



I. Evolução do Tema

Tanto o processamento de materiais de origem biológica como os processos que empregam células, enzimas e outros componentes ou produtos do metabolismo celular foram incorporados aos domínios da Engenharia Química na primeira década da segunda metade do século XX. O termo *Engenharia Bioquímica* foi utilizado pela primeira vez, segundo Humphrey (2000), em 1946. A difusão desse termo tornou-se verdadeiramente expressiva com a publicação de notáveis livros-texto (Steel, 1957; Webb, 1964 e Aiba, 1965), que introduziram este tema de modo definitivo entre as especialidades da Engenharia Química.

A produção em larga escala de antibióticos por fermentação submersa é apontada por muitos autores como fundamental força motriz para a intensificação das pesquisas e a geração de conhecimentos nessa, então, nova especialidade. As universidades americanas, japonesas e européias foram ágeis em incorporá-la aos seus currículos universitários e à sua estrutura acadêmica. O Brasil também respondeu às demandas de formação e investigação nesse novo tema e algumas universidades incorporaram a nascente *Engenharia Bioquímica* como parte integrante da Engenharia Química, conferindo-lhe um status departamental, o que representou, à época, um sólido reconhecimento da importância daquele ramo do saber. A Escola Politécnica da USP e a Escola de Química da UFRJ, salvo engano, foram as primeiras unidades universitárias brasileiras que criaram Departamentos de *Engenharia Bioquímica*. Os Professores Walter Borzani (USP) e Vitalis Moritz (UFRJ) lideraram esses

* Por Denise Maria Guimarães Freire, Leda dos Reis Castilho e Geraldo Lippel Sant'Anna Jr.

departamentos por muitos anos e representam um exemplo para as atuais gerações que militam nessa especialidade.

No período de 1950 a 1975, houve um grande avanço e consolidação do conhecimento relativo aos fundamentos e às múltiplas aplicações da *Engenharia Bioquímica*, que incorporou parte importante do conteúdo e da abordagem das chamadas Operações Unitárias e que desenvolveu suas temáticas próprias ou específicas. Tal foi o caso da cinética microbiana, da cinética das reações catalisadas por enzimas, dos fenômenos de transporte relevantes para o projeto de biorreatores, do controle de bioprocessos, da recuperação, separação e purificação de bioprodutos, entre outras.

A partir de meados dos anos oitenta, os resultados de um novo ramo científico, a *Biologia Molecular*, começaram a emergir com notável impacto. O termo *Biotecnologia*, apesar de substantivo, passou a ser conjugado em todos os tempos e utilizado em todas as suas variantes. A *Engenharia Bioquímica*, então bem estabelecida, foi gradualmente incorporando os avanços decorrentes da tecnologia do DNA recombinante e dos seus desdobramentos mais tangíveis. De um certo modo, pode-se dizer que o impacto desses desenvolvimentos sobre a *Engenharia Bioquímica* foi de tal monta, que houve um necessário período de “fase lag”, até começarem a surgir respostas aos novos desafios impostos pelo progresso científico que, como é sabido, não é simplesmente linear, mas, ao contrário, apresenta rupturas e saltos significativos.

Para ativar a memória é interessante observar a Tabela 1, que resume alguns dos marcos evolutivos da chamada *Biotecnologia*. É surpreendente notar a rapidez dos avanços verificados desde a proposta de estrutura de dupla hélice para o DNA, por Crick e Watson, em 1953.

Lidar com os rápidos e marcantes avanços da Biologia ocorridos nas duas últimas décadas constitui-se num desafio. Primeiramente, é necessário reconhecer o enorme potencial dessas técnicas emergentes e considerar que abordagens clássicas da *Engenharia Bioquímica* (otimizações de meios de cultivo, desenvolvimento de biorreatores, incremento das taxas de transferência de oxigênio, modelagem cinética, entre outras) constituem-se num precioso acervo de conhecimentos consolidados, que devem servir de base para se enfrentar novas questões e temáticas como a engenharia metabólica, a modelagem molecular aplicada a proteínas e bioprodutos, as técnicas moleculares de seleção de

organismos produtores, a bioinformática, a biossegurança, as técnicas de separação por afinidade e outros temas que têm permitido alcançar avanços inquestionáveis em termos de produtividade dos processos e qualidade dos produtos, que apesar de superarem em muito aqueles possíveis de serem obtidos pelo uso de técnicas clássicas, não prescindem do acervo de conhecimentos delas oriundos.

Tabela 1. Marcos históricos da Biotecnologia.

A partir dos anos vinte Descoberta da penicilina por Fleming (1928/29) Produção industrial de penicilina (1941/44) Produção de vitamina B ₁₂ Elucidação da estrutura molecular do DNA por Watson e Crick (1953) Produção de amino ácidos (1957)
A partir dos anos oitenta Desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular Estabelecimento de processos industriais com microrganismos recombinantes Estabelecimento das bases para o desenvolvimento da Engenharia Metabólica Obtenção de plantas e animais transgênicos Elucidação do genoma humano Início dos trabalhos sobre o proteoma humano

Incorporar os conhecimentos advindos das ciências e interpretá-los sob a ótica da Engenharia Química, promovendo a sua tradução tecnológica, conviver num ambiente multi- disciplinar, estabelecendo equipes com competências diferenciadas, são pressupostos básicos para o estabelecimento de novos patamares de atuação para a *Engenharia Bioquímica*.

No início de 2000, foi publicado um estudo denominado *Technology Vision 2020, The US Chemical Industry*, que fez uma prospecção a respeito dos temas que deveriam merecer o interesse da Indústria e da Engenharia Química nas décadas futuras. No que se

refere aos *Bioprocessos* e à *Biotecnologia*, as recomendações que emergiram desse trabalho foram as seguintes:

- Apoiar a pesquisa e o desenvolvimento de biocatalisadores mais potentes e eficientes; de tecnologias de processo mais efetivas e de materiais de baixo custo para os bioprocessos;
- Alargar o conhecimento de base relevante para os bioprocessos industriais (engenharia metabólica, descoberta de novas enzimas e otimização de seu desempenho, tecnologias mais eficientes de reação e de separação) e empregar esses conhecimentos e os resultados da pesquisa em Biotecnologia em saúde e na agricultura, buscando ainda novas oportunidades para os bioprocessos;
- Buscar o necessário apoio governamental e sua participação em projetos de pesquisa e desenvolvimento (P&D) pré competitivos na área de Biotecnologia, sobretudo para projetos de desenvolvimento tecnológico e de demonstração de longo termo e alto risco.

