, foram realizadas triplicatas em 445 nm com suas respectivas concentrações em [g/L] como ilustrado na Tabela A2.

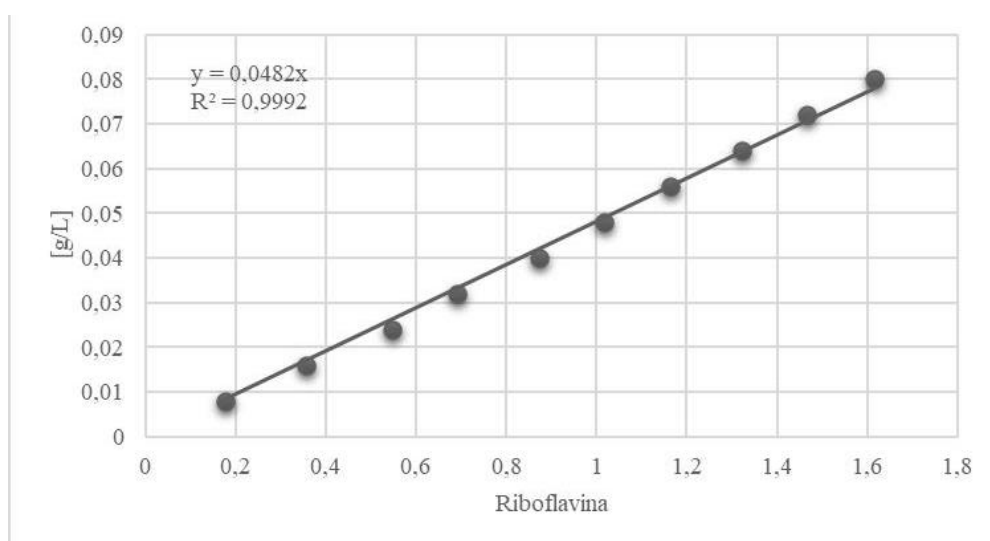
**Tabela A2** - Dados referentes à curva de calibração da riboflavina.

| C [g/L] | Absorbância |      |      | Média |
|---------|-------------|------|------|-------|
| 0,08    | 1,62        | 1,62 | 1,60 | 1,62  |
| 0,07    | 1,46        | 1,47 | 1,47 | 1,47  |
| 0,06    | 1,32        | 1,33 | 1,32 | 1,32  |
| 0,06    | 1,16        | 1,16 | 1,17 | 1,16  |
| 0,05    | 1,01        | 1,03 | 1,01 | 1,02  |
| 0,04    | 0,88        | 0,87 | 0,88 | 0,87  |
| 0,03    | 0,69        | 0,69 | 0,69 | 0,69  |
| 0,02    | 0,54        | 0,54 | 0,55 | 0,55  |
| 0,02    | 0,36        | 0,36 | 0,35 | 0,36  |
| 0,01    | 0,18        | 0,18 | 0,17 | 0,18  |

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

O Gráfico B2 a seguir refere-se portanto, à curva de calibração obtida a partir dos dados da Tabela A2, no qual obteve-se um  $R^2$  igual a 0,9992.

**Gráfico B2** - Curva de calibração da riboflavina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).