



BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Revisão dos principais processos

A indústria farmacêutica necessita de processos biotecnológicos para obtenção de vários produtos importantes para a saúde humana e animal. A história da biotecnologia moderna começa inclusive com o desenvolvimento de um medicamento, a penicilina, na primeira metade do século XX. A partir de então, processos biotecnológicos são utilizados na produção de vitaminas, hormônios, antibióticos, vacinas e enzimas. Este trabalho apresenta as características gerais desses processos.

Na biotecnologia industrial o reator é o elemento central, pois é nele que se desenvolvem as transformações de interesse; embora fundamental, não é o mais importante do processo. Dois conjuntos de operações devem ser considerados:

- 1) Os tratamentos iniciais (“Upstream processes”)- antecedem a operação.
- 2) Os tratamentos finais (“downstream processes”)- englobam a separação e a purificação dos produtos e tratamentos dos resíduos (Borzani et al,2001)

O sucesso de um dado processo fermentativo depende muito de uma correta definição de 4 pontos básicos: microrganismo, meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto (Schmidell et al., 2001). Os três primeiros itens fazem parte dos “upstream processes” enquanto o último do “downstream processes”.

Na verdade, esses quatro pilares de um processo fermentativo interagem enormemente, sendo necessário buscar defini-los de forma conjunta, levando em consideração aspectos biológicos e econômicos. O desempenho de um dado microrganismo depende muito da composição do meio de cultura em que este é colocado. A seguir, serão abordados cada um destes pilares.

1- TIPOS DE MICRORGANISMOS

São divididos em vírus, procariontes (bactérias e cianofíceas) e eucariontes (fungos, protozoários, algas, cultura de tecidos animais e vegetais). Os vírus patogênicos apresentam interesse para vacinas, enquanto que vírus bacteriófagos são importantes para estudos genéticos (para mapeamento da posição dos genes e para construção de

novas cepas por transdução ou recombinação. Na recombinação, fagos são usados como vetores para introduzir DNA estranho na célula (Moo-Young).

Bactérias e fungos são os microrganismos responsáveis pela maioria dos processos biotecnológicos farmacêuticos. As categorias de produtos da fermentação bacteriana são:

- “single cell protein” ou biomassa
- produtos finais (ex: solventes e ácidos)
- metabólitos primários (ex: aa., enzimas e nucleótídeos)
- metabólitos secundários (ex: anticorpos, pigmentos e polisacarídeos)

A composição do meio pode influenciar o metabolismo das células diretamente através da nutrição ou indiretamente e pela alteração da forma do crescimento como a eficiência da aeração- particular e importante quando há crescimento de organismos filamentosos (Moo-Young).

A cultura de tecidos de células animais (répteis, peixes, aves, anfíbios, insetos) e vegetais – cultivadas em larga escala para produção de vacinas, para acúmulo de metabólitos celulares e para bioconversão de substratos como esteróides e alcalóides. A cultura de tecidos de células vegetais para produção de agentes farmacologicamente ativos é uma área promissora.

A obtenção desses microrganismos pode ser feita de várias maneiras: isolamento a partir de recursos naturais; compra em coleções de culturas; obtenção de mutantes naturais; obtenção de mutantes induzidos por métodos convencionais; obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética.

Para uma aplicação industrial, espera-se que os microrganismos apresentem as seguintes características gerais:

- apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto;
- permitir o acúmulo do produto no meio, de forma a se ter elevada concentração do produto no caldo fermentado;
- não produzir substâncias incompatíveis com o produto;
- apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico;
- não ser patogênico;
- não exigir condições de processo muito complexas;
- não exigir meios de cultura dispendiosos;

Rogério Saad Vaz, BMD, Ph.D.,
Coordenador do curso de Biomedicina da
Faculdade Pequeno Príncipe
Pesquisador do Instituto Pelé Pequeno
Príncipe
rogeriovaz@fpp.edu.br

Maria Rosa Machado Prado, M.Sc.,
Professora Adjunta do curso de Farmácia
da Universidade Positivo
maria.rosamachado@up.edu.br

Fátima de Carvalho, M.Sc., Professora
Adjunta do curso de Farmácia da
Universidade Positivo
fatimadecarvalho@up.edu.br

- permitir a rápida liberação do produto para o meio.