Essas recomendações de caráter geral revelam a preocupação das comunidades científica e industrial norte-americanas com a incorporação das novas descobertas e desenvolvimentos, que estão ocorrendo nas áreas científicas, à tecnologia. Deve-se ressaltar, que, embora não expresso literalmente, há um forte interesse estratégico nessas recomendações, que também realçam o papel do Estado no processo de desenvolvimento científico e tecnológico.

E nós, brasileiros, que reflexões devemos fazer a respeito do futuro da Biotecnologia? Que temas devemos inserir em nossos projetos de investigação, de modo a manter sintonia com as inovações e senso de realidade?

São questões de difícil resposta, sobretudo, se não houver um projeto de desenvolvimento industrial para o País. De todo modo, qualquer ação para alavancar o setor de Biotecnologia demandará um amplo domínio dos conhecimentos e das técnicas modernas, resultantes do avanço científico e tecnológico. A disponibilidade de equipes multidisciplinares e competentes é também um pré-requisito para qualquer projeto de desenvolvimento do setor.

Assim, sabendo-se que *estudar e investigar é preciso* e, também, *precioso*, pretende-se apresentar e discutir, a seguir, alguns temas de ponta ou de fronteira na especialidade de *Engenharia Bioquímica*.



II. Presente e Futuro

Qualquer exercício de futurologia é sempre arriscado, no entanto, o exame do estado da arte em vários temas permite apontar algumas tendências e desafios que se apresentam para a *Engenharia Bioquímica*.

A principal alteração ocorrida nos últimos anos consistiu, como mencionado por Bailey (1999), na mudança do foco de atenção dos engenheiros bioquímicos do tanque de fermentação de aço inox para as células individuais e suas rotas metabólicas.

De fato, a explosão de conhecimentos no campo molecular tem promovido uma mudança de enfoque, bem como uma mudança na concepção dos bioprocessos. Se, no passado, o engenheiro bioquímico estava interessado no aumento de escala de processos para produzir substâncias com demandas de mercado do tipo "commodities", com produção da ordem de toneladas por dia, esse profissional, atualmente, tem se deparado com o desafio de implementar processos para obtenção de produtos, cuja demanda é da ordem de quilogramas por ano. Ademais, esses produtos têm que apresentar um grau de pureza elevado e atender as estritas exigências dos órgãos regulatórios.

As novas demandas têm levado à revisão de conceitos estabelecidos, como, por exemplo, a retomada dos processos operados em batelada ou batelada alimentada. Esses últimos têm sido beneficiados pelo importante desenvolvimento de instrumentos de monitoramento e controle.

O conceito de manipulação das rotas metabólicas com o propósito de selecionar organismos com propriedades desejadas é antigo. Há vários exemplos de êxito dessas técnicas na área de produção de amino ácidos, antibióticos, solventes e vitaminas. Essas técnicas baseiam-se no uso de mutagênicos químicos e em procedimentos de seleção e indentificação de linhagens altamente produtivas. Embora essas técnicas tenham tido grande êxito e difusão, o comportamento metabólico das linhagens selecionadas não era devidamente conhecido e caracterizado. A mutagênese baseava-se num processo randômico, que tinha alguma base científica complementada por elementos da arte de saber fazer.

A Figura 1 ilustra as diversas áreas do conhecimento e as ferramentas que contribuem para a atuação do novo profissional da *Engenharia Bioquímica*.

Serão discutidas, a seguir, algumas das áreas que dão sustentação à atual e futura Biotecnologia.

II.1 Biologia Molecular e Engenharia de Proteínas

Atualmente, encontram-se disponíveis técnicas moleculares bastante sensíveis, as quais, acopladas com a bioinformática e com modernas técnicas analíticas, permitem detectar e distinguir microrganismos ao nível celular e têm revelado uma biodiversidade em ambientes naturais, impossível de ser detectada há dez anos atrás (Lorenz *et al.*, 2002). Superando as técnicas tradicionais de cultivo, a denominada biblioteca de DNA metagenômico, após extração e clonagem do DNA ambiental, serve como uma notável fonte para a descoberta de novas enzimas e substâncias bioativas.

Considerando o Brasil, país que apresenta uma enorme biodiversidade, pode-se aquilatar o grande potencial dessas técnicas para selecionar organismos com alta capacidade produtiva.

A riqueza dos sistemas biológicos naturais é imensa, entretanto apenas uma pequena parte deste repertório foi descoberto e explorado como pode ser observado na Tabela 2. Com o atual conhecimento da biodiversidade já foi possível produzir um grande número de produtos naturais para as indústrias farmacêutica, química e agroquímica. Entretanto, um maior e mais diverso universo de compostos naturais e processos ainda permanece oculto. As novas técnicas denominadas "high-through-put technologies" já estão contribuindo para desvendar este universo e gerar novas substâncias bioativas (Dordick *et al.*, 2002).

