

Questão 1: A primeira etapa no desenvolvimento de bioprocessos é a seleção da sequência a ser expressa, a qual é seguida por amplificação gênica, clonagem no vetor de expressão, sequenciamento para confirmação de que a construção gênica não possui erros e transfecção/transfecção da linhagem celular de mamíferos (transfecção) ou bacteriana (transfecção). A sequência gênica dita a sequência de aminoácidos a ser traduzida e, na influência na estrutura da proteína recombinante, em sua estabilidade, na atividade biológica e em sua imunogenicidade. (CHO)

Para definir se será utilizada uma linhagem de mamíferos ou bacteriana (*Escherichia coli*), deve-se avaliar a estrutura da proteína a ser expressa. Em geral, bactérias possuem capacidade limitada de produzir proteínas de estrutura complexa, como aquelas que contêm alta massa molecular e modificações pós-tradução, como sulfatação, hidroxilação, carboidratação e glicosilação. Além disso, apesar de bactérias possuírem crescimento rápido, elas requerem meios nutricionais e resistência a tensões de cisalhamento típicas de culturas em biorreatores agitados mecanicamente, estas não têm capacidade de expressar proteínas complexas com a estrutura correta, além da proteína se acumular intracelularmente em corpos de inclusão.

Por outro lado, células animais, como a CHO ("Chinese hamster ovary" - células de ovário de hamster chinês), têm a capacidade de produzir proteínas de estrutura complexa, incluindo modificações pós-tradução como a glicosilação em padrões similares ao presente em proteínas produzidas pelo organismo humano, o que é essencial para que a proteína apresente atributos críticos de qualidade (CQAs) adequados, como estabilidade e atividade biológica adequadas e imunogenicidade reduzida. Como desvantagens, células de mamíferos apresentam crescimento mais lento, têm requerimentos nutricionais maiores e menor resistência a tensões de cisalhamento e a estresses mecânicos (promovidos principalmente pela agitação e aeração). Vale ressaltar que ao contrário da *E. coli*, células CHO secretam a proteína expressa para o meio extracelular, o que facilita os processos posteriores de purificação.

Assim, após definir a sequência de interesse e a linhagem celular

2

de escolha, deve-se desenhar o vetor de expressão e a construção gênica deve ter a sequência otimizada para a linhagem onde será expressa, seguindo-se com as etapas de clonagem molecular citadas inicialmente.

Tendo-se a construção gênica clonada em vetores plasmidiais, por exemplo, deve-se amplificar a massa em hospedeiros compatíveis (em geral, usa-se *E. coli*) e, então, modificar geneticamente a linhagem celular que irá expressar a proteína de interesse.

Para *E. coli*, a construção gênica pode ser inserida por processos como a eletroporação, na qual aplica-se um campo elétrico que irá promover a abertura de poros transitórios, permitindo a passagem do material genético pela parede e membrana celulares.

Células CHO não possuem parede celular e são mais sensíveis; portanto, desenvolveram-se vários métodos para transfecção para reduzir efeitos citotóxicos e deletérios relacionados à inserção da construção gênica. Assim, para células CHO também se pode utilizar a eletroporação, porém as condições de processo, como a intensidade e duração dos pulsos elétricos devem ser otimizados. Alternativamente, pode-se empregar lipídeos catiônicos ou polímeros, como a liposetamina e a poli-etilenoimina, respectivamente, os quais têm a capacidade de se complexar ao DNA e serem internalizados pelas células por processos de fagocitose ou endocitose.

Após a entrada do DNA na célula, dependendo dos elementos presentes na construção plasmidial, o vetor pode permanecer no núcleo na forma episomal (expressão transitória) ou ser integrado ao genoma celular por recombinação aleatória ou não-dirigida (o que também depende do desenho do vetor), levando à expressão estável e por períodos prolongados.

Para processos comerciais, o ideal é que a proteína seja produzida de forma estável, uma vez que o processo de geração de linhagens recombinantes demandam muitos recursos e tempo.