2. MEIOS DE CULTURA

A formulação de um meio de cultivo deve levar em conta as características nutricionais do microrganismo a ser cultivado, de forma que não existe uma formulação única para o desenvolvimento de microrganismos em condições artificiais. No caso de cultivo de células vegetais e animais *in vitro*, monocamadas de culturas celulares animais são indispensáveis para o cultivo de células o isolamento e identificação de víruses. A produção de vacinas virais e de interferon são os principais processos comerciais usando células animais (MOO-YONG).

As linhagens celulares são extremamente úteis na pesquisa celular, como fonte de grandes quantidades de células de um tipo uniforme, especialmente por poderem ser estocadas em nitrogênio líquido a -196°C , por um período de tempo indefinido (ALBERT, 1997). Essas linhagens celulares imortalizadas podem se desenvolver ancoradas em uma superfície plástica como monocamadas, ou prescindir da necessidade de contato e crescer em suspensão dentro de frascos nos quais o meio de cultivo é levemente agitado (MOO-YOUNG).

Os meios de cultivo para células animais são complexos, contendo soluções tampônicas de sais minerais, glicose, vitaminas, aminoácidos, fatores de crescimento, extratos fetais e soro. Antibióticos são usualmente incorporados nesses meios para evitar contaminação bacteriana., embora muitas vezes interfiram no isolamento e purificação do produto metabólico. Independente do fato das linhagens celulares serem derivadas de diferentes mamíferos ou de diferentes órgãos ou do mesmo hospedeiro, elas se desenvolveram todas no mesmo tipo básico de meio de cultivo.

O cultivo celular de células vegetais pode ser feito em meios sólidos ou em suspensão. As técnicas e o meio usado para crescimento de plantas são similares aqueles para células animais, exceto que a luz é essencial e extratos fetais e soro devem ser de origem vegetal. Carboidratos devem ser adicionados ao meio desde que o processo de fotossíntese realizado por células em cultura é pouco eficiente. Os reatores para crescimento de plantas não requerem altas taxas de oxigenação, embora a agitação seja importante para prevenir sedimentação celular (MOO-YOUNG).

Os fatores que influem nesses cultivos são a temperatura, o pH, teor de oxigênio, agitação, teor de umidade

3. BIORREADORES

A engenharia da fermentação é um ramo da tecnologia que estuda o desenho, desenvolvimento, construção e operação da planta e equipamentos utilizados nos pro-

cessos biológicos em escala industrial.

Nos processo de fermentação, o biorreator fornece o ambiente para o crescimento e para a atividade microbiana. Durante o período, previne a liberação da biomassa interna para o ambiente, assim como, impede a entrada de substâncias estranhas para dentro do meio de reações.

O meio ambiente do biorreator leva em consideração os aspectos biológicos, químicos e físicos (WINKLER, 1986).

a) meio biológico: é favorável quando somente o organismo que contribui ao processo está presente, sendo denominado um sistema "asséptico". Isto se consegue pela esterilização do ambiente e posterior introdução do microrganismo desejado (inoculação);

b) meio químico: está relacionado com o meio de crescimento microbiano, com as concentrações adequadas de substratos ou nutrientes microbiológicos, assim como precursores sintéticos, livres de substâncias inibidoras e mantidas ao pH adequado. Enquanto os nutrientes solúveis são adicionados ao meio, a manutenção da oxigenação é feita continuamente. Nos processos anaeróbicos, deve-se em alguns casos, dispor de dispositivos para eliminar o oxigênio continuamente. Outros parâmetros devem ser observados, e dizem respeito à baixa atividade do meio aquoso (baixa concentração do soluto) assim como à força iônica (substâncias iônicas em solução precedente de sais);

c) meio físico: se refere principalmente à temperatura do sistema, que para seu controle leva em conta o desenho do fermentador. Este controle, bem como a necessidade em manter-se a uniformidade das condições durante o processo, está relacionado com uma boa agitação, o que por sua vez, provoca a ruptura de estruturas do organismo (cisalhamento).

3.1 Tipos de biorreatores

Vários tipos de biorreatores podem ser utilizados e o grau de sofisticação (desenho, construção e funcionamento) dependem da sensibilidade do processo ao ambiente mantido no recipiente (WINKLER, 1986). O material utilizado na construção dos biorreatores deve ser atóxico, resistente à pressão e à corrosão química.