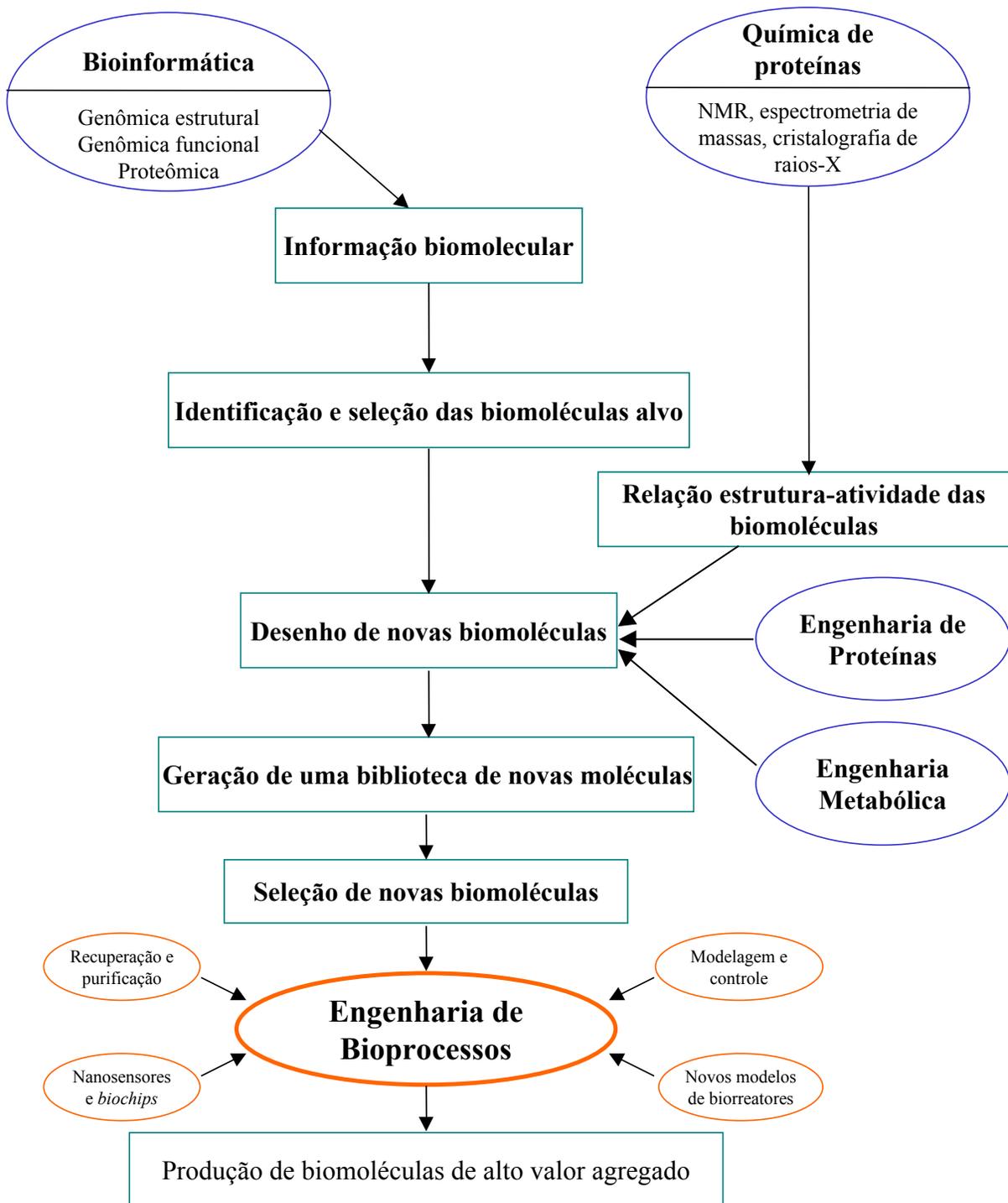


Figura 1. Fluxograma indicativo das bases e ferramentas da moderna *Engenharia Bioquímica* (Adaptado de Ryu *et al.*, 2000).

Tabela 2. Espécies biológicas conhecidas e estimadas (Bull *et al.*, 1992).

Grupo	Espécies conhecidas	Espécies totais estimadas	Espécies conhecidas (%)
Virus	5.000	130.000	4
Bacteria	4.760	40.000	12
Fungos	69.000	1.500.000	5
Algas	40.000	60.000	67
Briófitas	17.000	25.000	68
Giminospermas	750		
Angiospermas	250.000	270.000	93
Protozoários	30.800	100.000	31
Porífera	5.000		
Quinidária	9.000		
Nematóides	15.000	500.000	3
Crustáceos	38.000		
Insetos	800.000	10.000.000	13
Artrópodos e invertebrados (outros)	132.460		
Moluscos	50.000		
Equinodermas	6.100		
Anfíbios	4.184		
Répteis	6.380		
Peixes	19.000	21.000	90
Pássaros	9.198		≈100
Mamíferos	4.170		≈100

A análise da sequência completa do genoma de um organismo alvo permite obter informação sobre todos os genes codificados naquele organismo. Esta abordagem permite não apenas a identificação de genes potencialmente valiosos de um conjunto de genes alvo, como também identifica genes que não eram esperados de serem codificados neste genoma. Este enfoque tem sido particularmente interessante para a seleção de organismos que vivem

em condições ambientais extremas, como hipertermófilos, psicrófilos, acidófilos, halofílicos e barófilos (Klenk *et al*, 2002). A análise completa do genoma de tais organismos constitui-se em uma forma econômica de selecionar bons produtores para obtenção de enzimas que possuem capacidade de operar nestas condições extremas, o que, do ponto de vista de muitos processos industriais, pode ser de enorme interesse.

Os organismos extremófilos classificados no Domínio Archaea possuem características bioquímicas únicas, que viabilizam sua sobrevivência nos ambientes mais inóspitos da Terra. O estudo da bioquímica desses organismos tem permitido esclarecer e entender a evolução celular e revelar potenciais aplicações para a Biotecnologia (Bullock, 2000).

As técnicas moleculares têm despertado muito interesse na chamada Biotecnologia Ambiental. A caracterização taxonômica dos microrganismos presentes nos sistemas de tratamento biológico de efluentes e nos processos de biorremediação de solos contaminados é uma tarefa extremamente difícil, devido às limitações apresentadas pelas técnicas microbiológicas clássicas e à própria dinâmica da comunidade microbiana, que por sua vez é influenciada por muitas variáveis bióticas e abióticas (Rittmann, 2002).

Recentemente, várias técnicas moleculares têm sido propostas para superar as limitações existentes, aportando elementos para a compreensão da ecologia microbiana desses sistemas e fornecendo uma base sólida para o controle e a engenharia desses processos. É crescente o interesse pela utilização de técnicas de Biologia Molecular nos complexos sistemas microbianos encontrados nos processos de tratamento de efluentes e de biorremediação. Um exemplo disso é a edição de um número especial da revista *Water Environment Research* (Vol. 74, No.5, 2002) contendo diversos artigos sobre a aplicação das técnicas moleculares para avaliação de diversos tipos de tratamento biológico.

Cabe ressaltar que a maioria dos estudos sobre essa matéria foi realizada em países de clima temperado. Pouquíssimos estudos sobre a diversidade dessas comunidades foram realizados para ambientes de clima tropical. Visto que essa diversidade microbiana varia em função das características dos efluentes e de fatores abióticos, a investigação sobre a ecologia microbiana de sistemas operados em nossas condições climáticas é uma tarefa de extrema necessidade e relevância.

