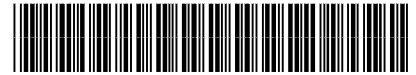




República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0404703-6 A**



(22) Data de Depósito: 28/07/2004
(43) Data de Publicação: 28/03/2006
(RPI 1838)

(51) Int. Cl⁷.:
C12M 3/00
C12M 1/04

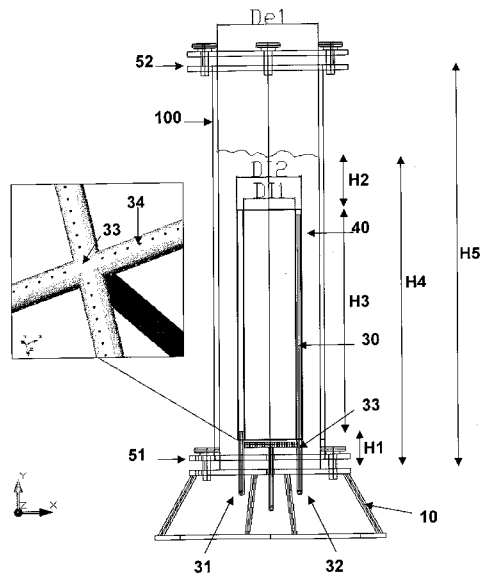
(54) Título: **BIORREATOR PNEUMÁTICO DE CIRCULAÇÃO INTERNA E USO DO MESMO**

(71) Depositante(s): Fundação Universidade Federal de São Carlos (BR/SP)

(72) Inventor(es): Alberto Colli Badino Junior, Carlos Osamu Hokka, Marcel Otavio Cerri

(74) Procurador: Rodrigo Teófilo Borges Campos

(57) Resumo: "BIORREATOR PNEUMÁTICO DE CIRCULAÇÃO INTERNA E USO DO MESMO". É descrito um biorreator pneumático de circulação interna que compreende: a) um primeiro cilindro (20), externo, transparente, com diâmetro externo D_{e1} e altura $H5$; b) um segundo cilindro (30), interno, com diâmetro interno, D_{i1} , e externo, D_{i2} , onde a diferença $D_{e1} - D_{i2}$ gera um espaço anular (40) por onde circula o meio reacional impulsionado pela quantidade de gás injetada por um aspersor (33) instalado na entrada do cilindro interno (30), e onde dito segundo cilindro (30): i) tem altura $H3$ inferior à altura $H5$ do cilindro externo (20), ii) fica completamente imerso no volume de reação; e iii) atua como um trocador de calor para o meio reacional; c) base (10); d) tampas superior (52) e inferior (51); e e) condensador (60) no topo da tampa superior (52). O uso do biorreator pneumático também é descrito.



BIORREATOR PNEUMÁTICO DE CIRCULAÇÃO INTERNA E USO DO MESMO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence ao campo dos biorreatores pneumáticos.

5 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Vários tipos de biorreatores de “fluxo ascendente de ar” ou “airlift” são descritos na literatura, sendo mais comuns os de circulação interna de cilindros concêntricos. Eles diferem fundamentalmente na escala, nas relações geométricas e nas geometrias do reator e do aspersor empregado, além dos
10 usos específicos a que se destinam alguns modelos.

Como literaturas clássicas sobre o assunto, pode-se citar: Onken. U.; Weiland, P., “Airlift Fermenters: Construction Behavior and Uses”. *Advances in Biotechnological Processes*, vol. 1, Alan R. Liss, pages 67-95, New York, 1983 e Chisti, M.Y. *Airlift Bioreactors*, Elsevier, New York, 1989.

15 Além dessas literaturas clássicas, encontra-se uma gama de trabalhos científicos e/ou tecnológicos publicados em que se utilizam tais biorreatores, na sua maioria em escala de bancada, em cultivos de microrganismos ou células de tecido para a produção de diversos produtos de interesse comercial ou simplesmente no tratamento aeróbio de resíduos.

20 Nesses trabalhos não se verificam propostas importantes relacionadas com a alteração da geometria do sistema visando melhorias nos processos de transferência de calor e massa do biorreator. São, na sua maioria, sistemas com até 15 litros de capacidade, com corpo do reator confeccionado em vidro com camisa d’água e aspersores ar tipo bico ejetor, placa porosa ou perfurada
25 ou anel perfurado.