Os biorreatores em processos farmacêuticos podem ser Químicos ou Biológicos:

-Biorreatores Químicos nos quais as reações ocorrem na ausência de células vivas, ou seja, são tipicamente os "reatores enzimáticos".

-Biorreatores Biológicos nos quais as reações se processam na presença de células. Os biorreatores biológicos são amplamente conhecidos e mais utilizados, sendo empregados desde a década de 40 para produção industrial. Possuem uma grande diversidade de aplicação, como produção de enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos, solventes, bebidas e tratamento de resíduos orgânicos industriais ou domésticos.

Na classificação dos biorreatores, ainda são levados em consideração:

• **tipo de biocatalisador: células ou enzimas;**

• **a configuração do biocatalisador: células ou enzimas livres ou imobilizadas;**

• **forma de se agitar o líquido no reator.**

Assim sendo, os biorreatores classificam-se em dois grupos: sistema de cultivo disperso e sistema de cultivo imobilizado.

3.2. Modo de operação

A classificação Mista de Kleinstreuer é a mais utilizada:

1. Reatores em fase aquosa (fermentação submersa)

a. Células e enzimas livres:

a.1) Reatores agitados mecanicamente (STR - *stirred tank reactor*)

a.2) Reatores agitados pneumaticamente

- Coluna de bolhas ("bubble column")

- Reatores "air-lift"

a.3) Reatores de fluxo pistonado ("plug-flow")

2. Reatores em fase não-aquosa (fermentação semi-sólida)

b) Células/enzimas imobilizadas em suportes:

b.1) Reatores em leito fixo

b.2) Reatores com leito fluidizado

c) Células/enzimas confinadas entre membranas:

c.1) Reatores com membranas planas

c.2) Reatores de fibra oca (hollow-fiber)

3. Reatores estáticos (reatores com bandejas)

4. Reatores com agitação (tambor rotativo)

5. Reatores com leito fixo

6. Reatores com leito fluidizado gás-sólido

Os biorreatores mais amplamente empregados são os Reatores Agitados Mecanicamente (STR), constituindo cerca de 90% do total de reatores utilizados industrialmente.

3.3 Tamanho da unidade de produção

A capacidade total da planta de fermentação será obtida utilizando-se pequenas unidades ou um número pequeno de unidades maiores. O tamanho da unidade pode ser influenciado por:

- facilidade para transporte;

- espaço disponível;

- custo de produção: unidade grandes acarretam menores custos que as pequenas, principalmente se forem com instrumentação sofisticada;

- recipientes pequenos são adequados quando se necessita uma variedade de produtos e quando existe perigo de rompimentos.

A capacidade dos biorreatores em fase aquosa varia conforme a necessidade. Assim, em escala de produção industrial:

- Até 1-2 m³: cultivo de microrganismos patogênicos, células animais ou vegetais, em geral produtos ligados à saúde;
- Intermediária – até 100-200 m³ : para produção de enzimas, antibióticos e vitaminas;
- Milhares de m³ : fermentação alcoólica ou tratamento biológico de resíduos, sem aspersão.

3.4 Fornecimento de oxigênio nos biorreatores

O suprimento adequado de oxigênio é indispensável para microrganismos aeróbios, e o efeito levará a um maior ou menor rendimento da cultura. Para alguns microrganismos facultativos, que podem desenvolver-se sem oxigênio, o aporte deficiente, além de influenciar no rendimento, provoca diferenças na velocidade do crescimento e nos produtos sintetizados a partir da atividade do microrganismo (STURZA, 1995).

O principal problema no fornecimento de oxigênio diz respeito ao fato de ser ligeiramente solúvel, o que faz com que deva ser fornecido de forma contínua, inclusive em fermentações do tipo interrompido ou em batelada (por cargas, batch). Assim, deve-se colocar o gás em contato com o líquido, dissolve-lo no meio, e transferir o gás dissolvido na fase gás-líquido aos organismos. A administração rápida de oxigênio necessita, portanto, de grandes superfícies de contacto entre o gás e o líquido, para facilitar a dissolução. Isto faz com que a administração de oxigênio e a agitação sejam práticas inseparáveis em um sistema aerado (WINKLER, 1986).