Após a modificação das linhagens, deve-se selecionar aquelas células que foram capazes de receber o material genético heterólogo e expressar a proteína de interesse. Isto pode ser feito por métodos de seleção como a adição de antibióticos como o G418 sulfato, por exemplo, sendo que para isso

a consistência química deve ter sido desenvolvida para suportar a expressão do gene de resistência (nem caso, a recominação *for* transferir-se), além da proteína de interesse.

Para a produção de biofarmacos, agências regulatórias requerem que as linhagens celulares recombinantes sejam clonalmente derivadas, de ~~muito~~ ^{muito} a reduzir a heterogeneidade da ~~pop~~ população produtora, uma vez que a consistência lote-a-lote é essencial em processos produtivos, relacionando-se à consistência e qualidade do produto de interesse.

Após a obtenção de linhagem clonalmente derivada com características adequadas de crescimento, produtividade e capacidade de crescimento robusto, deve-se produzir bancos celulares em dois níveis, o banco de células mestre (MCB) e o banco de células de trabalho (WCB), os quais deverão ser extensivamente caracterizados para confirmação de identidade, pureza, *requisito* (ausência de contaminantes adventícios) e capacidade de uso no processo (avaliação de crescimento, viabilidade, estabilidade genética e produção da proteína de interesse com a estrutura adequada).

Então, após o desenvolvimento da linhagem celular e preparo dos bancos, deve-se iniciar o processamento "upstream" propriamente dito. Para isso, inicia-se a propagação de inóculo a partir do descongelamento de um tubo, o qual deve ser colocado em meio de cultivo, pH e condições ótimas para o crescimento celular. As células devem ser expandidas em processos de repique realizados periodicamente, aumentando-se o volume de inóculo disponível até que se tenha células suficientes para inocular o biorreator de produção.

Em geral, a propagação de inóculo é feita em fases de pequena escala, como erlenmeyers, os quais são escalonados até chegar ao biorreator.

Alternativamente, pode-se usar um biorreator ~~para~~ ($N-1$) para expandir as células e inocular o biorreator de produção (N). Vale ressaltar que as etapas de propagação de inóculo podem ser aceleradas pelo preparo de bancos celulares contendo alíquotas com concentrações maiores de células.

Após a inoculação do biorreator, realiza-se o cultivo das células produtoras. Em geral, biorreatores do tipo tanque agitado podem ser

4

empregados tanto para E. coli quanto para células CHO, empregando as condições de cultivo (pH, oxigênio dissolvido, agitação e temperatura) apropriadas para cada caso.

~~Para~~ Os diferentes modos de operação podem ser empregados, como a batelada, a batelada alimentada e o cultivo contínuo. Para células animais como a CHO, pelo fato de a taxa específica de crescimento ser reduzida, é importante que o cultivo contínuo seja acoplado a equipamentos apropriados de retenção celular.

A escolha do modo de operação depende de características do produto (estabilidade nas condições de cultivo, por ex.), da resistência da linhagem ao acúmulo de metabólitos inibitórios, à demanda pelo produto de interesse e dos requerimentos celulares por nutrientes.

Como a E. coli é escolhida, em geral, para a produção de proteínas de estrutura mais simples, como insulina, interferon- α e hormônio do crescimento (GH), sua produção normalmente é feita em processos em batelada ou batelada alimentada. O nível de produção em bactérias, em geral, é alto, o que permite a produção em modos de operação mais simples e de menor custo. Além disso, E. coli é mais resistente à presença de metabólitos inibitórios e tem requerimentos nutricionais mais simples.