A literatura de patentes também apresenta alguns documentos importantes sobre biorreatores tipo airlift de bancada.

A patente US 4.649.117 descreve um sistema de cerca de 4 L, encamisado, sem tubo interno, indicado para cultivos de microrganismos ou de
30 células de tecidos, constituído de duas câmaras; uma superior de maior diâmetro denominada “câmara de crescimento celular” e uma inferior de menor

diâmetro onde gás é alimentado, denominada “câmara de agitação” que proporciona, segundo os autores, “ótima mistura com um mínimo de cisalhamento às células”. O sistema foi testado com sucesso num cultivo de células de tecido animal, proporcionando uma viabilidade celular cerca de três vezes àquela obtida em sistema convencional.

A patente US 5.081.036, apresenta um biorreator airlift comercial de bancada (Bellco Glass Inc., Vineland, N.J., USA) preenchido na sua parte superior (não cônica) com seis esponjas comerciais confeccionadas com fios helicoidais de aço inoxidável, para servir de suporte sólido para células de tecido animal dependentes de ancoragem e melhorar a dissolução do gás aspergido nessa região do reator, definida como região de crescimento.

Na patente US 5.563.068 é descrito um biorreator, particularmente um sistema de cultivo de leito fixo com carregadores (suportes) macroporosos gerando alta densidade celular. O biorreator é formado por uma coluna cilíndrica com uma camisa externa, para controle de temperatura. A coluna possui um alargamento na parte superior para acomodar a espuma formada durante o cultivo. Esta coluna acomoda interna e concentricamente 2 cilindros confeccionados com tela de aço inox, formando um cesto anular (com base também em tela), para permitir escoamento radial de meio de cultura. A coluna externa e os cilindros internos cujas paredes são construídas em tela de aço inox formam câmaras correspondentes aos espaços anulares. O espaço anular intermediário é empacotado com pérolas esféricas de vidro poroso.

O pH e o OD são monitorados e controlados através de eletrodos posicionados na câmara externa. O cilindro em tela (ou perfurado) mais externo forma com a coluna externa uma câmara externa onde meio de cultura esco. Também o cilindro de tela interno forma uma câmara interna onde esco meio de cultura. Um aspersor tipo anel perfurado distribui mistura de ar e CO₂ na câmara formada pelo espaço anular externo, criando diferenças de densidade entre as câmaras externa e interna (ambas sem pérolas de vidro), onde circula meio de cultura. Estas diferenças provocam escoamento de meio de cultura radialmente através do espaço anular intermediário empacotado com esferas

de vidro poroso. Provocam também escoamento de meio de cultura entre as câmaras externa (espaço anular entre parede do biorreator e cilindro em tela ou perfurado) e câmara interna (cilindro em tela ou perfurado, interno) através de suas extremidades axiais. O biorreator é adequado para produção de células animais e de vetores de retrovirus.

Embora tais inventos proponham inovações no que se refere à geometria do sistema, modo de funcionamento e aplicações, tais sistemas apresentam algumas limitações que impedem sua comercialização em grande escala. São elas:

- 10 - não apresentam construção nem operação simples,
- são dedicados a tipos específicos de cultivos, não tendo caráter mais geral de aplicação,
- apresentam camisa d'água como dispositivo de troca de calor que, quando confeccionada em vidro, além do alto custo apresenta grande fragilidade frente
- 15 a choques, tensões e a variação de temperatura, que dificulta a manipulação do sistema, bem como a etapa de esterilização do mesmo por calor úmido (vapor),
- não apresentam dispositivos para promover transferências de calor e oxigênio tão eficientemente como os biorreatores convencionais tipo tanque
- 20 agitado e aerado disponíveis comercialmente.

Assim, apesar dos progressos e propostas da técnica, ainda há necessidade de um biorreator pneumático de bancada, robusto, de baixo custo, de construção e operação simples, e com dispositivos eficientes de transferências de calor e massa, de modo a fornecer opções mais amplas de aplicação.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De um modo amplo, a invenção refere-se a um biorreator pneumático que compreende:

- 30 a) um primeiro cilindro (20), externo, transparente, com diâmetro interno D_{e1} e altura $H5$;

b) um segundo cilindro (30), interno, com diâmetros internos, D_{i1} , e externo, D_{i2} , onde a diferença $D_{e1} - D_{i2}$ gera um espaço anular (40) por onde circula o meio reacional impulsionado pela quantidade de gás injetada por um aspersor (33) instalado na entrada do cilindro (30), e onde dito segundo cilindro (30):

- i) tem altura $H3$ inferior à altura $H5$ do cilindro externo (20)
- ii) fica completamente imerso no volume de reação; e
- iii) atua como um trocador de calor para o meio reacional;

c) base (10);

d) tampas superior (52) e inferior (51); e

e) condensador (60) no topo da tampa superior (52).