As técnicas de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) podem ser empregadas com a finalidade de gerar verdadeiros perfis da comunidade microbiana presente em sistemas de tratamento. A técnica FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) é uma ferramenta de grande potencial para identificar a presença de grupos específicos em comunidades microbianas, utilizando sondas fluorescentes.

Uma nova área do conhecimento, que surgiu dos desenvolvimentos científicos de diversos setores, consiste na Engenharia de Proteínas, que tem permitindo que o desempenho de catalisadores seja aprimorado e ajustado ("tailor made") às condições almejadas em um dado bioprocessos. A modificação de resíduos de amino ácidos (acetilação, amidação ou oxidação) ou a promoção de ligações covalentes com ligantes específicos só se tornou realidade graças aos avanços alcançados com o conhecimento estrutural das proteínas, em decorrência do avanço das técnicas de purificação, do desenvolvimento das técnicas de modelagem molecular e da aplicação de modelos mecanísticos de cinética enzimática, associados à tecnologia do DNA recombinante.

Uma dessas abordagens, denominada mutagênese sítio dirigida, vem sendo aplicada com sucesso em enzimas como glicose isomerase, renina, tripsina e outras para alterar as propriedades catalíticas ou de estabilidade dessas enzimas (Law, 1996). A mutagênese sítio dirigida está baseada na possibilidade de construção *in vitro* de sequências de moléculas de DNA e sua utilização para construção de um gene mutado diretamente ou modificado em pares específicos de bases. Os genes podem ser rompidos pela inserção de fragmentos de DNA (cassetes), eliminando deste modo a função do gene de tipo selvagem e conferindo um novo fenótipo à célula (Madigan *et al.*, 1997).

II.2 Engenharia Metabólica

A Engenharia Metabólica pode ser conceituada como uma metodologia integrada de análise e síntese, com o objetivo de aprimorar os fluxos metababólicos para a produção de um dado bioproduto. Os bioprocessos são sistemas multi-hierárquicos que se estendem de níveis macroscópicos até níveis microscópicos (Shimizu, 2002). Apesar dessa definição

poder variar de autor para autor, um dos principais livros editados nesse tema conceitua a Engenharia Metabólica como "o melhoramento específico da formação do produto ou das propriedades celulares através da modificação de uma ou mais reações bioquímicas específicas ou da introdução de novas reações utilizando a tecnologia do DNA recombinante" (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

O emprego da Engenharia Metabólica tem sido possível graças ao desenvolvimento de técnicas auxiliares, quais sejam: procedimentos matemáticos de análise de fluxos metabólicos (MFA), modelagem reacional e programação linear, técnicas analíticas que empregam carbono marcado e ressonância magnética nuclear (NMR), cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS). Esse conjunto de técnicas permite obter uma análise da distribuição de fluxos metabólicos mais precisa, devido à possibilidade de efetiva determinação de metabólitos intra e extracelulares, permitindo validar ou não o modelo metabólico proposto.

A combinação de métodos analíticos para a quantificação de fluxos metabólicos e o seu controle permite identificar as possíveis limitações que impedem ou restringem a produção do produto alvo. A partir dessas informações e com o uso de técnicas da Biologia Molecular, podem ser implementadas as modificações genéticas necessárias para eliminar "gargalos" metabólicos e obter-se o almejado incremento da produção do bioproduto alvo. Esse enfoque constitui a essência da Engenharia Metabólica (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Um excelente exemplo nesse contexto é a tecnologia desenvolvida pela *Roche Vitamins Ltd.*, que empregou a Engenharia Metabólica para incrementar rotas específicas da produção de riboflavina (vitamina B2) em detrimento de rotas que levam à geração de subprodutos. Essa abordagem permitiu aumentar tão significativamente a produção da vitamina, que a mesma passou a cristalizar no próprio meio de cultivo (Hohmann, 2002).

II.3 Biotransformações

Outro importante campo que tem atraído muito interesse dos pesquisadores atende pela denominação de *Biotransformações*. As reações químicas mediadas por microrganismos ou por preparações enzimáticas são assim denominadas e envolvem muitos

tipos possíveis de transformações, como oxidações, reduções, hidrólises, condensações, isomerizações e formações de duplas ligações (C=C) ou de ligações de heteroátomos.

A principal utilização dos processos de biotransformação está relacionada à chamada química dos compostos quirais, que têm tido grande aplicação na produção de fármacos, de aromas para a indústria de alimentos e de inseticidas.

Antunes (1999) estima que, em 2010, cerca de 50% de todas as drogas sejam produzidas apenas na forma opticamente pura do princípio ativo, e que, em 2025, as biotransformações serão utilizadas na produção de 50% das drogas quirais.

Um ramo de muito interesse para a aplicação das biotransformações é o da produção de oligossacarídeos. Recentes pesquisas sobre o papel dessas substâncias na superfície celular têm revelado a sua importante função nos processos de reconhecimento e sinalização bioquímica, mas, no entanto, o desenvolvimento das aplicações farmacêuticas dessas substâncias não tem progredido favoravelmente devido, principalmente, à não disponibilidade desses oligossacarídeos. Nesse contexto, a síntese de oligossacarídeos utilizando glicosil transferases obtidas pela tecnologia do DNA recombinante pode ser um dos métodos mais vantajosos para a produção em larga escala desses produtos (Endo *et al.*, 2002).

Outra área do conhecimento que vem sendo investigada desde os anos 80 (Klibanov, 1986) é a catálise enzimática em meios aquo-restritos (solventes orgânicos e meios super críticos). Apesar do extenso conhecimento acumulado e da aplicação desta tecnologia na produção de diversos produtos de interesse da indústria farmacêutica, de cosméticos e de química fina, ainda existem diversos temas para investigação, a saber: cinética enzimática em meios aquo-restritos, mutagênese sítio dirigida para aumentar a estabilidade e modificar a especificidade de enzimas nestes meios racionais, assim como implementação de novas técnicas de imobilização (multipontual, sistema sol-gel, nanoimobilização) para incrementar a estabilidade enzimática.