Para a produção de proteínas mais complexas por células CHO, geralmente são utilizados processos operados em batelada alimentada (estende tempo de cultivo em relação à batelada pela adição de soluções concentradas de nutrientes, levando à maior concentração de células e produto, porém há acúmulo de metabólitos inibitórios e o tempo de residência do produto é alto) ou em modo contínuo com reciclo celular - perfusão. A perfusão apresenta maior complexidade operacional por necessitar do emprego de equipamentos de retenção celular, mas promove a adição contínua de meio fresco e remoção contínua de meio condicionado e produto, promovendo a obtenção de condições mais adequadas ao crescimento celular e o aumento da produtividade volumétrica. Assim, a perfusão é o modo de operação mais adequado à produção de proteínas láteis, mas seu emprego tem a desvantagem de proporcionar aumento da produtividade volumétrica, uso de biorreatores de maior volume por promover coleta contínua de produto e reduzir o período ocioso da

planta produtiva, necessário para a limpeza do sistema e preparo para início de novo lote produtivo ("turnover time"). Adicionalmente, o uso de equipamentos de retenção celular permite que as células sejam retornadas ou mantidas no biorreator e o produto seja coletado continuamente livre ou praticamente livre de células (clarificado).

Assim, após o cultivo em biorreatores, o produto deve ser coletado para seguir para etapas de processamento "downstream". Caso o produto seja secretado, como feito por células CHO, pode-se separar células e debris da parte líquida por processos de filtração ou centrifugação e dar-se início à purificação da fração líquida para a obtenção da proteína de interesse com alto nível de pureza e livre de contaminantes. Caso o produto fique acumulado intracelularmente, processos de lise celular (sonicação, uso de enzimas, detergentes) devem ser empregados, de modo a soltar a proteína de interesse causando a menor quantidade de contaminantes possível e utilizando processos e condições de pH, temperatura e força iônica adequados para que não ocorra desnaturação da proteína de interesse. Após a lise celular em tampão adequado, emprega-se técnicas para remover restos celulares, como centrifugação e filtração. Após o fim da clarificação, pode-se iniciar a purificação. Vale ressaltar que proteínas produzidas por E. coli podem ser armazenadas em corpos de inclusão, devendo-se promover seu re-enovelamento antes de iniciar a purificação.

A purificação é constituída pelas etapas principais de captura, ~~purificação~~ purificação intermediária e polimento, podendo-se empregar diferentes técnicas de separação baseadas em diferenças físico-químicas entre a proteína de interesse e os contaminantes, como carga, hidrofobicidade, tamanho, densidade e afinidade por determinados ligantes. Técnicas como filtração (microfiltração, ultrafiltração - tamanho), cromatografias de ~~tamanho~~ exclusão molecular (tamanho), cromatografia de troca iônica (carga), cromatografia de interação hidrofóbica (~~tamanho~~ hidrofobicidade) e cromatografias de afinidade podem ser utilizadas.

A combinação das diferentes etapas empregadas depende da pureza alvo e de características físico-químicas da proteína de interesse e dos contaminantes.

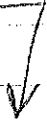
buscando-se a maior pureza e rendimento possíveis, além de a proteína ser obtida ao final da purificação com atividade biológica adequada.

Posteriormente ao processamento "downstream", tem-se início a etapa de formulação. A formulação adequada deve garantir que o produto mantenha a identidade, pureza, estabilidade e segurança durante o armazenamento e transporte, por meio da adição de excipientes adequados.

Por fim, a formulação preparada pode ser filtrada para que seja envasada de forma estéril e empregando técnicas de processamento asséptico. Após ser colocada na embalagem primária (enase), deve ser rotulada e acondicionada para comercialização. Vale ressaltar que todas as etapas devem apresentar controles em processo para garantir que o produto final tenha os ~~atributos~~ atributos críticos de qualidade adequados, devendo ser produzidos por meio de processos robustos, com controles críticos de processo bem definidos e limites de aceitação bem definidos. Diferentes métodos de controle qualidade devem ser empregados para garantir a qualidade do produto obtido.