Ar, oxigênio, dióxido de carbono, nitrogênio ou mistura qualquer de gases é injetada por meio de um aspersor tipo "cruzeta", localizado na base do reator, na entrada do cilindro interno.

Assim, a invenção provê um biorreator pneumático que compreende cilindro externo, cilindro interno, base, dispositivos de circulação de água no cilindro interno e condensador no topo do cilindro externo.

A invenção provê também um biorreator pneumático de bancada, robusto, de baixo custo, de construção e operação simples, e com dispositivos eficientes de transferências de calor e massa, capaz de fornecer amplas opções de aplicação.

A invenção provê também um biorreator pneumático útil para cultivos aeróbios com altas demandas de O_2 envolvendo microrganismos filamentosos (fungos e bactérias) que geram caldos não Newtonianos viscosos.

A invenção provê igualmente um biorreator pneumático útil para a produção de etanol, enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, vitaminas, proteínas unicelulares e levedura de panificação.

A invenção provê também um biorreator pneumático útil para o tratamento aeróbio de águas residuárias.

A invenção provê também um biorreator pneumático útil para o cultivo de células de tecido vegetal ancoradas em “micro-carriers” (micro-suportes) ou não.

5 A invenção provê ainda um biorreator pneumático útil para o cultivo de células de tecido animal ancoradas em “micro-carriers” (micro-suportes) ou não.

A invenção provê também um biorreator pneumático útil para aplicações em geral como reator enzimático ou químico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

10 A FIGURA 1 anexa é um desenho esquemático do biorreator pneumático da invenção.

A FIGURA 2 anexa é um desenho do corpo do biorreator com um detalhe do aspersor de ar instalado na base do biorreator.

15 A FIGURA 3 anexa é um desenho que mostra em detalhe o cilindro interno do reator pneumático.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção, portanto é dirigida para um biorreator pneumático que compreende cilindro externo confeccionado em material transparente (vidro) e base, tampos superior e inferior, cilindro interno, aspersor e condensador
20 confeccionados em aço inoxidável. Os diversos itens que constituem o biorreator apresentam geometrias e relações entre diâmetros internos dos cilindros interno (D_{i1}) e externo (D_{e1}), distâncias entre as extremidades do cilindro interno e a base do reator (H_1) e o nível de meio reacional (H_2) e tipo de aspersor de modo a obter um biorreator com dispositivos eficientes de
25 transferências de calor e massa de ampla aplicação.

O reator é do tipo pneumático, pois dispensa impelidores para a movimentação do meio reacional ou do caldo de cultura.

A invenção será descrita a seguir por referência às Figuras anexas.

30 Conforme a Figura 1, o biorreator pneumático da invenção, geralmente designado pelo numeral (100) compreende uma base (10) sendo instalados sobre dita base (10): *i*) o cilindro externo transparente (20); *ii*) o cilindro interno

(30) dotado de entrada (31) de água, saída (32) de água para o controle de temperatura, e aspensor (33) de gás. A diferença de diâmetros dos cilindros (20) e (30) gera um espaço anular (40) por onde circula o meio reacional impulsionado pela quantidade de gás injetada pelo aspensor (33). O cilindro externo transparente (20) é dotado de tampa inferior (51) e superior (52). A tampa superior (52) é dotada de um condensador (60) para evitar perdas de água durante os processos. O sentido da movimentação do meio reacional está ilustrado na Figura 1.

O biorreator (100) inclui um condensador (60). O condensador (60) pode ser qualquer condensador eficiente, a título de exemplo, tipo casco e tubos, o que assegura uma eficiente retenção de água no sistema durante a operação.