II.4 Modelagem Matemática e Biorreatores

O tema da modelagem matemática sempre acompanhou a evolução da *Engenharia Bioquímica*, desde os trabalhos clássicos de Fredrickson e de Ramkrishna até os mais recentes e se constitui em uma ferramenta indispensável para o tratamento dos dados e para a formulação racional e compreensão das complexas interações que ocorrem nos sistemas biológicos. Esses atributos já foram devidamente confirmados por inúmeros trabalhos já realizados. Há uma certa impressão, como bem citado por Bailey (1998), que o impacto dessa contribuição para a Biotecnologia encontra-se limitado no momento atual. No entanto, como esse autor comenta, isso deverá se alterar no futuro, se houver uma sintonia com as oportunidades emergentes e com a incorporação de novas ferramentas à abordagem matemática dos bioprocessos. A evolução dos computadores e a utilização de poderosas ferramentas matemáticas serão de grande valor para os mais diversos campos da Biotecnologia, com grandes impactos em áreas que abrangem desde a genômica funcional até o desenvolvimento de biorreatores e equipamentos de separação empregando fluidodinâmica computacional (CFD) (Bailey, 1998; Castilho e Anspach, 2003; Unger *et al.*, 2000).

As estratégias de monitoramento e de controle dos bioprocessos poderão ser revistas e/ou aprimoradas com o surgimento de nano-sondas e nano-sensores (sonda e transdutor), que possibilitam o monitoramento do processo em nível biomolecular. O monitoramento de variáveis no interior das células microbianas poderá promover grandes avanços no entendimento das funções celulares, com desdobramentos importantes para os bioprocessos (Vo-Dinh *et al.*, 2001).

No campo da engenharia de reatores, observa-se hoje uma implantação crescente de biorreatores com membranas, que promovem a produção e a separação de produtos de modo praticamente concomitante. Esses tipos de reatores permitem operar bioprocessos com alta densidade celular, reduzindo tempos de residência e aumentando a produtividade do processo. A extração de produtos de fermentação do meio, que podem apresentar efeitos tóxicos ou inibitórios às enzimas ou às células íntegras, é também uma vantagem importante dos biorreatores com membranas. As membranas de nanofiltração permitem a

retenção de cofatores enzimáticos, ampliando o leque de aplicação desses reatores para as aplicações que envolvem diversas enzimas intracelulares, que requerem cofatores (Fernandes *et al.*, 2003).

Um grande número de aplicações de biorreatores com membranas vem se concentrando na área de tecnologia ambiental e, mais especialmente, no tratamento de efluentes, visando sobretudo o re-uso de água nas indústrias e em outros empreendimentos (hotéis, *shopping centers*, parques temáticos, entre outros).

O conhecimento dos aspectos fundamentais dos bioprocessos (cinética e transferência de massa) associado ao domínio dos mecanismos de "*fouling*" e polarização por concentração nas membranas permitirá o aprimoramento dessa tecnologia e o seu uso nas mais variadas aplicações biotecnológicas.

II.5 Cultivo de Células Animais

Células animais vêm sendo cada vez mais empregadas para a produção de proteínas recombinantes para uso humano. Estas células, ao contrário dos microrganismos, são capazes de realizar as complexas modificações pós-traducionais, em especial a glicosilação, requeridas para a síntese correta das complexas moléculas que o corpo humano requer como medicamento (Savage, 1997). Nos últimos anos, dezenas de produtos de uso terapêutico e diagnóstico, obtidos através do cultivo de células animais, foram licenciados pelas agências reguladoras (Tabela 3) e muitos mais encontram-se, atualmente, em fase de testes clínicos.

Dentre os muitos produtos obtidos pelo cultivo de células animais já comercialmente disponíveis, pode-se citar como exemplos os fatores sanguíneos VIII e IX, usados no tratamento da hemofilia; a eritropoietina, usada no tratamento da anemia; e diversos anticorpos monoclonais (MAbs), empregados no combate a diferentes tipos de câncer (Castilho e Medronho, 2002). Vale também citar que vários anticorpos monoclonais produzidos por células animais estão sendo pesquisados, hoje em dia, com vistas ao tratamento da AIDS (Castilho, 2001; Kunert *et al.*, 2000).

Embora o foco inicial dos cultivos com células animais estivesse centrado em produtos para uso diagnóstico, a ênfase tem se deslocado cada vez mais para as proteínas terapêuticas (Griffiths, 1992).

Tabela 3. Alguns produtos aprovados derivados de células animais (Castilho e Medronho, 2002).

Produto	Proteína ou MAb/antígeno	Indicação	Células	Data da 1ª aprovação	País
Activase	t-PA	infarte agudo do miocárdio	CHO	1987	vários
Avonex	β -interferon	esclerose múltipla	CHO	1996	EUA
Bene Fix	fator sanguíneo IX	hemofilia B	CHO	1997	EUA
Campath/Alemtuzumab	MAB humanizado/CD52	leucemia linfática crônica	CHO	2001	EUA
Cerezyme	glucocerebrosidase	doença de Gaucher	CHO	1994	EUA, Áustria, Nova Zelândia
Enbrel/Etanercept	proteína de fusão (TNFR/hIgG1)	artrite reumatóide	CHO	1998	EUA
Epogen/Procrit	EPO	anemia	CHO	1989	vários
Epogin/Recormon	EPO	anemia	CHO	1990	Japão, Europa
GenHevac B Pasteur	HBsAg	hepatite B	CHO	1989	França
Gonal-F	FSH	infertilidade feminina	CHO	1995	Suécia, Finlândia, EUA
Granocyte	G-CSF	anemia, neutropenia	CHO	1991	Japão, Europa
HB Gamma	HBsAg	hepatite	CHO	1990	Japão
Herceptin/Trastuzumab ^a	MAB/HER2	câncer de seio	CHO	1998	EUA
Infliximab/Remicade ^{a,b}	MAB/TNF α	doença de Crohn	n.d.	1998	EUA
Kogenate ^b	fator sanguíneo VIII	hemofilia A	BHK	1993	vários
MAbs para diagnóstico <i>in vitro</i>	cerca de 100 diferentes	vários	vários	desde 1980	vários
Myoscint ^c	MAB/miosina	agente de imagem cardíaca	n.d.	1989	Europa, EUA
Novo Seven	fator sanguíneo VIIa	hemofilia A e B	BHK	1996	Suíça, Europa, EUA
Panorex ^a	MAB/n.d.	câncer colorretal	n.d.	1995	Alemanha
Prosta Scint ^c	MAB/PSMA	câncer de próstata	n.d.	1996	EUA
Pulmozyme	DNase I	fibrose cística	CHO	1993	Suécia, EUA, Suíça
Puregon	FSH	infertilidade feminina	n.d.	1996	Dinamarca
Recombinate	fator sanguíneo VIII	hemofilia A	CHO	1992	vários
Refacto ^b	fator sanguíneo VIII	hemofilia A	CHO	2000	EUA
ReoPro ^{a,b}	MAB/Platelet IIb/IIIa	complicações cardíacas	mieloma de rato	1994	EUA
Rituxan ^a	MAB/CD20	linfoma do tipo non-Hodgkin	CHO	1997	EUA
Simulect/Basiliximab ^a	MAB/IL2R α	rejeição aguda ao transplante de rim	mieloma de rato	1998	EUA
TNKase/Tenecteplase	t-PA	infarte agudo do miocárdio	CHO	2000	EUA
Verluma ^c	MAB/n.a.	câncer de pulmão	hibridoma	1996	EUA
Wellferon	interferon α -N1	hepatite C	linfoblastóide hum.	1999	EUA