Diagrama:

geração da linhagem recombinante



Obtenção de bancos celulares a partir de linhagens clonalmente derivada, devidamente caracterizada

Início do processo:

Descongelamento a partir do WCB (Banco de células de trabalho) → Expansão do inóculo → início do cultivo em biorreatores

(6 col) produto intracelular | produto extracelular (emo)

líse celular

clarificação

separação de debris celulares e captura do produto

captura → purificação intermediária

ultrafiltração e polimerização

purificação intermediária

polimerização → formulação e envaso



(*) A partir da captura, etapas finais de purificação, formulação e envase seguem etapas similares, assim como a rotulagem e etapas de armazenamento.

~~Questão 2~~

Questão 2 : A biotecnologia farmacêutica engloba a produção de substâncias derivadas de proteínas ou ácidos nucleicos obtidas por métodos que não seguem a extração direta de fontes biológicas, como pelo uso da tecnologia do DNA recombinante. Vacinas recombinantes e terapias com células ~~stem~~ também são considerados produtos da biotecnologia farmacêutica.

Assim, os tipos de produtos mais relevantes da biotecnologia farmacêutica são proteínas recombinantes (incluindo anticorpos monoclonais), terapias celulares (gênica e celular), ferramentas diagnósticas, exenanos e vacinas recombinantes.

- Proteínas recombinantes : maior parte dos produtos biofarmacêuticos aprovados são proteínas recombinantes, sendo os anticorpos monoclonais a classe de maior relevância em termos de vendas e número de produtos aprovados. Outras classes de proteínas recombinantes são citocinas (ex: interferon α , IL-2, TNF- α), fatores de crescimento ~~de~~ hematopoiéticos (G-CSF, eritropoetina), enzimas (alopurinase, glucocerebrosidase, atenuador de plasminogênio tecidual - tPA), proteínas de fusão (~~de~~ Ontak e Enbrel) e hormônios (insulina, GH, glucagon, semaglutida).

Citando-se um exemplo de produto dessa classe, tem-se a eritropoetina, a qual estimula a produção de glóbulos vermelhos (fator de crescimento hematopoiético) e tem estrutura complexa, caracterizada pela presença de sítios de N-glicosilação e O-glicosilação. Foi um dos primeiros produtos recombinantes aprovados e sua produção pode ser feita por células CHO recombinantes cultivadas em perfusão. A eritropoetina é usada no tratamento de anemias por causas diversas.

- Terapias avançadas: Enquanto proteínas recombinantes são usadas em terapias de reposição, por exemplo, terapias avançadas (gênica e celular) agem na correção do problema que causa a doença/condição em questão, seja ~~esta~~ este a nível gênico ou celular.

A terapia gênica pode ser utilizada na inserção, relocamento ou correção de genes, utilizando-se diversas ferramentas, como a entrega de genes no alvo celular por vetores virais ou não virais ou a edição gênica por técnicas como a CRISPR-Cas9. Em ambos os casos e sendo o tratamento in vivo ou ex vivo, busca-se reparar o que defeituoso. Um exemplo de terapia gênica em desenvolvimento é a destinada para tratamento da hemofilia A, por meio da expressão do gene do fator VIII da coagulação sanguínea. O tratamento ainda está em avaliação (estudos clínicos), mas mostra sucesso na expressão do FVIII por modificação gênica. Atualmente, há poucos produtos baseados em terapias avançadas aprovadas, em vista do alto custo (+ de ~~1000~~ 1 milhão por tratamento), de desafios técnicos e regulatórios.

A terapia celular permite o tratamento de condições por meio da retirada de células do próprio paciente, por exemplo, as quais são retiradas, expandidas e devolvidas (ex: retirada de células da epiderme para expansão e tratamento de queimaduras). Outro exemplo é terapia celular de grande interesse e o emprego de células CAR-T (Chimeric antigen receptor) para tratamento de alguns tipos de câncer, como o linfoma. Neste tipo de terapia, células do paciente (linfócitos T) são extraídas e modificadas geneticamente para expressar em sua superfície receptores que reconhecem antígenos característicos de células malignas, como o produto Kymriah (reconhece CD-19 expresso por células tumorais em linfomas).