A mistura e a circulação do meio reacional são induzidas pela injeção e movimentação do gás injetado via o aspensor (33). O movimento ascendente do gás aspergido a partir da base (10) do reator (100) carrega a fase líquida com células quando se trata de caldo de fermentação, pelo interior do cilindro interno (30). No topo (cabeça do reator), uma parte do gás injetado pelo aspensor (33) se desprende do líquido deixando o biorreator (100) e a outra parte desce juntamente com o líquido pelo interior do espaço anular (40), distinto da região por onde ascendeu. Na base do biorreator (100), o fluido descendente encontra a corrente ascendente de gás, uma região de baixa pressão, sendo novamente carregado ascendentemente por esta, o que confere ao meio reacional uma circulação interna contínua.

A capacidade do biorreator (100) de bancada é de 6 L. No entanto, biorreatores menores ou maiores são de fácil construção, mantendo-se as relações geométricas estabelecidas na escala de 6 L.

Conforme comentado acima, o biorreator da invenção deriva sua aplicabilidade ampliada em parte da geometria de sua construção e das relações entre diâmetros internos de cilindros interno (30) e externo (20) (D_{i1}/D_{e1}) e distâncias entre a extremidade do cilindro interno e a base do reator (H_1) e entre a extremidade do cilindro interno (30) e o nível do meio reacional (H_2).

As distâncias e relações geométricas do sistema encontram-se nas seguintes faixas estabelecidas como segue:

$$0,05 H_4 < H_1=H_2 < 0,20 H_4 \text{ e } 0,3 < D_{i1}/D_{e1} < 0,7$$

A Figura 2 anexa apresenta um desenho esquemático com um detalhe do aspensor (33) em forma de cruzeta, dotado de perfurações (34) para saída de gás, e o significado das dimensões H1 a H5, D_{i1}, D_{i2} e D_{e1}. H4 é a distância da base até a altura do meio reacional, e H5 é a distância total entre as tampas (51) e (52) do biorreator (100). As perfurações (34) têm 0,3 a 1,5 mm de diâmetro e são espaçadas de 5 a 10 mm ao longo do comprimento das hastes do aspensor (33).

A Figura 3 anexa apresenta um detalhe do cilindro interno (30) que é sustentado pelas próprias tubulações de entrada (31) e saída (32) de água, fixadas na base do reator.

Concentração de oxigênio dissolvido (OD) e pH são medidos por sondas esterilizáveis (não representadas) instaladas na tampa superior (52) do biorreator (100) ou em aberturas laterais (não representadas), ditas sondas sendo acopladas a medidores/transmissores comercialmente disponíveis.

O meio reacional ou meio de cultura de fermentação é introduzido no biorreator pneumático (100) através de bomba peristáltica. Após o término da reação ou do cultivo, o meio reacional ou caldo de fermentação é retirado do biorreator através de abertura (não representada) localizada na tampa inferior (51).

O fechamento do biorreator (100) é como segue: o cilindro externo (20) apresenta flanges nas duas extremidades. As tampas inferior (51) e superior (52) apresentam sulcos nas faces internas onde são encaixados anéis (“o-rings”) de silicone. Anéis de aço inoxidável são montados entre as flanges. Para fechamento das tampas (51,52), os anéis de silicone são encostados nas flanges e quatro parafusos recartilhados, rosqueados a mão para minimizar a tensão, são utilizados para unir os tampos (51,52) com os anéis de aço inoxidável, prensando as flanges.

As principais características do biorreator pneumático (100) que distinguem a invenção dos reatores do estado da técnica são como a seguir.

Assim, sob um aspecto, o cilindro interno (30) funciona como um dispositivo de troca de calor com o meio reacional com alta eficiência, pois além de apresentar grande área de troca, a transferência se dá tanto com a parcela de meio reacional que ascende pelo interior do tubo interno (30) quanto pela parcela que desce pelo espaço anular (40). Tal proposta elimina a necessidade de camisa d'água para o controle da temperatura do biorreator que, quando confeccionada em vidro, além do alto custo apresenta grande fragilidade frente a choques, tensões e a variação de temperatura, que dificulta a manipulação e a etapa de esterilização do sistema por calor úmido (vapor).

Para visualizar a capacidade de transferência de calor do biorreator da invenção, a Tabela 1 a seguir apresenta valores do coeficiente global de transferência de calor (U) em função da vazão de água de circulação pelo interior do tubo interno (Q_{TI}) e da vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}). Pode-se observar que tais valores encontram-se na faixa de 330 a 700 $W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$. Dito de outro modo, isso significa afirmar que na melhor condição de operação, a temperatura do meio reacional leva cerca de 10 minutos para ser elevada de 20 a 30 $^{\circ}C$.