n.d.: informação não disponível; CHO: linhagem de células de hamster isolada em 1957 por Puck *et al.*; BHK: linhagem de células de hamster isolada em 1963 por Stoker *et al.*; ^aanticorpo monoclonal de uso terapêutico; ^bproduzido por processo contínuo de cultivo em perfusão; ^canticorpo monoclonal para diagnóstico *in vivo*

Além disso, entre os produtos mais recentes, há uma clara tendência de emprego de doses cada vez maiores. Enquanto as doses dos primeiros produtos oriundos da tecnologia do DNA recombinante ficavam na faixa de sub-miligramas, vários dos novos produtos são administrados, atualmente, em dezenas ou centenas de miligramas (Lubiniecki, 1998). Estes fatos não somente realçam a importância de se obter níveis de qualidade de processo e de pureza do produto mais elevados, como também indicam a necessidade de se buscar processos mais eficientes para o crescimento celular, expressão e purificação de proteínas.

Além de estudos de expressão proteica, de fisiologia e de otimização dos meios de cultura, é fundamental o desenvolvimento dos aspectos de engenharia relacionados aos sistemas de produção, a fim de proporcionar aumentos de produtividade, sem os quais não será possível atingir-se os níveis de produção requeridos atualmente (medidos em quilogramas).

Desta forma, a *Engenharia Bioquímica* tem, nos dias atuais, um papel importante a desempenhar na otimização de processos de cultivo de células animais e de purificação dos produtos obtidos, assim como no desenvolvimento e ampliação de escala de biorreatores e de equipamentos destinados ao cultivo e separação de células animais. A nível internacional, é limitado o número de grupos pesquisando os aspectos de engenharia do cultivo de células animais e os processos de recuperação e purificação das proteínas produzidas. No Brasil, a situação nesta área específica é ainda mais limitada, pois, embora haja diversos grupos utilizando células animais em suas pesquisas, a quase totalidade deles se concentra nos aspectos bioquímicos e biológicos, sem fins tecnológicos.

II.6 Processos de Separação e Purificação

Nos processos biotecnológicos, após a produção da substância de interesse na etapa de cultivo celular, as operações subsequentes de recuperação e purificação (*downstream processing*) são a chave para a obtenção de produtos de elevada qualidade. No entanto, em muitos processos, os custos com estas operações podem atingir até 80% dos custos totais de produção (Wenzig *et al.*, 1993). Como, geralmente, são empregados vários estágios na recuperação dos produtos, o rendimento global de cada produto depende tanto do número

de estágios necessários, quanto do rendimento individual de cada um deles. Assim, torna-se necessário buscar, no estudo da recuperação de biomoléculas, uma redução no número de estágios, assim como uma otimização do rendimento de cada um.

Uma forma de reduzir o número de etapas de recuperação e purificação do produto é o desenvolvimento de processos de alta produtividade e alto rendimento. O emprego de processos com membranas, além de permitir altas vazões de operação, permite integrar, em uma etapa, diversos estágios de downstream processing, tais como separação da biomassa, purificação e concentração do produto, permitindo um aumento do rendimento global de produto e reduzindo, assim, os custos de produção do mesmo.

Dentre os processos com membranas destaca-se a ultrafiltração (UF), que é uma técnica de fracionamento baseada na diferença de tamanho das macromoléculas, com potencial para aplicação em larga escala, tanto para a purificação, como para o polimento de produtos biológicos, tais como enzimas, drogas terapêuticas e anticorpos (Ghosh e Cui, 1998). Neste processo, a obtenção de boa resolução e alta produtividade é fortemente dependente das condições de operação (Ghosh *et al.*, 2000, Ghosh e Cui, 2000) e da diferença de tamanho entre as proteínas presentes.

Como forma de aumentar a resolução da ultrafiltração simples, mantendo a sua capacidade de processamento de grandes volumes, foi desenvolvida a filtração tangencial auxiliada por macroligantes. Esta técnica se baseia na ligação da proteína de interesse a um macroligante específico, sendo o complexo resultante retido pela membrana, enquanto as impurezas passam pela mesma. Quando um tampão adequado é introduzido, a proteína de interesse se dissocia do macroligante e é, então, transportada através da membrana na forma purificada.

Para produtos que requerem grau de pureza muito elevado, tais como biofármacos de uso humano, torna-se indispensável o emprego de processos cromatográficos de purificação, dada a alta seletividade e resolução dos mesmos. Dentre as técnicas cromatográficas, a adsorção por afinidade, que tem como base o reconhecimento bioespecífico entre a proteína de interesse e o ligante de afinidade, se destaca para a purificação de proteínas que se encontram diluídas em um meio complexo, tais como os encontrados em processos biotecnológicos. Em condições ideais, o desenvolvimento de um sistema de afinidade eficiente pode resultar em fatores de purificação de até 1000 vezes em

uma única etapa, com recuperação quase completa do produto (Roper e Lightfoot, 1995), permitindo uma redução do número de estágios de purificação necessários, com consequente aumento do rendimento global do processo.