- Ferramentas diagnósticas: importantes para detecção e o acompanhamento de doenças, por exemplo. Ferramentas importantes diagnósticas são "kits" rápidos para a detecção de antígenos específicos de doenças (teste rápido para detecção da proteína spike de SARS-CoV-2) ou testes para detecção de IgG ou IgM específicos para deter uma doença. A biotecnologia auxilia na produção dos antígenos (proteínas recombinantes relacionadas ao patógeno) ou anticorpos.

que compõem tais "kits".

- Exossomos: partículas de 40-100 nm formadas por ~~uma~~ bicamada lipídica que são produzidas e excretadas por diferentes células e contêm componentes celulares, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Os exossomos são vesículas que são características das células de origem e apresentam marcadores específicos de membrana (ex: CD-9, CD-81), permitindo seu estudo para o diagnóstico precoce de tipos específicos de câncer, por exemplo.

Atualmente, avalia-se a produção controlada de exossomos e seu uso como meio para transportar biofármacos específicos para tratar uma doença. Uma vez que exossomos são biocompatíveis, poderiam entrar em contato com células-alvo e liberar o "cargueiro" de fármacos ou biofármacos. Dentre técnicas como a produção controlada e em larga escala de exossomos ainda existem, assim como o desenvolvimento de ferramentas para sua purificação e controle de qualidade.

- Vacinas recombinantes: Encapsuladas no envelope de antígenos (proteínas) produzidas de forma recombinante e que têm papel essencial na geração de anticorpos neutralizantes contra o patógeno relacionado. Por serem constituídas por proteínas (vacinas de subunidades), não consideradas vivas e podem ser administradas em população com diferentes características (idade, gestantes, idosos).

Exemplos são a vacina Novavax (produção de spike por células de inseto), a vacina Gardasil (produção por *Saccharomyces cerevisiae* para HPV) e a vacina Cervarix (para hepatite B).

— 11 —

Questão 3

O modo de operação contínuo com reacto celular é caracterizado por funcionar como um processo em batelada, onde o inóculo celular é adicionado em determinado volume de meio de cultivo. Ao decorrer do cultivo, ocorre o crescimento celular e a consequente metabolização de nutrientes,

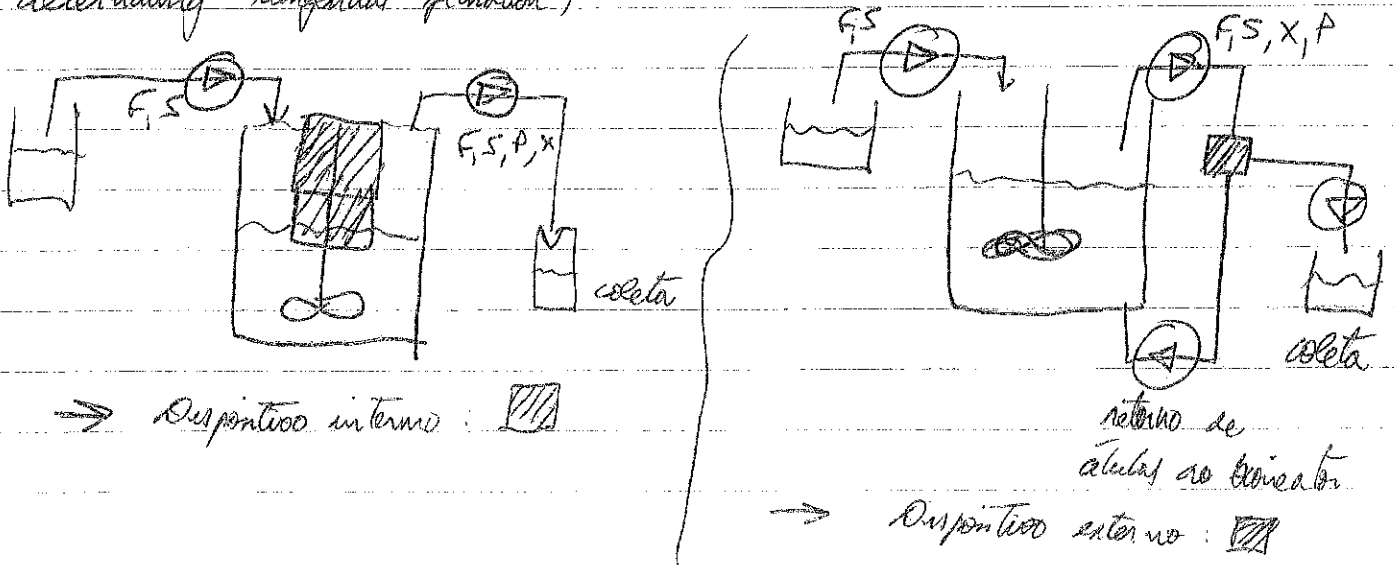
com formação de substâncias inibitórias e produto. Em geral, inicia-se a perfusão no meio da fase exponencial, de modo que se adiciona meio de cultivo fresco e retira-se, na mesma razão, meio de cultivo condicionado, contendo metabólitos inibitórios e produto, mantendo-se o volume constante.