3.4.1. Aeração e agitação dos biorreatores para fermentação líquida

Além de proporcionar oxigênio, a aeração também é importante para limpar o cultivo de produtos metabólicos voláteis e indesejáveis. A agitação, direta ou como efeito secundário da aeração, é necessária pelas seguintes razões:

- aumentar a velocidade de transferência de oxigênio das borbulhas de ar ao meio líquido, uma vez que os microrganismos necessitam de oxigênio dissolvido;
 - aumentar a velocidade de transferência de oxigênio e nutrientes do meio para as células, evitando-se que surjam áreas com baixo nível de oxigênio e nutrientes;
 - impedir a formação de grupos de células ou agregados de micélio;
 - aumentar a velocidade de transferência de produtos metabólicos de células ao meio;
 - aumentar a taxa ou eficiência de transferência de calor entre o meio e as superfícies de refrigeração do fermentador.
- Por outro lado, a turbulência da agitação promove:
- dispersão de ar em pequenas bolhas;
 - impedir a coalescência das bolhas;

- diminuir a extensão limitante da película de líquido na interfase gás/líquido;

- retardar a perda de gás durante o cultivo, fazendo com que as bolhas demorem mais para chegar à superfície.

Alguns aspectos são extremamente importantes, uma vez que afetam o fornecimento de oxigênio para o cultivo, como a geometria do sistema, sua velocidade, a altura total do líquido no fermentador, tipo de difusor e vazão de ar.

Em fermentação, necessita-se das duas ações, o bombeamento e o cisalhamento. Estes efeitos são conseguidos utilizando-se turbinas e hélices. Existem modelos como a turbina com pás inclinadas, que proporcionam as duas ações ao mesmo tempo.

O cisalhamento está diretamente relacionado à velocidade do agitador. Assim, determinados organismos são sensíveis a este efeito, e se adaptam melhor a reatores que utilizam sistema sem agitador. Durante o processo fermentativo é possível ocorrerem alterações significativas no caldo, que pode passar à condição de líquido não-newtoniano, como no caso de processos envolvendo o cultivo de fungos filamentosos.

A tensão de cisalhamento varia em função do gradiente de velocidade (dv/dr). A constante de proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de velocidade é definida como a viscosidade do líquido. Assim sendo, esta viscosidade influencia o processo, e pode mudar durante a fermentação.

3.4.2 Aeração dos biorreatores para fermentação no estado sólido

Quando se trabalha com fermentação em estado sólido, a agitação é comandada pelo tipo de processo, tipo de reator e o produto desejado. Existe a fermentação com agitação ocasional ou com agitação contínua. Alguns produtos, como aflatoxina e ocratoxinas, são produzidos em sistemas agitados, e a esporulação pode ser reprimida com a agitação. Também a agitação pode ter efeitos adversos sobre a porosidade do substrato, provocando a compactação das partículas, impedindo a fixação do microrganismo ao sólido e ocasionando o rompimento do micélio, por exemplo.

A aeração do substrato é facilitada em função dos espaços vazios existentes entre as partículas sólidas.

3.5 INSTRUMENTAÇÃO E CONTROLE EM BIOPROCESSOS

O sucesso de um processo fermentativo depende da existência de condições adequadas para a produção de biomassa e formação do produto. A temperatura, pH, grau de agitação, concentração de oxigênio no meio de cultivo e outros fatores devem ser mantidos constante durante todo o processo. A manutenção dessas condições necessita um monitoramento cuidadoso da fermentação através de um sistema de controle pelo qual as condições ótimas podem

ser mantidas.

O monitoramento do processo fornece importantes informações quanto ao progresso da fermentação, essas indicam casos de contaminação, morte celular ou fermentações que ocorrem de maneira fora do esperado. O avanço dos processos fermentativos totalmente automatizados depende da existência de sensores que produzam sinais significativos de controle.

3.5.1 CONTROLE DE PROCESSO

Existem três possíveis objetivos para o controle do processo:

- 1) Manter uma variável constante ao longo do tempo
- 2) Forçar uma variável a seguir o caminho pré-determinado ao longo do tempo
- 3) Otimizar algumas funções das variáveis do sistema

O primeiro se consegue pela regulação, o segundo por mecanismos auxiliares, o terceiro por controladores ótimos.

Todos os aparelhos de instrumentação são geralmente conhecidos como controladores automáticos. Em um sistema de controle se tem quatro classes de variáveis:

- 1) Variáveis controladas: é a variável de saída que desejamos controlar.
- 2) Variável manipulada: é a variável de entrada com a que se controla.
- 3) Variável de distúrbio: variável de entrada que afeta a variável controlada.
- 4) Variáveis de referência: é o valor desejado da variável controlada.