No entanto, analisando-se os sistemas cromatográficos convencionais sob o ponto de vista de engenharia, percebe-se que estes sistemas sofrem de uma severa limitação quando se deseja utilizá-los em escala comercial. Esta limitação está associada à compressibilidade intrínseca dos leitos de gel de agarose tradicionalmente empregados em colunas cromatográficas que, sob condições típicas de operação, empacotam de forma tal que comprometem seriamente a vazão através do sistema. Outros problemas associados a colunas cromatográficas são o eventual aprisionamento de ar em seu interior, a secagem do leito, a ruptura das partículas e a difusão intra-partícula (Malakian *et al.*, 1993).

Segundo a Lei de Darcy (Darcy, 1856), a vazão Q que permeia um meio poroso confinado em uma coluna é diretamente proporcional ao quadrado do diâmetro d da coluna e inversamente proporcional à altura L do leito, a uma dada queda de pressão ΔP (equação 1).

$$Q = \frac{\pi k \Delta P d^2}{4 \eta L} \quad (1)$$

onde k é a permeabilidade do leito e η é a viscosidade dinâmica do líquido.

Desta forma, para maximizar-se a vazão, a uma dada ΔP , seriam necessários, idealmente, um grande diâmetro de coluna e uma altura do leito a menor possível. Este formato de coluna pode ser, imediatamente, associado a membranas.

Por este motivo, o uso de membranas de microfiltração como suporte para ligantes cromatográficos vem sendo estudado de forma crescente nos últimos 10 anos (Klein, 2000), uma vez que o seu emprego permite operar-se a vazões altas e quedas de pressão relativamente baixas, o que permite o processamento de grandes volumes de meio em tempos reduzidos (Charcosset, 1998; Castilho *et al.*, 2002a).

Adicionalmente, a combinação de processos cromatográficos e processos com membranas permite posicionar os estágios de purificação do produto nas etapas iniciais de *downstream processing*, possibilitando, no caso do emprego de módulos com hidrodinâmica adequada, a realização da purificação do produto na presença de células,

acarretando uma redução do número de estágios de processamento. Desta mesma forma, o emprego de cromatografia com membranas vem permitindo a integração da etapa de cultivo celular com as etapas de purificação do produto (Castilho *et al.*, 2002b), em uma estratégia que visa a um aumento de produtividade e a uma redução dos custos de produção do bioproduto (Schügerl, 2000).

II.7 Comentários Finais

Deste apanhado da literatura, que contemplou as diversas facetas da *Engenharia Bioquímica* (certamente algumas lacunas ficaram) é possível vislumbrar territórios de atuação para o engenheiro bioquímico do futuro. Como bem frisado por Humphrey (2000), o tema do aumento de escala (*scale-up*), que marcou a atuação do engenheiro bioquímico no passado, não se constitui em *gargalo* para os bioprocessos atuais. Por outro lado, há atualmente grande necessidade de desenvolvimento de sistemas inteligentes de monitoramento e de controle de bioprocessos para incrementar as suas produtividades. Os avanços da nanotecnologia (nano-sensores) poderão contribuir de modo fundamental para o controle mais fino dos bioprocessos.

No tocante aos processos de recuperação e de purificação de bioprodutos, há ainda um campo vasto de investigação em aberto, sobretudo no que se refere às técnicas de recuperação e rompimento celular, às técnicas de manutenção da integridade estrutural da biomolécula de interesse durante os vários estágios de purificação e a um melhor entendimento e maior emprego dos processos de separação por afinidade.

Um outro campo que deve despertar a atenção do engenheiro bioquímico refere-se à concepção ótima do bioprocessos, tendo-se em conta as exigências de regulação e de certificação cada vez mais estritas. Humphrey (2000), na sua interessante revisão, afirma que o engenheiro bioquímico deve se incorporar ao processo de desenvolvimento do produto nas suas etapas iniciais, estando presente quando os bioquímicos e os biólogos moleculares definirem a linhagem celular mais adequada como hospedeira dos genes de interesse. Ele também deve participar das primeiras decisões sobre as etapas de purificação

e recuperação do produto. Assim, concordando com as observações do Prof. Humphrey, pode-se concluir que o engenheiro bioquímico do futuro deve estar preparado para participar e tomar decisões em todas as etapas do desenvolvimento de um bioprocessos, desde a sua concepção até a obtenção do produto final. ■



III. Referências

- Aiba S., Humphrey, A.E., Mills, N.F. (1965). Biochemical Engineering. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Antunes, A.M.S. (1999). A importância da gestão para o desenvolvimento biotecnológico em enzimas industriais. 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática-ENZITEC 99. Anais do Evento, 1-5.
- Bailey J.E. (1998). Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotechnol. Prog.*, 14, 8-10.
- Bailey J.E. (1999). Biochemical engineering - molecular, cellular, and process frontiers, Editorial Overview, *Current Opinion Biotechnol.*, 10(2), 115-116.
- Bull, A.T., Goodfellow, M., Slater, J.H. (1992). Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu. Rev. Microb.*, 46, 219-252.
- Bullock, C. (2000). The archaea - a biochemical perspective. *Biochem. & Molec. Biol. Educ.*, 28, 186-191.
- Castilho, L.R. (2001). Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells. *Coleção Fortschritt-Berichte - Reihe 17 (Biotechnik/Medizintechnik)*. VDI-Verlag, Düsseldorf.
- Castilho, L.R., Anspach, F.B. (2003). CFD-aided design of a dynamic filter for mammalian cell separation. *Biotechnol. Bioeng.*, 83, 514-524.
- Castilho, L.R., Anspach, F.B., Deckwer, W.-D. (2002a). Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins. *J. Membrane Sci.*, 207, 253-264.
- Castilho, L.R., Anspach, F.B., Deckwer, W.-D. (2002b). An integrated process for mammalian cell perfusion cultivation and product purification using a dynamic filter. *Biotechnol. Prog.*, 18, 776-781.