Pelo fato de células animais apresentarem crescimento lento, com taxa específica de crescimento (μ) reduzida e longos tempos de duplicação ($> 24h$), é necessário que se empregue um equipamento de retenção celular.

Como vantagens, tem-se o ^{maior} tempo de residência do produto no biorreator, manutenção de um ambiente favorável para o crescimento celular (pela adição constante de meio de cultivo e remoção constante de metabólitos inibitórios) pode-se alcançar altas concentrações celulares (celas acima de 10 milhões de células/ml por Chéncke et al (2013) e Schwarz et al (2020) para células CHO e HEK, respectivamente), alta produtividade volumétrica, redução do espaço necessário (biorreatores menores, menor "foot print") e menor tempo de ociosidade da planta (uma vez que processa 60cm mais), por exemplo.

Como desvantagens, pode-se citar a maior complexidade técnica, maior manipulação de líquidos (maior "liquid handling"), maior dificuldade na manutenção da esterilidade e a necessidade de utilizar-se equipamentos adequados ao biorreator para a retenção de células (relacionado com a complexidade operacional).

Dentre os equipamentos de retenção celular, tem-se aqueles localizados internamente ao biorreator (ex: filtro de disco rotativo - spin filter) e aqueles localizados externamente (sedimentador lamelar, hidrociclone, ATF - "alternating tangential filtration").



Dispositivos internos apresentam como principal vantagem que as células ficam a todo tempo sob condições controladas, porém qualquer problema no dispositivo (ex: entupimento) requer a interrupção do cultivo.

Dispositivos externos podem ser substituídos caso apresentem falhas ou entupimento, sem necessidade de interromper o cultivo, porém células devem passar por "loop" externo para interação com dispositivos de retenção celular, ficando fora das condições ótimas de pH, temperatura e oxigênio dissolvido.

A definição do equipamento de retenção celular adequado é essencial para o sucesso do cultivo, uma vez que deve promover a retenção das células no biorreator sem que exerça efeitos deletérios no crescimento celular, com alta eficiência (eficiências $< 100\%$ como a bleed natural, diminuindo a concentração de células) e, idealmente, não devem reter o produto ou ser destruído ao mesmo.

Pelo fato de células apresentarem diâmetro pequeno (10-20 μm) e densidade semelhante à água, a retenção celular pode-se tornar um desafio.

Dentre os equipamentos de retenção mais utilizados, pode-se citar o ATF, TFF ("tangential flow filtration") e o sedimentador lamelar, estando também disponíveis outros equipamentos como centrifugas contínuas (Centritech®), "spin filters" e "rotor filters". Os equipamentos são baseados em diferentes princípios de separação, como será descrito a seguir:

- ATF e TFF: ambos são baseados na filtração, de forma que as células não retidas e o produto coletado. A suspensão celular contendo células é escoada de forma tangencial ao filtro, o que aumenta o tempo em que é possível operar sem que o filtro sofra colmatagem e "fouling".