TABELA 1

U ($W.m^{-2}.^{\circ}C^{-1}$)	Q_{TI} (mL/min)	ϕ_{ar} (vvm)
328,5	315,6	1,0
426,8	315,6	3,0
429,8	658,8	1,0
484,8	658,8	3,0
609,6	934,2	1,0
697,9	934,2	3,0

Sob um outro aspecto, o biorreator (100) apresenta alta capacidade de transferência de oxigênio. Esta característica é fruto da definição de relações geométricas próprias do sistema em conjunto com um tipo específico de

aspersor (33) (tipo "cruzeta") que apresenta orifícios (34) de 0,3 a 1,5 mm de diâmetro espaçados de 5 a 10 mm ao longo do comprimento de suas hastes. Tal geometria de aspersion minimiza a perda de carga na circulação da fase líquida, obtendo-se alta velocidade de circulação e, com isso, alta transferência de oxigênio.

Para fins comparativos, na Tabela 2 que segue são apresentados valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) para o sistema proposto na invenção (biorreator airlift de 6 L) e para um biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado, disponível comercialmente (biorreator Bioflo III de 5 L da New Brunswick Scientific Co., Inc.) em função da frequência de rotação (N) e da vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}). Os valores de k_{La} , um parâmetro que define a capacidade de transferência de oxigênio do biorreator, foram determinados pelo método dinâmico tradicional levando em consideração o atraso da resposta do eletrodo de oxigênio dissolvido. Pode-se notar a grande capacidade de transferência de O_2 do sistema proposto, superando a de um biorreator comercial de qualidade reconhecida.

TABELA 2

Biorreator Bioflo III Estado da Técnica 5 L			Biorreator da Invenção 6 L	
N (rpm)	ϕ_{ar} (vvm)	k_{La} (h^{-1})	ϕ_{ar} (vvm)	k_{La} (h^{-1})
800	0,5	230,0	3,0	122,6
800	1,0	232,2	4,0	220,7
1000	0,5	243,0	5,0	279,6
1000	1,0	262,5		

REIVINDICAÇÕES

1. Biorreator pneumático de circulação interna, caracterizado por que compreende:
 - 5 a) um primeiro cilindro (20), externo, transparente, com diâmetro interno D_{e1} e altura $H5$;
 - b) um segundo cilindro (30), interno, com diâmetro interno, D_{i1} , e externo, D_{i2} , onde a diferença $D_{e1} - D_{i2}$ gera um espaço anular (40) por onde circula o meio reacional impulsionado pela quantidade de gás injetada por um aspersor (33) instalado na entrada do cilindro (30), e onde dito
10 segundo cilindro (30):
 - i) tem altura $H3$ inferior à altura $H5$ do cilindro externo (20)
 - ii) fica completamente imerso no volume de reação; e
 - iii) atua como um trocador de calor para o meio reacional;
 - 15 c) base (10);
 - d) tampas superior (52) e inferior (51); e
 - e) condensador (60) no topo da tampa superior (52).
2. Biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que o cilindro interno (30) e dotado de
20 entrada (31) e saída (32) para água de refrigeração.
3. Biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que o meio reacional circula internamente no interior do dito biorreator de forma contínua.
4. Biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a
25 reivindicação 1, caracterizado por que o gás aspergido pelo aspersor (33) é ar, oxigênio, dióxido de carbono, nitrogênio ou mistura qualquer de gases.
5. Biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a
30 reivindicação 1, caracterizado por que o aspersor (33) em forma de cruzeta é dotado de perfurações (34).

6. Biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por que ditas perfurações (34) têm de 0,3 a 1,5 mm de diâmetro e são espaçadas de 5 a 10 mm ao longo do comprimento das hastes do aspersor (33).
- 5 7. Biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por que as distâncias e relações geométricas do sistema obedecem às faixas $0,05 H_4 < H_1 = H_2 < 0,20 H_4$ e $0,3 < D_{i1}/D_{e1} < 0,7$.
8. Biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a
10 reivindicação 1, caracterizado por que tem capacidade qualquer, desde que obedecidas as distâncias e relações geométricas estabelecidas.
9. Biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por que tem capacidade para 6 L.
10. Uso do biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a
15 reivindicação 1 em cultivos aeróbios com altas demandas de O_2 envolvendo microrganismos filamentosos, fungos e bactérias, que geram caldos não newtonianos viscosos.
11. Uso do biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a
20 reivindicação 1 em produção de etanol, enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, vitaminas, proteínas unicelulares e levedura de panificação.
12. Uso do biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a reivindicação 1 em tratamento aeróbio de águas residuárias.
13. Uso do biorreator pneumático de circulação interna de acordo com a
25 reivindicação 1 em cultivo de células de tecido vegetal ancoradas em "micro-carriers" ou isentas de ancoragem.
14. Uso do biorreator pneumático de acordo com a reivindicação 1 em aplicações em geral como reator enzimático ou químico.