- Castilho, L.R., Medronho, R.A. (2002). Cell retention devices for suspended cell perfusion cultures, In: *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology: Tools and Applications of Biochemical Engineering Science*, v. 74, Scheper, T. (ed.), Springer Verlag, Heidelberg, 129-169.
- Charcosset, C. (1998). Purification of proteins by membrane chromatography. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 71, 95-102.
- Darcy, H.P.G. (1856). *Les fontaines publiques de la ville de Dijon: Exposition et application à suivre et des formules à employer dans les questions de distribution d'eau*. Victor Dalamont, Dijon.
- Dordick, J.S., Lee, M.Y., Srinivasan, A., Wu, X., Lindsay, J.P. (2002). High-throughput microscale biocatalysis for discovery and synthesis. *International Congress on Biocatalysis (Biocat 2002)*, Book of Abstracts, p. 30.
- Endo, T., Koisumi, S., Tabata, K., Ozaki, A. (2002). Biotransformation with whole cells: large-scale production of sugar nucleotides and oligosaccharides through bacterial coupling. *International Congress on Biocatalysis (Biocat 2002)*, Book of Abstracts, p. 149.
- Fernandes, P., Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S. (2003). Membrane assisted extractive bioconversions. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 80, 115-148.
- Ghosh, R., Cui, Z. (2000). Analysis of protein transport and polarization through membranes using pulsed sample injection technique. *J. Membr. Sci.*, 175, 75-81.
- Ghosh, R., Cui, Z.F. (1998). Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane pretreatment. *J. Membr. Sci.*, 139, 17-25.
- Ghosh, R., Silva, S.S., Cui, Z. (2000). Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. *Biochem. Eng. J.*, 6, 19-26.
- Griffiths, J.B. (1992). Animal cell culture processes – batch or continuous? *J. Biotechnol.*, 22, 21-27.
- Hohmann, H.P. (2002). Metabolic engineering of riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *International Congress on Biocatalysis (Biocat 2002)*, Book of Abstracts, p. 150.

- Humphrey, A.E. (2000). Biochemical engineering - past, present and future. www.fkksa.utm.my/BI/department/bio.paper.htm
- Klein, E. (2000). Affinity membranes: a 10-year review. *J. Membrane Sci.*, 179, 1-28.
- Klenk, H.P., Ruepp, A., Stark, M., Zibat, A., Becker, I. (2002). Screening for enzyme encoding genes in genomes of extremophilic prokaryotes. International Congress on Biocatalysis (Biocat 2002), Book of Abstracts, p. 23.
- Klibanov, A.M. (1986). Enzymes work in organic solvents, *Chemtech*, 16, 354-359.
- Kunert, R., Steinfellner, W., Purtscher, M., Assadian, A., Katinger, H. (2000). Stable recombinant expression of the anti HIV-1 monoclonal antibody 2F5 after IgG3/IgG1 subclass switch in CHO cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 67, 97-103.
- Law, B.A. (1996). Manipulation of enzymes for industrial application - protein and environmental engineering. In: *Industrial Enzymology*, Chapter 3, Godfrey and West (Eds.), MacMillan Press Ltd., London, 387-392.
- Lorenz P., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J. (2002). Enzymes from backyard biotopes - screening the metagenome for industrial relevant biocatalysis. International Congress on Biocatalysis (Biocat 2002), Book of Abstracts, p. 25.
- Lubiniecki, A.S. (1998). Historical reflections on cell culture engineering. *Cytotechnol.*, 28, 139-145.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (1997). *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall Inc., New Jersey.
- Malakian, A., Golebiowska, M., Bellefeuille, J. (1993). Purification of monoclonal and polyclonal IgG with affinity membrane matrix coupled with Proteins A and G. *Am. Lab.*, 25:40P.
- Rittmann, B. E. (2002). The role of molecular methods in evaluating biological treatment processes. *Water Environ. Res.* 74: 421-427.
- Roper, D.K., Lightfoot, E.N. (1995). Separation of biomolecules using adsorptive membranes. *J. Chromatogr. A*, 702, 3-38.

- Ryu, D.D.Y., Nam, D.H. (2000). Biomolecular engineering: a new frontier in biotechnology. *J. Molec. Catalysis B: Enzymatic*, 10, 23-37.
- Savage, A. (1997). Glycosylation: a post-translational modification, In: *Mammalian cell biotechnology in protein production*, Hauser, H.J., Wagner, R. (eds.), Walter de Gruyter, Berlin.
- Schügerl, K. (2000). Integrated processing of biotechnology products. *Biotechnol. Adv.*, 18, 581-597.
- Shimizu, H. (2002). Metabolic engineering - integrating methodologies of molecular breeding and bioprocess system engineering. *J. Bioscience Bioeng.* 94(6), 563-573.
- Steel, R. (1957). *Biochemical Engineering*. Heywood & Co., London.
- Stephanopoulos G.N., Aristidou, A.A., Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering Principles and Methodologies*. Academic Press, New York.
- Unger, D.R., Muzzio, F.J., Aunins, J.E., Zinghvi, R. (2000). Computational and experimental investigation of flow and fluid mixing in roller bottle bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 70, 117-130.
- Vo-Dinh, T., Cullum, B.M., Stokes, D.L. (2001). Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensors and Actuators B*, 74, 2-11.
- Webb, F.C. (1964). *Biochemical Engineering*. D. Van Nostrand, London.
- Wenzig E., Lingg, S., Kerzel, P., Zeh, G., Mersmann, A. (1993). Comparison of selected methods for downstream processing in the production of bacterial lipase. *Chem. Eng. Technol.*, 16, 405-412.



Denise Maria Guimarães Freire é professora da UFRJ desde 1996, tendo atuado na Faculdade de Farmácia até no ano de 2002, quando transferiu-se para o Departamento de Bioquímica do Instituto de Química/UFRJ. Defendeu sua tese de doutorado em 1996 nesta instituição. Seus interesses de pesquisa incluem a produção de biosurfactantes para biorremediação de solos impactados com petróleo, o uso de lipases na síntese de fármacos e o uso de hidrolases na indústria de alimentos.



Leda dos Reis Castilho é professora do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ desde 2002. Defendeu sua tese de doutorado em 2001 no Technische Universitaet Braunschweig, Alemanha. Entre seus interesses de pesquisa destacam-se a produção e purificação de biofármacos e anticorpos monoclonais, a produção de enzimas microbianas por fermentação no estado sólido e o desenvolvimento e otimização de processos integrados com cultivo e purificação simultâneos.



Geraldo Lippel Sant'Anna é professor do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ desde 1975. Defendeu sua tese de doutorado em 1980 no Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, na França. Em 2003, pelo mérito acadêmico alcançado ao longo de sua carreira, foi agraciado com o Prêmio COPPE de Mérito Acadêmico. Entre seus interesses de pesquisa destacam-se o tratamento biológico de efluentes e as aplicações industriais de enzimas