Os parâmetros que podem ser medidos em processos fermentativos:

1) PARÂMETROS FÍSICOS:

- Temperatura
- Pressão
- Consumo de potência
- Viscosidade
- Fluxo de aeração e de meio
- Turbidez
- Peso do fermentador

2) PARÂMETROS QUÍMICOS:

- pH
- Oxigênio dissolvido
- Oxigênio e gás carbônico nos gases de saída
- Potencial de redox
- Concentração de substrato
- Concentração de produto
- Força iônica

3) PARÂMETROS BIOLÓGICOS:

- Produtos biologicamente ativos
- Atividade enzimática
- Conteúdo de DNA e RNA
- Conteúdo de NADH₂ e ATP
- Conteúdo em proteína

1) Parâmetros Físicos:

A – TEMPERATURA

A taxa do crescimento microbiano, como todas as outras reações químicas, é uma função da temperatura. Normalmente, os microrganismos crescem em temperaturas que variam de 25 a 30°C. Existem, quanto à temperatura

de crescimento, quatro grupos de microrganismos:

- **Psicrófilos:** 14-20° C
- **Mesófilos:** 30-36° C
- **Termófilos:** 50-60° C
- **Extremo termófilos:** 60-80° C

A temperatura também afeta a eficiência da conversão do substrato (fonte de carbono – energia) em massa celular. O rendimento máximo de conversão ocorre a temperatura menor que a temperatura ótima de crescimento. Este ponto é particularmente importante na otimização do processo quando se espera um máximo rendimento, mas não taxa de crescimento.

As reações simultâneas que ocorrem no interior das células, influenciam no crescimento e formação de proteínas enzimáticas, que apresentam rápidas variações de acordo com a faixa de temperatura.

Para cada microrganismo, existe uma temperatura ótima de crescimento e de formação de produto, em um substrato adequado; para uma otimização eficiente é necessário um controle de temperatura de 0,5° C.

Os sensores de temperatura mais utilizados são:

- **Termômetro:** Utilizado somente em pequenos fermentadores devido a sua fragilidade. Em fermentadores maiores há a necessidade de inserir o termômetro dentro de um local próprio dentro de fermentador; é apenas indicativo e não automatizado.

- **Termistor:** São semicondutores feitos de misturas de óxidos de ferro, níquel e outros metais; a principal característica é a grande variação da resistência em função de uma pequena variação de temperatura.

- **Termômetro bimetalico:** Consiste de uma bobina bimetalica helicoidal protegida por um tubo, pode ser colocado na extremidade uma caneta para o registro de variações de temperatura. São menos suscetíveis a quebras porém custam mais caro.

- **Termômetro de bulbo de pressão:** É um medidor de pressão conectado a um pequeno tubo, preenchido com gás ou líquido apropriado sob pressão. Uma caneta é conectada na extremidade livre para o registro de sinais elétricos ou pneumáticos.

- **Termopares:** São dois filamentos de dois metais diferentes que são mantidos em diferentes temperaturas, ligados em um circuito elétrico. A corrente produzida pode ser medida no ponto comum da temperatura dos dois metais.

- **Termômetros de resistência elétrica:** Baseia-se nas diferenças de resistência elétrica dos metais com a variação de temperatura.

B – Pressão

O monitoramento da pressão é importante durante a esterilização e a manutenção de uma pressão positiva no reator (aproximadamente 1,2 absoluto) pode auxiliar a manutenção da assepsia; mas a razão mais importante é a segurança. Equipamentos industriais e de laboratório são projetados para suportar uma pressão específica para a fermentação e mais um fator de segurança.

Em fermentadores, medidores de diafragma são utilizados para o monitoramento da pressão. Esses medidores produzem um sinal pneumático que pode ser transformado, se necessário, em um sinal elétrico. É importante que o sensor indique, registre e controle a pressão.

Para minimizar o risco de contaminação utiliza-se uma sobre pressão de 0,2-0,5 bar. A pressão hidrostática também deve ser considerada nos grandes fermentadores uma vez que influencia na solubilidade do oxigênio e gás carbônico no meio de cultura.