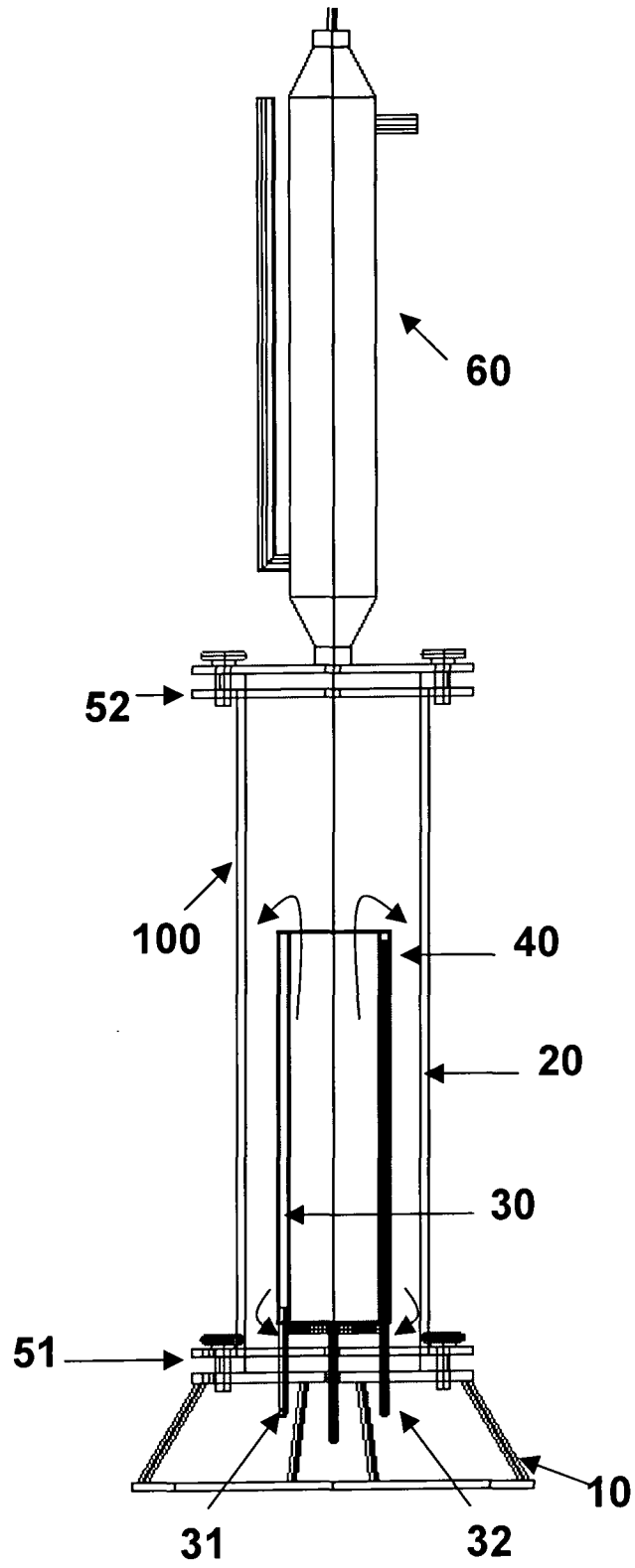


FIGURA 1

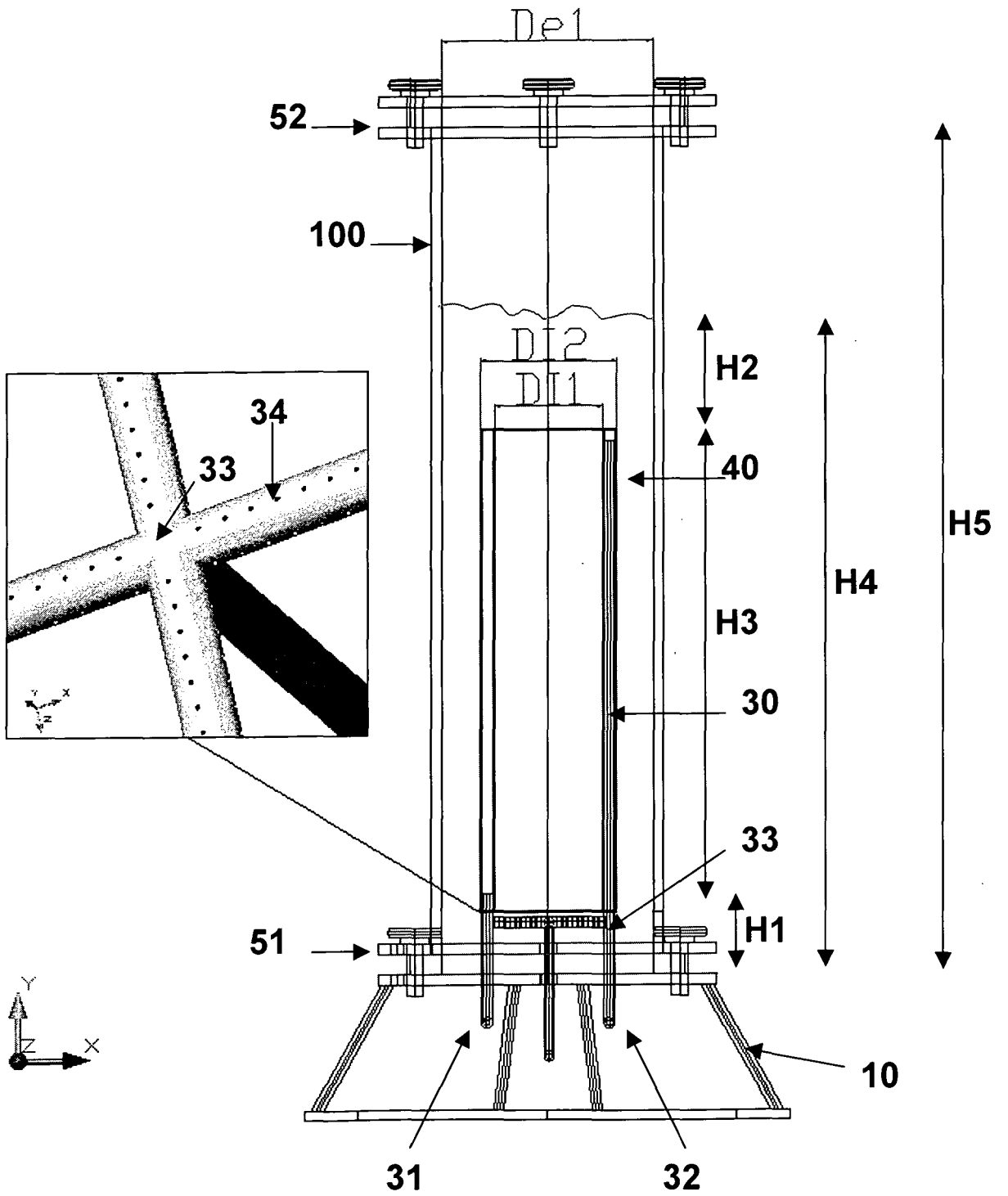


FIGURA 2

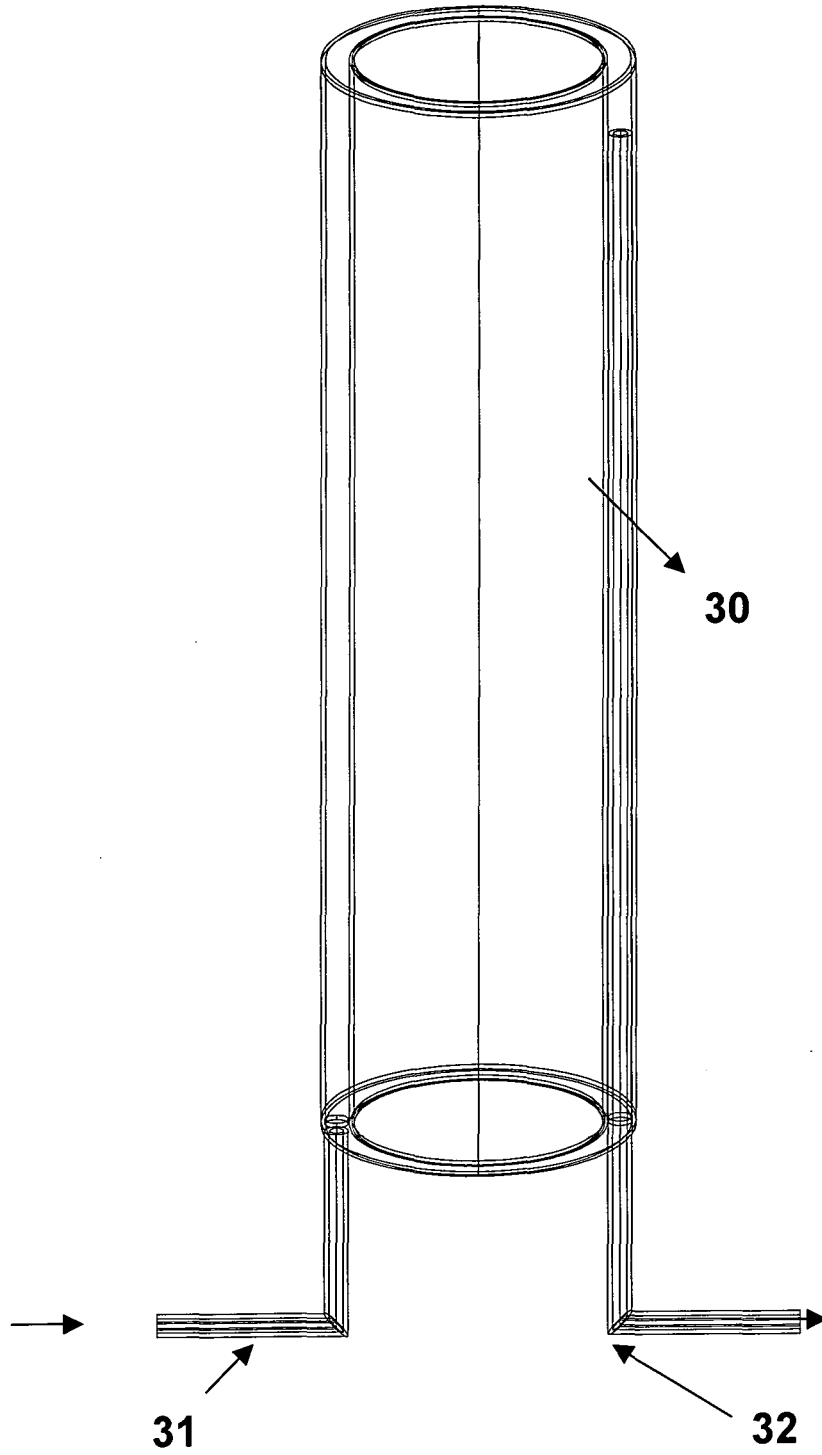


FIGURA 3

RESUMO**BIORREATOR PNEUMÁTICO DE CIRCULAÇÃO INTERNA E
USO DO MESMO**

É descrito um biorreator pneumático de circulação interna que
5 compreende: a) um primeiro cilindro (20), externo, transparente, com diâmetro
externo D_{e1} e altura $H5$; b) um segundo cilindro (30), interno, com diâmetro
interno, D_{i1} , e externo, D_{i2} , onde a diferença $D_{e1} - D_{i2}$ gera um espaço anular
(40) por onde circula o meio reacional impulsionado pela quantidade de gás
injetada por um aspersor (33) instalado na entrada do cilindro interno (30), e
10 onde dito segundo cilindro (30): *i*) tem altura $H3$ inferior à altura $H5$ do cilindro
externo (20), *ii*) fica completamente imerso no volume de reação; e *iii*) atua
como um trocador de calor para o meio reacional; c) base (10); d) tampas
superior (52) e inferior (51); e e) condensador (60) no topo da tampa superior
(52). O uso do biorreator pneumático também é descrito.