No caso do TFF, a suspensão não do biorreator por uma porta, passa pelo módulo do TFF, e retorna ao biorreator por outra porta, sendo moléculas menores que o peso das membranas e a água coletadas. Já o ATF é operado com saída e retorno da suspensão celular pela ~~mesma~~ mesma porta do biorreator, uma vez que o sistema é composto por um diafragma e um controlador que promove ciclos alternados de pressão e vácuo, que promove alternância na direção do escoamento, o qual também ocorre tangencialmente ao filtro.

Os ciclos alternados de pressão e vácuo promovem uma auto-limpeza do módulo filtrante, o qual promove aumento no tempo em que é possível usar o módulo antes de seu entupimento.

Como vantagens, o material clarificado é coletado totalmente sem de células e pode ser purificado diretamente, porém condições devem ser ajustadas para que as tensões de cisalhamento não sejam deletérias para as células.

Como desvantagens, tem-se a retenção do produto e o entupimento progressivo da membrana por colmatagem e formação de torta.

Diferentes tamanhos de poro e materiais de membrana estão disponíveis, sendo uma fonte de otimização do processo. Os módulos são compostos por membranas de fibra oca dispostas em paralelo.

- Sedimentador lamelado: consiste em um dispositivo com partes móveis e formado por lamelas internas, dispostas em paralelo e de forma inclinada. A suspensão celular é alimentada pela base do equipamento em um movimento de escoamento em direção ao topo do equipamento, porém as células se depositam sob as lamelas por ação da gravidade e escorrem em direção à base, retornando ao biorreator em uma corrente concentrada pela parte de trás do equipamento, com auxílio de uma bomba. O material clarificado é coletado pela parte superior do sedimentador, podendo conter debris celulares e células mortas, que contêm menor densidade (contribui para os mantidos de alta viabilidade no biorreator). Acoplado ao sedimentador, existe um módulo de vibração que atua de forma intermitente, promovendo auxílio no movimento de células para a base do equipamento e evitando seu entupimento.

Antes de chegar ao sedimentador, as células passam por um trocador de calor, para diminuir movimentos de coagulação no interior do trocador por redução da temperatura, o que contribui para o aumento da eficiência de separação.

Como vantagens tem-se a ausência de partes móveis e a não-retenção do produto, porém a recirculação de células em loop externo e passando pelo trocador de calor faz com que as células fiquem por um período considerável fora de condições ideais de temperatura, pH e oxigênio dissolvido. O escalonamento é mais complexo quando comparado ao ATF, por exemplo.

Um exemplo de produto produzido por perfusão é o FVIII da coagulação sanguínea, produzido por células BHK-21 (Baby hamster kidney). Pelo fato de ser uma molécula complexa, com alta massa molecular e diversas modificações pós-tradução, além de ter tempo de meia-vida reduzido, o processo em perfusão mostra-se vantajoso, uma vez que as células são mantidas com alta viabilidade e o tempo de residência do produto é reduzido, contribuindo para a qualidade do FVIII produzido.

Questão 4

Bactérias como a *E. coli*, são caracterizadas por maior resistência a tensões de cisalhamento, uma vez que possuem parede celular. Por outro lado, células como não são ~~mais~~ sensíveis a estresses mecânicos.

Em processos aerados agitados mecanicamente, tanto a interação com as bolhas de gases fornecidas quanto a potência dissipada pelo impelidor promovem estresses mecânicos, porém ambos são necessários para que a aeração seja feita de forma adequada.

O fato de o oxigênio apresentar baixa solubilidade em meio aquoso a 37°C ($\approx 7 \text{ mg/l}$), além de a resistência para a transferência do O_2 da bolha para o meio líquido e, então, para a célula, são fatores que dificultam o fornecimento adequado de oxigênio (OTR - "oxygen transfer rate").