C – Potência

Diferentes tipos de medições podem ser feitas para monitorar a potência necessária para fermentadores com agitação mecânica, normalmente mede-se a energia total consumida pelo agitador. A desvantagem deste método porém, é que ele considera também as perdas observadas quando se aumenta a velocidade de agitação (ocorre aproximadamente 30% de perda de energia, utilizada pelo motor).

Medidas diretas da energia dentro do meio de cultivo podem ser conseguidas utilizando medidores dentro do reator.

D – Viscosidade

A viscosidade e outras propriedades reológicas do meio de cultivo podem ser medidas, através da energia consumida em diferentes velocidades de agitação. Outro método utilizado, é o monitoramento da potência durante e após um rápido desligamento da agitação (menos de 30 segundos). Fluidos Newtonianos e não Newtonianos também respondem diferentemente a agitação.

E – Velocidade de fluxo (Ar/Líquido)

A aeração também pode ser controlada de diferentes maneiras, tanto o ar de entrada como o ar de saída. O aparelho mais simples, rotâmetro, fornece leitura visual ou pulsos elétricos. O monitoramento da taxa de aeração é muito importante para os cálculos de balanço de material nos processos fermentativos.

Para o controle da velocidade de fluxo de líquido, em escala laboratorial, são utilizadas bombas de fluxo bem calibradas, que abastecem o fermentador com quantidades conhecidas do líquido. Controles de processos mais longos, podem ser feitos por pesagens contínuas. Um sensor de nível de meio pode ser utilizado já que detecta também o nível de espuma.

2) Parâmetros Químicos:

A – Sondas de pH

O pH externo apresenta pouca influência sobre o pH interno das células microbianas, mas o rompimento dos substratos, seu transporte pela parede celular e a secreção dos produtos celulares, são todos afetados pelo valor do pH do ambiente. O pH do meio tem um efeito sobre a estrutura e permeabilidade da membrana externa.

O pH é uma medida da atividade dos íons hidrogênio e sua determinação se dá dependendo da temperatura. Porém, o sinal da sonda mudará com a temperatura; é importante compensar o efeito da temperatura no circuito. Com a exigência de esterilidade, as sondas esterilizáveis estão ganhando aceitação.

B – O₂ e CO₂:

Um procedimento normal é determinar no ar que entra e sai o O₂ e o CO₂ separadamente pelas propriedades paramagnéticas do O₂ e o espectro de absorção de infravermelho do CO₂. Os sensores para medir esses gases estão bem desenvolvidos e funcionam com poucas interrupções.

O N₂, NH₃, metanol e etanol, podem ser medidos pelo espectrômetro de massas e também pode medir informação qualitativa e quantitativa sobre o intercâmbio de O₂ e CO₂. Mediante o uso de membranas permeáveis aos gases, é possível medir os gases dissolvidos no meio nutritivo. Existem instrumentos que podem analisar até 8 gases simultaneamente na fermentação.

C – Oxigênio dissolvido (OD):

O papel crítico que joga o oxigênio dissolvido (OD) num processo de fermentação é muito importante; as sondas de OD consistem em uma camisa de aço inox ou cristal que contém eletrodos e um eletrólito adequado.

Existem interessantes novidades no campo de eletrodos enzimáticos, denominados biosensores.

4. Recuperação do Produto Final

É a etapa mais difícil, e um processo difícil e caro, chegando a representar de 80% - 90% do custo total do processo.

Os procedimentos utilizados podem ser: físicos/químicos e biológicos (graus de variação).

. Filtração, centrifugação e flotação (separação de células do líquido)

. Rompimento de células (caso produto seja intracelular).

. Extração com solvente específico

. Cromatografia

. Filtração por membranas

. Adsorção

. Cristalização

. Secagem

Os autores dedicam este artigo à memória do Professor Walter Borzani

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORZANI, et al, 2001. Biotecnologia Industrial-fundamentos v.1, 1º Ed. Edgard Blucher Ltda-SP.

SCHMIDELL, et al. 2001. Biotecnologia Industrial-Engenharia Bioquímica v.2, 1º Ed. Edgard Blucher Ltda-SP

REHM, et al., Biotecnology – Biological Fundamentals, v.1, 2º Ed. VCH – Weinheim

MOO-YOUNG, M. Comprehensive Biotechnology. The Principles of Biotechnology: Scientific Fundamentals. V.1, Ed. Pergamon Press-Oxford.