Forças que promovem a transferência de oxigênio estão relacionadas à diferença entre a concentração de saturação do oxigênio (C_s) e na concentração no meio (C), além do coeficiente de transferência de massa (k_L) e à área das bolhas (a). Já o consumo depende da taxa superficial de consumo de O_2 (q_{O_2}) e da concentração de células (X). Sendo assim, o balanço de massa para oxigênio é da seguinte forma:

$$\frac{dC}{dt} = \underbrace{k_L a (C_s - C)}_{\text{OTR}} - \underbrace{q_{O_2} X V}_{\text{OUR ("oxygen uptake rate")}}$$

Para aumentar ^{la transferência} o fornecimento de O_2 , pode-se aumentar a agitação e a vazão de gases fornecida (ambos afetam K_L) ou reduzir-se a área das bolhas de gás alimentadas, uma vez que bolhas menores promovem transferência de O_2 mais eficiente (menor área, maior interação interfacial) e ~~exone~~ aumento do "gas hold-up", uma vez que as bolhas ascendem em maior velocidade.

No caso de E. coli, mais resistentes a tensões de cisalhamento, tem-se mais espaço para realizar aumentos na agitação, na vazão e ~~na~~ redução no tamanho das bolhas, porém para células ~~CHO~~ alterações de tal tipo devem ser feitas de forma mais cuidadosa.

O fornecimento de gases pode ser feito de diferentes formas, como aeracão pela superfície (limitado pela área disponível), borbulhamento direto por macroporos ou microporos (diferentes tamanhos de bolha) ou pelo emprego de membranas semi-permeáveis.

(*) Aeracão pela superfície: promove menor tensão de cisalhamento, mas é limitada pela área de superfície. Pouco eficaz em se aumentar a escala, uma vez que ao aumentar-se o volume do biorreator, a área superficial aumenta de forma quadrática, enquanto o volume aumenta de forma cúbica.

(*) Borbulhamento direto: pode ser feita por aeradores microporos (geram microbolhas), comportes frequentemente por aço inoxidado ou por aeradores macroporos (macrobolhas, em torno de 1mm ou maior, dependendo do tamanho dos poros do aerador), sendo constituído também por aço.

Microporos são mais eficientes na transferência de O_2 , porém são de letais a células. Vale ressaltar que células interagem com as bolhas, sendo convocadas para a superfície. Quando as bolhas estouram, promovem movimentos bruscos, que podem levar à morte celular. O emprego de macro ou microaeradores é frequente ao se escalarem processos.

(*) Tubos/membranas semi-permeáveis: podem ser empregadas, sendo semi-permeáveis à passagem de gases, porém a montagem e limpeza do sistema é mais complexa, especialmente quando se considera sistemas escalonados.

O aumento da transferência de oxigênio pode ainda ser alcançada pelo emprego de chicanas, visto que promovem o aumento da turbulência no sistema e melhoram a transferência de massa. Por outro lado, esse aumento de tensões mecânicas e da formação de espuma e ambos podem ser prejudiciais, principalmente para células mais sensíveis.

Considerando os pontos apresentados, deve-se fazer o balanço entre vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de aeradação e estabelecer para se estabelecer a aeradação adequada em processos.

Pode-se considerar usar "setpoints" variáveis na concentração de oxigênio dissolvido e empregar o uso de ar comprimido, ou misturar O_2 ou O_2 puro, de modo a melhorar a aeradação de células.

Resalta-se ainda que a aeradação é importante não só para fornecer O_2 , mas também para "ventilar" o meio, removendo-se o CO_2 proveniente do metabolismo celular, de forma que este não atinja concentrações tóxicas para as células e não promova a acidificação do meio de forma excessiva.

É importante que o processo estabelecido seja robusto, tendo parâmetros críticos de processo bem ajustados para promover não só o crescimento celular, mas também a produção da proteína de interesse com a qualidade requerida.